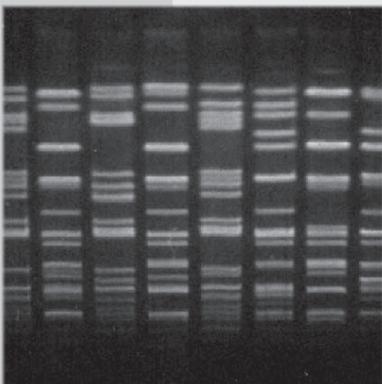


# NACHWEIS UND DNA-FINGERPRINTING VON *ESCHERICHIA COLI* O157-STÄMMEN BEI PFERDEN



**INAUGURAL-DISSERTATION**  
zur Erlangung des Doktorgrades  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

**MELANIE GOLL**

**édition scientifique**  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2005

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2005

© 2005 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Wettenberg  
Printed in Germany



**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**  
édition scientifique

GLEIBERGER WEG 4, D-35435 WETTENBERG  
Tel: 06406-4413 Fax: 06406-72757  
Email: VVB-IPS@T-ONLINE.DE

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

Aus dem Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. M. Bülte

**Nachweis und DNA-Fingerprinting von  
*Escherichia coli* O157-Stämmen bei Pferden**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Doktorgrades  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von  
**MELANIE GOLL**  
Tierärztin aus Stuttgart

Gießen 2005

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. M. Reinacher

---

1. Berichterstatter: Prof. Dr. M. Bülte

2. Berichterstatter: Prof. Dr. R. Bauerfeind

Tag der mündlichen Prüfung: 01.07.2005

Meinen Eltern



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT .....</b>	<b>2</b>
<b>2.1</b>	<b><i>Escherichia coli</i> .....</b>	<b>2</b>
2.1.1	Taxonomie.....	2
2.1.2	Epidemiologie und klinische Bedeutung .....	2
2.1.3	Bedeutung für die Lebensmittelhygiene .....	3
<b>2.2</b>	<b>Darmpathogene <i>E. coli</i>.....</b>	<b>3</b>
2.2.1	Enteropathogene <i>E. coli</i> (EPEC) .....	6
2.2.2	Enterotoxinogene <i>E. coli</i> (ETEC) .....	7
2.2.3	Enteroinvasive <i>E. coli</i> (EIEC).....	8
2.2.4	Verotoxin-bildende <i>E. coli</i> (VTEC)/enterohämorrhagische <i>E. coli</i> (EHEC) .....	8
2.2.5	Enter aggregative <i>E. coli</i> (EaggEC) .....	9
2.2.6	Diffus-adhärente <i>E. coli</i> (DAEC) .....	10
2.2.7	Nekrotoxische <i>E. coli</i> (NTEC) .....	10
2.2.8	Cytolethal distending toxin-producing <i>E. coli</i> (CLDTEC) .....	10
2.2.9	Cell-detaching <i>E. coli</i> (CDEC), diarrhea-associated hemolytic <i>E. coli</i> (DHEC)...	11
<b>2.3</b>	<b>Historie, Definition und Nomenklatur der Verotoxin-bildenden <i>E. coli</i> (VTEC) .....</b>	<b>12</b>
2.3.1	Vero- (VT), Shiga- (Stx) und Shiga-like-Toxine (SLT) .....	12
2.3.2	Enterohämorrhagische <i>E. coli</i> (EHEC).....	13
2.3.3	<i>E. coli</i> O157 .....	14
<b>2.4</b>	<b>Virulenzeigenschaften der VTEC.....</b>	<b>15</b>
2.4.1	Verotoxine .....	15
2.4.1.1	Einteilung.....	15
2.4.1.2	Verotoxin-Varianten.....	19
2.4.1.3	Struktur und Wirkungsweise .....	23
2.4.1.4	Genetische Organisation.....	23
2.4.1.5	Verotoxine in anderen Bakterien-Spezies.....	24
2.4.2	Pathogenitätsinseln .....	25
2.4.2.1	Locus of enterocyte effacement (LEE).....	25
2.4.2.2	High-pathogenicity island (HPI).....	32

2.4.2.3	Tellurite resistance- and adherence-conferring island (TAI).....	32
2.4.2.4	Locus of proteolysis activity (LPA) .....	33
2.4.2.5	<i>E. coli</i> type III secretion 2 (ETT2).....	33
2.4.2.6	Weitere potentielle Pathogenitätsinseln.....	34
2.4.3	Plasmid-codierte Virulenzfaktoren .....	34
2.4.3.1	Enterohämolysin.....	35
2.4.3.2	Katalase-Peroxidase (KatP).....	36
2.4.3.3	Serin-Protease (EspP) .....	36
2.4.3.4	EHEC type II secretion pathway ( <i>etp</i> ).....	37
2.4.3.5	ToxB.....	37
2.4.3.6	STEC autoagglutination adhesin (Saa).....	37
2.4.3.7	Subtilase-Zytotoxin.....	38
2.4.4	Weitere (mögliche) Virulenzfaktoren.....	38
2.4.4.1	Enteroaggregative <i>Escherichia coli</i> heat-stable enterotoxin (EAST1) .....	38
2.4.4.2	Cytolethal distending toxin (CDT) .....	39
<b>2.5</b>	<b>EHEC-Erkrankungen beim Menschen.....</b>	<b>39</b>
2.5.1	Krankheitsbild.....	39
2.5.2	Therapie .....	43
2.5.3	Kosten .....	44
2.5.4	Vorkommen.....	46
2.5.4.1	Situation in Deutschland .....	51
2.5.5	Pathogenese .....	52
2.5.6	Charakterisierung der EHEC-Isolate.....	54
2.5.6.1	Serogruppen/-typen.....	55
2.5.6.2	Verotoxine .....	56
2.5.6.3	<i>eae</i> -Gen .....	58
2.5.6.4	Enterohämolysin-Gen.....	59
2.5.7	Übertragungswege, Risikofaktoren.....	60
<b>2.6</b>	<b>Vorkommen von VTEC in Lebensmitteln.....</b>	<b>61</b>
2.6.1	Epidemiologische Daten.....	61
2.6.2	Charakterisierung der Isolate.....	72
2.6.3	Lebensmittelrechtliche Beurteilung.....	74
<b>2.7</b>	<b>Vorkommen von VTEC bei Tieren.....</b>	<b>75</b>
2.7.1	Hauswiederkäuer.....	75
2.7.1.1	Epidemiologische Situation .....	75
2.7.1.2	Risikofaktoren und Übertragungswege.....	80
2.7.1.3	Krankheitsbild.....	82

2.7.1.4	Charakterisierung der Isolate .....	82
2.7.1.5	Bekämpfung .....	85
2.7.2	Pferde.....	86
2.7.3	Schweine.....	91
2.7.4	Kleine Haustiere .....	92
2.7.5	Vögel inklusive Wirtschaftsgeflügel.....	93
2.7.6	Wild- und Zoosäugetiere.....	95
<b>2.8</b>	<b>Nachweismethoden für VTEC.....</b>	<b>96</b>
2.8.1	Phänotypische Nachweismethoden .....	96
2.8.1.1	Zelltests .....	96
2.8.1.2	Kultivierung.....	97
2.8.1.3	Immunologische Verfahren .....	100
2.8.2	Genotypische Nachweismethoden .....	103
2.8.2.1	Koloniehybridisierung.....	103
2.8.2.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	104
2.8.3	Normen .....	106
<b>2.9</b>	<b>Typisierung von VTEC .....</b>	<b>108</b>
2.9.1	Methoden zur Phänotypisierung .....	108
2.9.1.1	Serotypisierung .....	108
2.9.1.2	Phagentypisierung.....	109
2.9.1.3	Biotypisierung.....	109
2.9.1.4	Verotoxin-Typisierung .....	110
2.9.1.5	Antibiotikaresistenztestung .....	110
2.9.1.6	Multilocus enzyme electrophoresis (MEE).....	110
2.9.2	Methoden zur Genotypisierung.....	110
2.9.2.1	Plasmidtypisierung .....	110
2.9.2.2	Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE).....	110
2.9.2.3	Ribotypisierung.....	112
2.9.2.4	Weitere Modifikationen des Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus-Tests (RFLP).....	112
2.9.2.5	Genotypische Bestimmung des Virulenzprofils.....	112
2.9.2.6	Random amplification of polymorphic DNA (RAPD) .....	113
2.9.2.7	Repetitive element-PCR (rep-PCR) .....	113
2.9.2.8	Amplified fragment length polymorphism (AFLP) .....	114
2.9.2.9	Polymorphic amplified typing sequences (PATs).....	114
2.9.2.10	Multi-locus variable-number tandem-repeats analysis (MLVA) .....	114
2.9.2.11	Multilocus sequence typing (MLST) .....	115

<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>116</b>
3.1	Referenz- und Kontrollstämme.....	116
3.2	Untersuchungsmaterial.....	117
3.3	<b>Kultureller Nachweis von <i>Escherichia coli</i> O157 .....</b>	<b>117</b>
3.3.1	Übersicht über den Versuchsaufbau.....	117
3.3.2	Anreicherungsverfahren und Direktausstrich .....	119
3.3.2.1	Erste Versuchsphase .....	119
3.3.2.2	Zweite Versuchsphase .....	119
3.3.3	Immunomagnetische Separation (IMS).....	119
3.3.4	Agglutination mit <i>E. coli</i> O157-Antiserum.....	120
3.4	<b>Untersuchung der <i>Escherichia coli</i> O157-Isolate.....</b>	<b>121</b>
3.4.1	Spezies-Bestätigung.....	121
3.4.1.1	Koloniemorphologie auf <i>Escherichia coli</i> -Direkt-Agar und Indol-Test.....	121
3.4.1.2	„Bunte Reihe“ .....	122
3.4.2	Bestätigung der Serogruppenzugehörigkeit .....	122
3.4.3	Untersuchung auf Virulenzgene.....	125
3.4.3.1	Verotoxin-Gen(e).....	125
3.4.3.2	<i>E. coli</i> attaching and effacing-Gen .....	127
3.4.4	Nachweis des Enterohämolytins .....	128
3.4.5	Untersuchung des H-Antigens .....	128
3.4.6	Untersuchung der genetischen Verwandtschaft mittels Pulsfeldgelelektrophorese (DNA-Fingerprinting) .....	132
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>136</b>
4.1	<b>Kultureller Nachweis von <i>E. coli</i> O157 .....</b>	<b>136</b>
4.1.1	Vergleich der eingesetzten Untersuchungsmethoden der ersten Versuchsphase .....	136
4.1.2	Ergebnisse der zweiten Versuchsphase .....	136
4.2	<b>Untersuchung der <i>E. coli</i> O157-Isolate .....</b>	<b>137</b>
4.2.1	Spezies-Bestätigung und biochemische Charakterisierung .....	137
4.2.2	Bestätigung der Serogruppenzugehörigkeit.....	138
4.2.3	Untersuchung auf Virulenzgene bzw. -faktoren .....	139
4.2.4	Untersuchung des H-Antigens .....	139

---

4.2.5	Untersuchung der genetischen Verwandtschaft mittels Pulsfeldgelelektrophorese (DNA-Fingerprinting) .....	141
<b>5</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>149</b>
<b>5.1</b>	<b>Sorbit-fermentierende <i>E. coli</i> O157:H-Stämme.....</b>	<b>149</b>
5.1.1	Erkrankungen beim Menschen .....	149
5.1.2	Reservoir und Übertragungswege .....	150
5.1.3	Virulenzprofil.....	150
5.1.4	Phylogenetischer Ursprung .....	151
<b>5.2</b>	<b>Methodische Aspekte.....</b>	<b>151</b>
5.2.1	Methodik der Probenahme .....	151
5.2.2	Vergleich von Anreicherungsverfahren inklusive immunomagnetischer Separation (IMS) und Direktausstrich .....	153
5.2.3	Subkultivierung und Auswahl typischer Kolonien .....	154
5.2.4	Untersuchung des Virulenzprofils .....	154
<b>5.3</b>	<b>Vorkommen von VTEC O157 bei Pferden .....</b>	<b>155</b>
<b>5.4</b>	<b>Charakterisierung der equinen <i>E. coli</i> O157-Isolate .....</b>	<b>156</b>
5.4.1	Biochemische Eigenschaften.....	156
5.4.2	Untersuchung des H-Antigens .....	158
5.4.3	Verwandtschaftsgrad.....	158
<b>5.5</b>	<b>Bedeutung der Serogruppe O157.....</b>	<b>160</b>
5.5.1	Verotoxin-negative <i>E. coli</i> O157 .....	161
<b>6</b>	<b>SCHLUSSFOLGERUNGEN.....</b>	<b>164</b>
<b>7</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>165</b>
<b>8</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>167</b>
<b>9</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>169</b>
<b>10</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>237</b>
<b>10.1</b>	<b>Puffer und Lösungen .....</b>	<b>237</b>

---

10.1.1	Puffer und Lösungen für die PCR .....	237
10.1.1.1	dNTP-Mix (each 10 mM) .....	237
10.1.1.2	TBE-Puffer.....	237
10.1.1.3	Gel-Loading-Buffer .....	237
10.1.1.4	Ethidiumbromid-Färbebad.....	238
10.1.2	Puffer und Lösungen für die PFGE .....	238
10.1.2.1	TE-Puffer .....	238
10.1.2.2	Lysispuffer .....	238
10.1.2.3	Phenylmethylsulfonylfluorid-Lösung.....	238
10.1.2.4	0,5 x TBE-Puffer .....	239
<b>10.2</b>	<b><i>E. coli</i> O157-Nachweis .....</b>	<b>240</b>

## Verzeichnis relevanter bzw. häufig verwendeter Abkürzungen und Einheiten

↑ ↓	Schnittstelle einer Restriktionsendonuklease
%	Prozent
=	gleich
+	positiv, plus
-	negativ, minus
±	plus minus
>	größer als
≥	größer oder gleich
<	kleiner als
≤	kleiner oder gleich
∅	negativ
®	geschütztes Warenzeichen
™	geschütztes Warenzeichen (engl.: <u>tr</u> adema <u>r</u> k)
§	Paragraph
°C	Grad <u>C</u> elsius
μl	<u>M</u> ikroliter
μM	<u>m</u> ikromolar
A	<u>A</u> denin
A/E	<u>a</u> tta <u>ch</u> ing and <u>e</u> ffacing
AEEC	<u>a</u> tta <u>ch</u> ing and <u>e</u> ffacing <u>E</u> scherichia <u>c</u> oli
ALTS	<u>A</u> rbeitskreis <u>L</u> ebensmittelhygienischer <u>T</u> ierärztlicher <u>S</u> achverständiger
Aqua bidest.	<u>A</u> qua <u>b</u> idestillata
Aqua dest.	<u>A</u> qua <u>d</u> estillata
ATCC	<u>A</u> merican <u>T</u> ype <u>C</u> ulture <u>C</u> ollection, Manassas, USA
ATP	<u>A</u> denosin <u>t</u> riphosphat
a <sub>w</sub>	activity of <u>w</u> ater (Wasseraktivität)
BHI	Hirn-Herz-Bouillon (engl.: <u>b</u> rain- <u>h</u> ear <u>t</u> - <u>i</u> nfusion broth)
bp	<u>B</u> asenpaar(e)
C	<u>C</u> ytosin
ca.	<u>c</u> irca
CaCl <sub>2</sub>	<u>C</u> alcium <u>ch</u> lorid
CDC	<u>C</u> enters for <u>D</u> isease <u>C</u> ontrol and Prevention, Atlanta, USA
CDT, CDLT	<u>c</u> ytolethal <u>d</u> istending <u>t</u> oxin
CHO	<u>C</u> hinese <u>h</u> amster <u>o</u> vary [Zellkulturlinie]
CLDTEC	<u>c</u> ytolethal <u>d</u> istending <u>t</u> oxin-producing <u>E</u> scherichia <u>c</u> oli

cm	Zentimeter
CTP	<u>C</u> ytidin <u>t</u> riphosphat
d. h.	das <u>h</u> eißt
DAEC	<u>d</u> iffus- <u>a</u> dhärente <i>Escherichia coli</i>
DIN	<u>D</u> eutsches <u>I</u> nstitut für <u>N</u> ormung, Berlin
DNA	Desoxiribo-Nukleinsäure (engl.: <u>d</u> eoxyribo <u>n</u> ucleic <u>a</u> cid)
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
<i>eae</i> -Gen	<i>E. coli</i> <u>a</u> ttaching and <u>e</u> ffacing-Gen
EAggEC	<u>e</u> ntero <u>a</u> ggregative <i>Escherichia coli</i>
EAST1	<u>E</u> AggEC heat <u>s</u> table enterotoxin
ECD-Agar	<i>Escherichia coli</i> - <u>D</u> irekt-Agar
EDTA	<u>E</u> thylendiamin <u>t</u> etra <u>a</u> ccetat
EHEC	<u>e</u> ntero <u>h</u> ämorrhagische <i>Escherichia coli</i>
Ehly [ <i>hly</i> <sub>EHEC</sub> ]	<u>E</u> ntero <u>h</u> ämoly <u>s</u> in [kursiv: Genbezeichnung]
EIA	<u>E</u> nzymimmuno <u>a</u> ssay
EIEC	<u>e</u> ntero <u>i</u> nvasive <i>Escherichia coli</i>
ELISA	<u>e</u> nzyme <u>l</u> inked <u>i</u> mmuno <u>s</u> orbent <u>a</u> ssay
engl.	<u>e</u> nglisch
<i>Ent.</i>	<i>Enterobacter</i>
EPEC	<u>e</u> nteropathogene <i>Escherichia coli</i>
EspP [ <i>espP</i> ]	<u>e</u> xtrazelluläre <u>S</u> erin- <u>P</u> rotease [kursiv: Genbezeichnung]
et al.	und andere (lateinisch: <u>e</u> t <u>a</u> libi)
ETEC	<u>e</u> ntero <u>t</u> oxische <i>Escherichia coli</i>
EU	<u>E</u> uropäische <u>U</u> nion
Fa.	<u>F</u> irma
<i>flhC</i> , <i>fliC</i>	Flagellin-Gene
g	<u>G</u> ramm
G	<u>G</u> uanin
Gb <sub>3</sub>	<u>G</u> lobotri <u>o</u> sylceramid
Gb <sub>4</sub>	<u>G</u> lobotetra <u>o</u> sylceramid
ggf.	gegebenen <u>f</u> alls
GmbH	<u>G</u> esellschaft <u>m</u> it <u>b</u> eschränkter <u>H</u> aftung
GN	gram <u>n</u> egative broth nach HAJNA
GTP	<u>G</u> uanosin <u>t</u> riphosphat
h	Stunde(n)
H-Antigen	Geißel-Antigen (H: von <u>H</u> auch)
HC	<u>h</u> ämorrhagische <u>C</u> olitis
HC-Agar	<u>H</u> emorrhagic <u>C</u> olitis-Agar nach SZABO
HCl	Salzsäure
HeLa-Zellen	Zellkulturlinie aus Zervixkarzinomzellen der Patientin <u>H</u> enrietta <u>L</u> acks

HPI	<u>h</u> igh- <u>p</u> athogenicity <u>i</u> sland
Hrsg.	<u>H</u> eraus <u>g</u> eber
HUS	<u>h</u> ämolytisch- <u>u</u> rämisches <u>S</u> yndrom
i. A.	im <u>A</u> llgemeinen
i. d. R.	in <u>d</u> er <u>R</u> egel
IfSG	<u>I</u> nfektionss <u>s</u> chutz <u>g</u> esetz
Iha [ <i>iha</i> ]	<u>I</u> rgA <u>h</u> omologue <u>a</u> dhesin [kursiv: Genbezeichnung]
IMS	<u>I</u> mmunom <u>a</u> gnetische <u>S</u> eparation
<i>K.</i>	<i>K</i> lebsiella
KatP ( <i>katP</i> )	plasmid-codierte <u>K</u> atalase-Peroxidase [kursiv: Genbezeichnung]
kb	<u>K</u> ilob <u>a</u> se(n)
KbE	<u>K</u> olonie- <u>b</u> ildende <u>E</u> inheiten
kDa	<u>K</u> ilo <u>D</u> alton
l	<u>L</u> iter
LD <sub>50</sub>	<u>l</u> ethale <u>D</u> osis für <u>50</u> %
LEE	<u>l</u> ocus of <u>e</u> nterocyte <u>e</u> ffacement
LMBG	<u>L</u> ebens <u>m</u> ittel- und <u>B</u> edarfsgegenstände <u>g</u> esetz
M	<u>m</u> olar
max.	<u>m</u> aximal
Mb	<u>M</u> egab <u>a</u> se(n)
MDa	<u>M</u> ega <u>D</u> alton
MgCl <sub>2</sub>	<u>M</u> agnesium <u>ch</u> lorid
min	<u>M</u> inute(n)
mind.	<u>m</u> indestens
ml	<u>M</u> illil <u>i</u> ter
mm	<u>M</u> illim <u>e</u> ter
mM	<u>m</u> illim <u>o</u> lar
MUG	4- <u>M</u> ethyl <u>u</u> mbelliferyl- $\beta$ - <u>D</u> - <u>G</u> lucuronid
n	Anzahl
NaCl	<u>N</u> atrium <u>ch</u> lorid
NaClO <sub>4</sub>	Natrium-Perchlorat
NCTC	<u>N</u> ational <u>C</u> ollection of <u>T</u> ype <u>C</u> ultures, Central Public Health Laboratories, Colindale, London, Vereinigtes Königreich
nm	<u>N</u> anom <u>e</u> ter
Nr.	<u>N</u> ummer
NTEC	<u>n</u> ekro <u>t</u> oxische <u>E</u> scherichia <u>c</u> oli
NTP	Desoxy <u>n</u> ukleotid <u>t</u> riphosphat
o. e.	<u>o</u> ben <u>e</u> rwähnt
o. g.	<u>o</u> ben <u>g</u> enannt
O-Antigen	somatisches Antigen

ORF	offene Leserahmen (engl.: <u>o</u> pen <u>r</u> eadin <u>g</u> <u>f</u> rame)
PC-Agar	<u>P</u> late <u>C</u> ount-Agar
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl.: <u>p</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction)
PFGE	<u>P</u> uls <u>f</u> eld <u>g</u> ele <u>l</u> ektrophorese
<i>pheU</i> , <i>pheV</i>	<u>P</u> henylalanin-tRNA-Gen
<i>rfbE</i>	O-Antigen-Gen
RFLP	<u>R</u> estriktions- <u>F</u> ragment- <u>L</u> ängen- <u>P</u> olymorphismus
RKI	<u>R</u> obert <u>K</u> och- <u>I</u> nstitut, Berlin
rpm	<u>r</u> otations <u>p</u> er <u>m</u> inute
rRNA	<u>r</u> ibosomale Ribonukleinsäure (engl.: <u>r</u> ibonucleic <u>a</u> cid)
<i>Rsa I</i>	Restriktionsenzym aus <u>R</u> hodopseudomonas <u>s</u> phaeroides
s	<u>S</u> ekunde(n)
s.	<u>s</u> iehe
Saa [ <i>saa</i> ]	<u>S</u> TEC <u>a</u> utoagglutination <u>a</u> dhesin [kursiv: Genbezeichnung]
SCVPH	<u>S</u> cientific <u>C</u> ommittee on <u>V</u> eterinary Measures relating to <u>P</u> ublic <u>H</u> ealth der Europäischen Kommission
$s_D$	<u>D</u> ice-Koeffizient
<i>seC</i>	<u>S</u> elenocystein-tRNA-Gen
SF	<u>S</u> orbit-fermentierend
SLT	<u>S</u> higa- <u>l</u> ike- <u>T</u> oxin
sp./spp.	<u>S</u> pezies (Singular/Plural)
ssp.	<u>S</u> ubspezies
STEC	<u>S</u> higa- <u>T</u> oxin-bildende <u>E</u> scherichia <u>c</u> oli
Stx [ <i>stx</i> ]	<u>S</u> higa- <u>T</u> oxin [kursiv: Genbezeichnung]
T	<u>T</u> hymidin
TAI	<u>T</u> ellurite resistance and <u>a</u> dherence-conferring <u>i</u> sland
TBE-Puffer	<u>T</u> ris-(hydroxymethyl)aminomethan- <u>B</u> orat- <u>E</u> DTA-Puffer
Tir [ <i>tir</i> ]	<u>t</u> ranslocated <u>i</u> ntimin <u>r</u> eceptor [kursiv: Genbezeichnung]
tRNA	<u>t</u> ransfer <u>r</u> ibonucleic <u>a</u> cid
TSB	<u>T</u> rypton- <u>S</u> oja- <u>B</u> ouillon
TTP	<u>T</u> hymidin <u>t</u> riphosphat; <u>t</u> hrombotisch- <u>t</u> hrombozytopenische <u>P</u> urpura
U	<u>U</u> nit(s)
u. a.	<u>u</u> nter <u>a</u> nderem
UPGMA	„ <u>u</u> nweighted- <u>p</u> air- <u>g</u> roup <u>m</u> atching by <u>a</u> rithmetic averages“-Algorithmus
UV	<u>U</u> ltra- <u>v</u> iolett
V	<u>V</u> olt
v. a.	<u>v</u> or <u>a</u> llem
VT [ <i>vtx</i> ]	<u>V</u> erotoxin [kursiv: Genbezeichnung]
VTEC	<u>V</u> erotoxin-bildende <u>E</u> scherichia <u>c</u> oli / <u>v</u> erotoxinogene <u>E</u> scherichia <u>c</u> oli

WHO	<u>W</u> orld <u>H</u> ealth <u>O</u> rganization, Genf, Schweiz
Xba I	Restriktionsenzym aus <i>Xanthomonas campestris</i> (ehemals <u>X. b</u> <u>a</u> <u>d</u> <u>r</u> <u>i</u> <u>i</u> )
YOPIS	<u>y</u> oung, <u>o</u> ld, <u>p</u> regnant, <u>i</u> mmunocompromised
z. B.	<u>z</u> um <u>B</u> eispiel
z. Zt.	<u>z</u> ur <u>Z</u> eit



# 1 EINLEITUNG

*Escherichia (E.) coli*-Stämme des Serotyps O157:H7 gelten als Prototyp der enterohämorrhagischen *E. coli* (EHEC), die beim Menschen verschiedene Krankheitsbilder wie hämorrhagische Colitis (HC), hämolytisch-urämisches Syndrom (HUS) und thrombotisch-thrombozytopenische Purpura (TTP) hervorrufen können. Die Produktion von Verotoxinen gilt als primärer Virulenzfaktor dieser Erregergruppe. Das Verotoxinbildungsvermögen ist jedoch nicht auf dieses Serovar beschränkt, sondern konnte mittlerweile bei über 250 verschiedenen *E. coli*-Serovaren nachgewiesen werden.

Zum Reservoir der verotoxinogenen *E. coli* (VTEC) zählen insbesondere große und kleine Wiederkäuer. Gelegentlich können VTEC jedoch auch bei anderen Haus- und Wildtierspezies isoliert werden. So finden sich in der Literatur Berichte über den vereinzelt Nachweis von *E. coli* O157 bei Pferden, die teilweise auch in Zusammenhang mit Erkrankungsfällen bei Menschen standen. In Bayern wurde ein Sorbit-fermentierender (SF) *E. coli* O157:H<sup>-</sup>-Stamm bei Minipferden isoliert, die als Infektionsquelle für ein HUS-erkranktes Kind vermutet wurden.

Als Krankheitserreger beim Menschen trat solch ein Stamm zum ersten Mal im Jahr 1988 in Erscheinung, wird seitdem jedoch regelmäßig, gerade auch bei schwerwiegenden Krankheitsverläufen wie dem HUS, in Deutschland nachgewiesen. Bislang konnte das Reservoir der SF *E. coli* O157:H<sup>-</sup>-Stämme noch nicht identifiziert werden. Über den Nachweis dieses Klons bei Wiederkäuern liegen nur vereinzelte Berichte vor. Aufgrund seiner besonderen biochemischen Eigenschaften, die ihn von den typischen *E. coli* O157:H7-Varianten unterscheiden, entzieht er sich den gebräuchlichen kulturellen Nachweisverfahren.

In der vorliegenden Arbeit sollte nun das Vorkommen von *E. coli* O157 unter besonderer Berücksichtigung der SF *E. coli* O157:H<sup>-</sup>-Stämme bei der Spezies Pferd untersucht sowie die erhaltenen Isolate phäno- und genotypisch charakterisiert werden.

## 2 LITERATURÜBERSICHT

### 2.1 *Escherichia coli*

#### 2.1.1 Taxonomie

*Escherichia (E.) coli* sind gramnegative, fakultativ anaerobe, sporenlose, Oxidase-negative, Katalase-positive, stäbchenförmige Bakterien mit einer Größe von ca. 1,1-1,5 µm x 2,0-6,0 µm (Breite x Länge). Neben peritrich begeißelten Isolaten treten auch unbewegliche Stämme in Erscheinung; eine Kapselbildung kann ebenfalls meist beobachtet werden. Mit einem Wachstumsoptimum von 37 °C sind sie den mesophilen Bakterien zuzuordnen (HOLT et al., 1994).

Die Erstbeschreibung erfolgte im Jahre 1885 durch den Kinderarzt Dr. Theodor ESCHERICH, welcher diese Bakterienspezies aus dem Stuhl von Säuglingen isolierte und als *Bacterium coli commune* bezeichnete. Ihm zu Ehren wurde dieser Spezies im Jahr 1919 der Dedikationsname *Escherichia coli* verliehen. Unter dem Genus *Escherichia*, der zur Familie der Enterobacteriaceae gehört, sind in der aktuellen neunten Auflage des „Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology“ neben der Typ-Spezies *E. coli* noch die Spezies *E. blattae*, *E. fergusonii*, *E. hermannii* sowie *E. vulneris* aufgeführt (HOLT et al., 1994). Kürzlich wurde noch eine weitere Spezies publiziert, *E. albertii*, welche aus dem Stuhl Diarrhöe-erkrankter Kinder in Bangladesch isoliert werden konnte (HUYS et al., 2003). *E. coli* gilt mittlerweile als der am besten untersuchte Organismus der Welt (FARMER et al., 1985).

Aufgrund der Empfänglichkeit für horizontalen Genaustausch weisen *E. coli* eine große genetische und phänotypische Variabilität auf (KÖHLER et al., 2001). Sie werden gemäß dem modifizierten Kaufmann-Schema nach ihren Oberflächen (O)-, Kapsel (K)- und Geißel (H: von Hauch)-Antigenen in verschiedene Serotypen eingeteilt (Ørskov und Ørskov, 1984).

#### 2.1.2 Epidemiologie und klinische Bedeutung

Als natürliches Habitat von *E. coli* ist der Dickdarm von Menschen und warmblütigen Tieren anzusehen, wobei Meerschweinchen und Chinchillas eine Ausnahme bilden. Mit Keimzahlen von  $10^4$ - $10^9$  KbE/g stellt *E. coli* in der Eubiose max. 1 % der Darmflora und wird somit der Begleitflora zugeordnet (ROLLE und MAYR, 1993).

Diese als Kommensalen in der Darmflora vorkommenden Stämme treten jedoch auch als fakultativ pathogene Krankheitserreger in Erscheinung; sie verursachen unter bestimmten Umständen beispielsweise Harnwegsinfektionen, Septikämien sowie Meningitiden. Davon abzugrenzen sind solche Isolate, die aufgrund ihrer Ausstattung mit bestimmten Virulenzfaktoren als obligat pathogen anzusprechen sind (HAHN et al., 1999); dazu gehören neben den in Kapitel 2.2 abgehandelten intestinalen

Pathovaren auch die uropathogenen (UPEC), nephropathogenen (NPEC) sowie septisch-pathogenen (SPEC) *E. coli* (RKI, 1996b). Insgesamt ist *E. coli* der häufigste Erreger bakterieller Infektionen beim Menschen. 70-80 % der akuten, sowie 40-50 % der chronisch-persistierenden Harnwegsinfektionen werden durch Vertreter dieser Spezies hervorgerufen. Weiterhin findet sich dieser Erreger bei Cholezystitiden, Appendizitiden, Peritonitiden, postoperativen Wundinfektionen, Septikämien sowie Meningitiden; seine Bedeutung im Rahmen von Durchfallerkrankungen wird in Kapitel 2.2 erläutert (KAYSER et al., 2001). Auch im veterinärmedizinischen Bereich spielen *E. coli*-Infektionen eine bedeutende Rolle. Bei Jungtieren treten insbesondere Septikämien, enterotoxische Enteropathien, Dysenterien sowie die Ödemkrankheit der Absatzferkel in Erscheinung. Bei adulten Tieren sind Mastitiden, Harnwegsinfektionen, Pneumonien, Pyometren, Wundinfektionen sowie die Coligranulomatose des Geflügels zu nennen (ROLLE und MAYR, 1993).

### 2.1.3 Bedeutung für die Lebensmittelhygiene

Aufgrund seines Habitats im Darmtrakt von Mensch und Tier gilt *E. coli* in der Lebensmittelhygiene als Indikatororganismus für fäkale Kontamination bzw. für eine unsachgemäße Prozeßführung (REUTER, 1996). Dies hat auch Eingang in zahlreiche Rechtsvorschriften gefunden; so ist beispielsweise Trinkwasser nach der Trinkwasserverordnung (ANONYMOUS, 2001b), Hackfleisch nach der Fleischhygieneverordnung (ANONYMOUS, 2001a) oder Rohmilch- und Weichkäse nach der Milchverordnung (ANONYMOUS, 2000b) auf *E. coli* zu untersuchen. Pathogene *E. coli*-Varianten zählen gleichzeitig zu den sogenannten Indexorganismen, da sie eine gesundheitliche Gefahr für den Verbraucher darstellen können (REUTER, 1996).

## 2.2 Darmpathogene *E. coli*

Neben den bereits in Kapitel 2.1 angesprochenen extraintestinalen Manifestationen von *E. coli*-Infektionen treten insbesondere auch intestinale Krankheitsbilder in Erscheinung, die meist mit Diarrhöe einhergehen. Aufgrund unterschiedlicher Virulenzprofile und damit teilweise einhergehender unterschiedlicher klinischer Symptomatik lassen sich beim Menschen verschiedene Pathovaren unterscheiden, die teilweise auch beim Tier klinische Bedeutung erlangt haben (BEUTIN, 1990; NATARO und KAPER, 1998; RKI, 1996b). Eine entsprechende Auflistung findet sich in Tabelle 1. Darmpathogene *E. coli* sind nach dem Infektionsschutzgesetz (IfSG; ANONYMOUS, 2000a) meldepflichtig.

Bestimmte Serovarietäten treten innerhalb der einzelnen *E. coli*-Pathovaren gehäuft auf (NATARO und KAPER, 1998). Eine zuverlässige Zuordnung ist durch die Serotypie jedoch nicht möglich, so daß mittlerweile die Bestimmung der Virulenzfaktoren als einzig wirklich verlässliche Methode zur Pathovarunterscheidung gilt (RKI, 2002c). Ein Großteil dieser Virulenzgene ist in Pathogenitätsinseln oder auf Plasmiden organisiert (NATARO und KAPER, 1998). Durch Genaustausch dieser mobilen Elemente ist mit der Entstehung neuer Pathovaren zu rechnen (RKI, 2002c).

Tabelle 1: Nomenklatur und Einteilung von humanpathogenen *E. coli*-Stämmen, die enterale Erkrankungen hervorrufen können

Akronym	Bezeichnung	Unterteilung	Virulenzeigenschaften	Erkrankung	
				Mensch	Tier
EPEC	enteropathogene <i>E. coli</i>	class I class II	Haftungsfähigkeit (LEE <sup>1</sup> , EAF-Plasmid <sup>2</sup> ) Haftungsfähigkeit (LEE)	Säuglingsdiarrhöe	Jungtierdurchfall
ETEC	enterotoxische <i>E. coli</i>	LT <sup>+</sup> -Stämme <sup>3</sup> ST <sup>+</sup> -Stämme <sup>4</sup>	Enterotoxine, Kolonisationsfaktoren	Cholera-ähnliche Reisediarrhöe	enterotoxische Enteropathie
EIEC	enteroinvasive <i>E. coli</i>		Invasivität, Enterotoxine	Ruhr-ähnliche Diarrhöe	
VTEC/ STEC	verotoxinogene <i>E. coli</i> Shiga-Toxin-bildende <i>E. coli</i>		Verotoxine/Shiga-Toxine		Kälberdiarrhöe; VT 2e-Stämme <sup>5</sup> ; Ödemkrankheit der Absatzferkel
EHEC	enterohämorrhagische <i>E. coli</i>		Verotoxine/Shiga-Toxine, Haftungsfähigkeit (LEE), (Enterohämolysin)	Diarrhöe, HC <sup>6</sup> , HUS <sup>7</sup> , TTP <sup>8</sup> )	

<sup>1</sup>) locus of enterocyte effacement

<sup>4</sup>) hitzestabiles Enterotoxin

<sup>7</sup>) hämolytisch-urämisches Syndrom

<sup>2</sup>) EPEC adherence factor

<sup>5</sup>) Verotoxin 2e

<sup>8</sup>) thrombotisch-thrombozytopenische Purpura

<sup>3</sup>) hitzelabiles Enterotoxin

<sup>6</sup>) hämorrhagische Colitis

Fortsetzung Tabelle 1: Nomenklatur und Einteilung von humanpathogenen *E. coli*-Stämmen, die enterale Erkrankungen hervorrufen können

Akronym	Bezeichnung	Unterteilung	Virulenzeigenschaften	Erkrankung	
				Mensch	Tier
EAggEC/ EAEC	enteroaggregative <i>E. coli</i>		Enterotoxin (EAST1 <sup>1)</sup> ), Haftungsfähigkeit	persistierende Diarrhöe, Reisediarrhöe	
DAEC	diffus-adhärente <i>E. coli</i>		Adhäsion	infantile Diarrhöe	
NTEC	nekrotische <i>E. coli</i>		CNF 1 <sup>2)</sup>	Diarrhöe, extraintestinale Erkrankungen	Kälberdiarrhöe, -septikämie
CLDTEC	cytolethal distending toxin-producing <i>E. coli</i>		CNF 2	cytolethal distending toxin (CDT I-V <sup>3)</sup> )	(infantile Diarrhöe)
CDEC/ DHEC	diarrhea-associated hemolytic <i>E. coli</i>			( $\alpha$ -Hämolyysin)	(infantile Diarrhöe)

<sup>1)</sup> EAggEC heat stable enterotoxin

<sup>2)</sup> cytotoxic necrotizing factor

<sup>3)</sup> cytolethal distending toxin

### 2.2.1 Enteropathogene *E. coli* (EPEC)

Nach einem Beschluß des „Second International Symposium on EPEC“ werden solche *E. coli*-Stämme als EPEC definiert, welche charakteristische „attaching and effacing“ (A/E)-Läsionen in der Darmschleimhaut hervorrufen und gleichzeitig keine Verotoxine bilden können. Die letztgenannte Einschränkung ist notwendig, da auch Stämme des Pathovars der verotoxinogenen *E. coli* (VTEC) die Fähigkeit zur Ausbildung von A/E-Läsionen besitzen können; das Vorhandensein von Verotoxin-Genen ordnet solche Isolate jedoch *per definitionem* den VTEC zu (siehe Kapitel 2.3). Darüber hinaus können EPEC-Stämme als weiteren Virulenzfaktor das EAF (EPEC adherence factor)-Plasmid beherbergen; diese Isolate werden als „typische EPEC“ oder als „class I“ bezeichnet. Stämme ohne EAF-Plasmid gehören dementsprechend zu den „atypischen EPEC“ bzw. zur „class II“ (NATARO und KAPER, 1998).

Virulenzfaktoren, die für die Ausprägung der A/E-Läsionen verantwortlich zeichnen, sind auf einer Pathogenitätsinsel namens „locus of enterocyte effacement“ (LEE) kodiert (MCDANIEL et al., 1995). Dazu zählen das äußere Membranprotein Intimin, welches durch das „*E. coli* attaching and effacing“ (*eae*)-Gen kodiert wird, der translozierte Intiminrezeptor Tir, Proteine eines Typ III-Sekretionssystems sowie diverse sezernierte Proteine (ELLIOTT et al., 1998b; s. Kapitel 2.4.1.2). Histopathologisch zeichnen sich A/E-Läsionen durch die innige Adhärenz der Bakterienzelle an die Zellmembran der intestinalen Epithelzellen („attaching“) sowie den Verlust der Mikrovilli („effacing“) aus. Unterhalb des adhärenierenden Bakteriums ändert sich die Struktur des Zytoskeletts, die vor allem durch eine massive Anreicherung an polymerisiertem Aktin geprägt ist. Dabei bildet sich eine sockelartige Ausstülpung an der Epithelzelle aus (Moon et al., 1983; NATARO und KAPER, 1998).

Typische EPEC beherbergen weiterhin ein EAF-Plasmid, auf dem das Gen der „bundle forming pili“ (BFP) lokalisiert ist. Diesen Pili wird eine Rolle bei der initialen Adhärenz des Bakteriums an das Darmepithel zugesprochen (NATARO und KAPER, 1998).

In den Industrieländern spielten EPEC-Isolate in den 50er Jahren als Erreger der sogenannten Säuglingsdiarrhöe eine Rolle. Die Bedeutung ist jedoch stark zurückgegangen. Wie der Name andeutet, sind v. a. Kinder unter zwei Jahren betroffen. Erwachsene zeigen nach einer EPEC-Infektion nur ausnahmsweise klinische Symptome. Sporadisch erkranken Erwachsene, die an immunsupprimierenden Grunderkrankungen leiden. Ausbrüche unter Erwachsenen sind selten und vermutlich auf sehr hohe EPEC-Inokula zurückzuführen. In den Entwicklungsländern sind EPEC-Infektionen auch heute noch eine der Hauptursachen für Diarrhöen bei Säuglingen. Die Übertragung der EPEC erfolgt fäkal-oral, über Schmierinfektionen und kontaminierte Lebensmittel. Die Krankheit stellt sich meist als akuter wäßriger Durchfall mit Erbrechen und leichtem Fieber dar, allerdings sind auch protrahierte Verläufe bekannt (NATARO und KAPER, 1998). In Deutschland dominieren die Serotypen O26:H11, O86:H34 sowie O125:H19 (RKI, 1996b). Unter den intestinalen *E. coli*-Pathovaren (exklusive EHEC), deren Nachweis laut § 7 IfSG meldepflichtig ist, stellen die EPEC den größten Anteil. Im Jahr 2003 entfielen 72,5 % aller Meldungen, denen Angaben zum Pathovar beigelegt waren, auf diese Gruppe (RKI, 2004a).

Allerdings beruhen diese Meldungen meist auf Ergebnissen der Serotypie, die lange Zeit als Standardmethode der EPEC-Diagnostik galt (BEUTIN, 1990). Wie bereits geschildert, entspricht dies nicht mehr dem Stand der Wissenschaft, stattdessen ist die Bestimmung von Virulenzfaktoren zur Ermittlung der Pathovarzugehörigkeit zu fordern (RKI, 2002c).

EPEC-Isolate konnten auch bei zahlreichen Haustierspezies nachgewiesen werden, wobei es sich dabei vornehmlich um atypische Serotypen handelt (BEUTIN, 1999; TRABULSI et al., 2002; WANI et al., 2003). Ihre Bedeutung als Krankheitserreger ist jedoch nicht immer klar (ORDEN et al., 2002). Während BEUTIN (1999) von einem deutlichen Zusammenhang zwischen Darmerkrankungen und dem Vorkommen von EPEC-Stämmen bei Hundewelpen berichtet, liegen für die Kälberdiarrhöe widersprüchliche Untersuchungsergebnisse vor (CHINA et al., 1998; HOLLAND et al., 1999; ORDEN et al., 1998; ORDEN et al., 2002). Gut belegt hingegen ist die Bedeutung bestimmter EPEC-Serotypen als Enteritis-Erreger bei Kaninchen; hier sind insbesondere die hochpathogenen Rhamnose-negativen *E. coli* O103:K:H2 Biotyp B14-Stämme zu nennen (BLANCO et al., 1996).

### 2.2.2 Enterotoxinogene *E. coli* (ETEC)

*E. coli*-Stämme, die ein hitzelabiles (LT) und/oder ein hitzestabiles (ST) Enterotoxin exprimieren, werden als ETEC bezeichnet (LEVINE, 1987). Erstere weisen in Struktur und Funktion große Ähnlichkeit mit dem Cholera-toxin von *Vibrio cholerae* auf; die Aminosäuresequenzen sind zu ca. 80 % identisch. Die Plasmid-codierten Enterotoxine bewirken in den Dünndarmepithelzellen eine Reaktionskaskade, aus der nach Aktivierung der Enzyme Adenylat- (LT) bzw. Guanylatcyclase (ST) und Phosphorylierung der in der apikalen Zellmembran lokalisierten Chloridkanäle schlußendlich eine sekretorische Diarrhöe resultiert (NATARO und KAPER, 1998).

Neben der Enterotoxinbildung stellt die Ausprägung von Kolonisationsfaktoren eine wichtige Virulenzeigenschaft dar. Die Adhärenz der ETEC-Zellen an das Dünndarmepithel erfolgt durch Fimbrien. In der Heterogenität der Fimbrien liegt die Spezies-Spezifität dieser Pathogene begründet. Krankheitserreger von Tieren verursachen somit keine menschlichen Erkrankungen und umgekehrt. Die Gene der Kolonisationsfaktoren sind vornehmlich zusammen mit ST- und/oder LT-Genen auf Plasmiden lokalisiert (NATARO und KAPER, 1998).

Klinisch äußert sich diese Infektionskrankheit beim Menschen durch plötzlich einsetzende, Cholera-ähnliche Diarrhöe nach einer kurzen Inkubationszeit von 14 bis 50 Stunden. Fieber und Erbrechen werden selten beobachtet. Betroffen sind vor allem Kleinkinder in Endemiegebieten sowie Reisende. ETEC gelten als Hauptverursacher der sogenannten Reisediarrhöe, 20-40 % der Fälle werden diesem Erreger zugeschrieben. Als Vektor kommen vor allem kontaminierte Lebensmittel sowie Trinkwasser in Betracht (NATARO und KAPER, 1998). Die Krankheit ist vor allem in Ländern mit warmem, feuchtem Klima endemisch. In industrialisierten Ländern mit hohen Hygienestandards wird nur vereinzelt von ETEC-Ausbrüchen berichtet. Unter den im Jahr 2003 nach IfSG gemeldeten *E. coli*-Pathovaren (ohne EHEC) entfielen

3,3 % der Meldungen auf ETEC (RKI, 2004a). Ausbrüche in den USA wurden auf den Verzehr von kontaminiertem Weichkäse, Salat bzw. Krabbencocktail zurückgeführt (CDC, 1984; CDC, 1994; FDA/CFSAN, 2003). Auch in Deutschland wurde Weichkäse als Vektor in einem Ausbruch identifiziert (BEUTIN, 1990). In Deutschland dominieren die Serotypen O78:H12 sowie O8:H37 bei klinischen Erkrankungen des Menschen (RKI, 1996b). Aufgrund der serologischen Vielfalt dieses Pathovars sollte dessen Nachweis jedoch nicht ausschließlich serologisch erfolgen (BEUTIN, 1990).

Bei Jungtieren verursachen ETEC die sogenannte enterotoxische Enteropathie, auch Colidiarrhöe oder Coliruhr genannt. Betroffen sind v. a. neugeborene Kälber, Lämmer und Ferkel. Die infektiöse Faktorenerkrankung äußert sich durch akut einsetzenden, wäßrigen Durchfall, der durch den starken Flüssigkeitsverlust zum Tod führen kann (ROLLE und MAYR, 1993).

### 2.2.3 Enteroinvasive *E. coli* (EIEC)

EIEC-Stämme zeigen sowohl biochemisch als auch genetisch und pathogenetisch eine enge Verwandtschaft zu *Shigella* spp. Pathogenes Prinzip ist wie bei diesen die Invasion der Bakterienzellen in das Kolonepithel. Die Gene der hieran beteiligten Virulenzfaktoren sind auf dem 140 MDa großen Plasmid pInV lokalisiert. Weiterhin wird die Beteiligung von Enterotoxinen an der Pathogenese diskutiert (Beutin, 1990; NATARO und KAPER, 1998).

Klinisch äußern sich EIEC-Infektionen meist in wäßrigen Durchfällen, die jedoch auch Blut- und Schleimbeimengungen aufweisen können. Die Inzidenz in Industrieländern ist gering; unter den im Jahre 2003 nach IfSG gemeldeten *E. coli*-Pathovaren (ohne EHEC) stehen die EIEC mit 0,8 % an dritter Stelle (RKI, 2004a). In Deutschland sind insbesondere die Serotypen O124:H<sup>-</sup>, O148:H<sup>-</sup> sowie O164:H<sup>-</sup> von Bedeutung (RKI, 1996b). Als Vektor werden meist Lebensmittel oder Trinkwasser identifiziert, jedoch treten auch „person-to-person“-Übertragungen auf (NATARO und KAPER, 1998).

### 2.2.4 Verotoxin-bildende *E. coli* (VTEC)/enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC)

Unter den darmpathogenen *E. coli* nimmt das Pathovar der VTEC bzw. EHEC in den Industrienationen eine herausragende Stellung ein (RKI, 1996b; BÜLTE und HECKÖTTER, 1997). BELL bezeichnet diese Erreger gar als eine der größten mikrobiologischen Herausforderungen an die Lebensmittelindustrie seit dem Botulismus (BELL, 2002). Die besondere Bedeutung dieses Pathovars erschließt sich auch aus der Meldepflicht nach § 7 IfSG, wonach „*Escherichia coli*, enterohämorrhagische Stämme (EHEC)“ separat von „*Escherichia coli*, sonstige darmpathogene Stämme“ erfaßt werden (ANONYMOUS, 2000a). Im Jahr 2004 wurden 927 EHEC-Erkrankungen (außer HUS) und 52 HUS-Fälle sowie 5.558 Erkrankungen durch „sonstige darmpathogene *E. coli*“ nach IfSG gemeldet (RKI, 2005). Ein direkter Vergleich der Fallzahlen zwischen den einzelnen Pathovaren ist jedoch auf dieser Basis nicht möglich, da *E. coli*-Fälle häufig ohne Angabe des Pathovars gemeldet werden (RKI, 2002c). Die Besonderheit der VTEC bzw. EHEC liegt jedoch weniger in der Häufigkeit ihres

Nachweises, als vielmehr in der Schwere der von ihnen verursachten Erkrankungen begründet. Im Gegensatz zu den anderen diarrhöischen *E. coli*-Pathovaren fallen VTEC- bzw. EHEC-Infektionen durch extraintestinale Komplikationen auf, die mit einer nicht unerheblichen Letalität einhergehen (RKI, 2001a). Definition und Bedeutung dieses Pathovars wird ausführlich in Kapitel 2.3 beschrieben.

### 2.2.5 Enteroaggregative *E. coli* (EAggEC)

EAggEC (Synonym: EAEC) wurden erstmals im Jahr 1987 von NATARO et al. beschrieben. Sie sind definiert als *E. coli*-Isolate, welche an HEp-2-Zellen das typische Muster einer aggregativen Adhärenz zeigen, ohne jedoch LT oder ST zu bilden. Charakteristisch ist dabei die Ausprägung einer Autoagglutination der Bakterienzellen untereinander, wodurch sie im mikroskopischen Bild an geschichtete Ziegelsteine erinnern (NATARO et al., 1998).

EAggEC stimulieren die Schleimbildung der Darmschleimhaut, so daß sich ein Bakterien-Mucus-Biofilm auf den Enterozyten ausbildet (NATARO et al., 1998). Weiterhin wird die Beteiligung von Zytotoxinen an der Pathogenese diskutiert. Ca. 40 % der EAggEC-Isolate bilden das sogenannte EAST1 (EAggEC heat stable enterotoxin 1), welches auch bei EPEC, ETEC und VTEC gefunden werden kann (SAVARINO et al., 1996; PAIVA DE SOUSA und DUBREUIL, 2001). Die klinische Bedeutsamkeit dieses Virulenzfaktors ist jedoch noch unklar (NATARO und KAPER, 1998), wenngleich die Arbeiten von VILA et al. (1998) sowie ZAMBONI et al. (2004) auf einen Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein von EAST1 und Diarrhöe-Erkrankungen hinweisen. Die Plasmid-codierten Adhäsine AAF/I und AAF/II (aggregative adherence fimbriae) werden nur bei einem geringen Teil der EAggEC-Isolate gefunden (NATARO et al., 1998; PIVA et al., 2003).

Klinisch äußern sich EAggEC-Infektionen sowohl in akuten, als auch in persistierenden wäßrigen Diarrhöen mit Schleim Beimengungen; betroffen sind auch hier überwiegend Kinder (BHAN et al., 1989; HUPPERTZ et al., 1997). Wurden EAggEC-Infektionen zunächst vor allem in Entwicklungsländern in Zusammenhang mit Unterernährung diagnostiziert, werden sie nunmehr auch in Industrienationen nachgewiesen (HUPPERTZ et al., 1997). Sie treten ebenfalls als Erreger der sogenannten Reisediarrhöe in Erscheinung (ADACHI et al., 2001; PABST et al., 2003). Zu erwähnen ist jedoch, daß nicht von allen Untersuchern ein signifikanter Zusammenhang zwischen humanen Erkrankungsfällen und EAggEC-Stämmen aufgezeigt werden konnte (SCALETSKY et al., 2002). Die unter diesem Pathovar zusammengefaßten Isolate sind recht heterogen und vermutlich von unterschiedlicher Virulenz (NATARO et al., 1998; PIVA et al., 2003). In Deutschland entfielen von den 4.705 im Jahre 2003 nach IfSG gemeldeten *E. coli*-Nachweisen (ohne EHEC), denen Angaben zum Pathovar zu entnehmen waren, nur 0,2 % auf diese Gruppe (RKI, 2004a).

Vereinzelt bereitet die Zuordnung von *E. coli*-Isolaten zu den definierten Pathovaren jedoch Schwierigkeiten. So berichteten MORABITO et al. (1998) von *E. coli* O111:H2-Stämmen, welche von Patienten eines HUS-Ausbruchs in Frankreich isoliert werden konnten und sowohl EAggEC-, als auch VTEC-typische Eigenschaften aufwiesen.

Die Stämme zeigten eine aggregative Adhäsion an HEp-2-Zellen, was sie *per definitionem* als EAggEC identifiziert. Zusätzlich ließ sich das EAST1-Gen durch PCR und Hybridisierung nachweisen. Neben diesen beiden typischen EAggEC-Eigenschaften zeigten die Isolate jedoch ein Verotoxinbildungsvermögen, was sie definitionsgemäß den VTEC zuordnet. Weitere VTEC-typische Virulenzfaktoren, wie z. B. das *eae*-Gen oder das Enterohämolysin, konnten nicht nachgewiesen werden. Das klinische Erscheinungsbild wiederum war typisch für EHEC.

### 2.2.6 Diffus-adhärenente *E. coli* (DAEC)

DAEC definieren sich als *E. coli*-Isolate, welche an HEp-2-Zellen eine typische diffuse Adhärenz zeigen. Über Pathogenese und klinische Bedeutung dieses Pathovars ist wenig bekannt. DAEC werden mit wäßrigen Durchfallerkrankungen bei Kindern in Verbindung gebracht (GIRON et al., 1991; NATARO und KAPER, 1998; SCALETSKY et al., 2002). Unter den im Jahre 2003 nach IfSG gemeldeten *E. coli*-Fällen (ohne EHEC), bei denen die Pathovarzugehörigkeit ermittelt wurde, entfielen 0,3 % auf diese Erregergruppe (RKI, 2004a).

### 2.2.7 Nekrotoxische *E. coli* (NTEC)

CAPRIOLI et al. beschrieben 1983 erstmals ein aus *E. coli*-Stämmen isoliertes Toxin, welches sich durch den namensgebenden nekrotisierenden Effekt auf Kaninchenhaut sowie charakteristische Veränderungen in HeLa-Zellkulturen auszeichnete. Anhand unterschiedlicher Ausprägungen dieser induzierten Zellveränderungen lassen sich zwei Typen unterscheiden, CNF 1 und CNF 2 (DE RYCKE et al., 1990).

NTEC treten vor allem bei extraintestinalen Infektionen des Menschen in Erscheinung (CAPRIOLI et al., 1987; DE RYCKE et al., 1999), aber auch über Zusammenhänge mit Diarrhöe-Erkrankungen wird berichtet (BLANCO et al., 1992). Darüber hinaus spielen NTEC als Diarrhöe- und Septikämie-Erreger bei Kälbern eine Rolle, wobei solche Stämme auch häufig bei klinisch gesunden Tieren nachgewiesen werden können (ORDEN et al., 2002). Wiederkäuer gelten insbesondere als Reservoir für CNF 2-positive Stämme, wohingegen CNF 1 typischerweise bei humanen Isolaten gefunden wird (DE RYCKE et al., 1999). Der Nachweis in Lebensmitteln gelingt nur selten (QUINTO und CEPEDA, 1996).

### 2.2.8 Cytolethal distending toxin-producing *E. coli* (CLDTEC)

Seit ihrer Erstbeschreibung durch JOHNSON und LIOR 1987 sind zytolethal distending toxins (CDT) bei verschiedenen gramnegativen, schleimhautassoziierten Bakterien-spezies nachgewiesen worden. Neben *E. coli* sind hier u. a. verschiedene *Campylobacter*- und *Helicobacter*-Spezies, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Haemophilus ducreyi* sowie *Shigella dysenteriae* zu nennen (DE RYCKE und OSWALD, 2001). Namensgebend für diese Toxinfamilie war der charakteristische Effekt auf bestimmte eukaryotische Zellkulturlinien, bei denen unter Vergrößerung der Zellen der Zelltod durch Blockierung des Zellzykluses in der G<sub>2</sub>-Phase eintritt (JOHNSON

und LIOR, 1988; PÉRÈS et al., 1997). Bei *E. coli* sind bislang fünf verschiedene Toxinsubtypen, CDT I bis CDT V, beschrieben worden, welche durch das Gencluster *cdtA*, *cdtB* und *cdtC* codiert werden (s. Tabelle 2).

Tabelle 2: Bei *E. coli* beschriebene cytolethal distending toxin-Varianten

Bezeichnung <sup>1)</sup>	Referenzstamm <sup>2)</sup>	genetische Lokalisation	Quelle
CDT I	E6468/62 (EPEC O86:H34)	Chromosom	SCOTT und KAPER, 1994 <sup>3)</sup>
CDT II	9142-88 (EPEC O128:H <sup>-</sup> )	Chromosom	PICKETT et al., 1994 <sup>3)</sup>
CDT III	1404 (NTEC O78)	Plasmid (pVir)	PÉRÈS et al., 1997
CDT IV	28C (NTEC O75:K95)	keine Angabe	TÓTH et al., 2003a
CDT V	493/89 (SF EHEC O157:H <sup>-</sup> )	Chromosom	JANKA et al., 2003

<sup>1)</sup> CDT: cytolethal distending toxin

<sup>2)</sup> EPEC: enteropathogene *Escherichia coli*

NTEC: nekrotoxische *Escherichia coli*

SF EHEC: Sorbit-fermentierende enterohämorrhagische *Escherichia coli*

<sup>3)</sup> Bezeichnung als CDT I bzw. CDT II gemäß der Reihenfolge ihrer Veröffentlichung durch PÉRÈS et al. (1997)

Aufgrund seiner Sequenzhomologie zu bekannten Phosphodiesterasen wird für CdtB eine DNase I-Aktivität angenommen (DE RYCKE und OSWALD, 2001), während CdtA und CdtC an der Bindung an die Zielzelle beteiligt scheinen (LEE et al, 2003). CDT-positive *E. coli* stellen keine homogene Pathogruppe dar, vielmehr wird dieser Virulenzfaktor auch in unterschiedlichen Kombinationen mit anderen Virulenzfaktoren gefunden, so bei uropathogenen, nekrotoxischen, enteropathogenen und verotoxinogenen *E. coli*-Stämmen (CLARK et al., 2002; PICKETT et al., 2004). CDT-produzierende *E. coli* wurden bei Diarrhöe-erkrankten Kindern nachgewiesen; der konkrete Beweis der Enteropathogenität steht jedoch noch aus (ALBERT et al., 1996; MARQUES et al., 2003).

### 2.2.9 Cell-detaching *E. coli* (CDEC), diarrhea-associated hemolytic *E. coli* (DHEC)

Diese Pathogruppe geht auf eine Publikation von GUNZBURG et al. (1993) zurück. Die Autoren beobachteten bei einigen *E. coli*-Isolaten in Zellkultur die Loslösung des HEp-2-Monolayers; das Vorkommen solcher Stämme war signifikant mit Diarrhöe bei Kindern assoziiert. Andere Untersucher konnten allerdings keinen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Vorkommen dieser Erregergruppe und dem Auftreten von Diarrhöe-erkrankungen feststellen, wohl aber zwischen dem typischen „cell-

detaching“-Phänomen in Zellkultur und dem Vorkommen von  $\alpha$ -Hämolysin (MARQUES et al., 1995). Deshalb wurden diese Isolate später von ELLIOTT et al. (1998a) als „diarrhea-associated hemolytic *E. coli*“ (Akronym: DHEC) bezeichnet. Ein Teil dieser Stämme zeigte zusätzlich CNF 1-Bildungsvermögen (s. Punkt 2.2.7), welches jedoch statistisch nicht signifikant mit Diarrhöe zu assoziieren war. Die Autoren gehen davon aus, daß das  $\alpha$ -Hämolysin einen von mehreren möglichen Virulenzfaktoren dieser potentiellen Enteropathogene darstellt.

Auch hier zeigt sich wieder die Schwierigkeit, *E. coli*-Stämme einem einzelnen Pathovar zuzuordnen. So fanden ABDUCH FÁBREGA et al. (2002) bei Diarrhöe-Isolaten in der Zellkultur zwar das typische „cell-detaching“-Bild vor; diese Stämme wiesen jedoch zusätzlich Virulenzgene diverser anderer Pathovare auf, beispielsweise das Gen des ST-Enterotoxins der ETEC.

## **2.3 Historie, Definition und Nomenklatur der Verotoxin-bildenden *E. coli* (VTEC)**

### **2.3.1 Vero- (VT), Shiga- (Stx) und Shiga-like-Toxine (SLT)**

VTEC sind definiert als *E. coli*-Isolate, welche ein Verotoxinbildungsvermögen aufweisen (BEUTIN, 1989; MELTON-CELSA und O'BRIEN, 1998; NATARO und KAPER, 1998; RKI, 2002c). Diese Nomenklatur beruht auf einer Arbeit von KONOWALCHUK et al. (1977), die bei einigen *E. coli*-Stämmen ein Toxin nachweisen konnten, welches zytotoxisch auf Verozellen wirkt, und das er dementsprechend **Verotoxin** (VT) nannte.

Parallel dazu berichtete eine Arbeitsgruppe um A. D. O'BRIEN von einem Toxin in EPEC-Stämmen, welches große immunologische, biologische und strukturelle Ähnlichkeit zu Shiga-Toxin von *Shigella dysenteriae* Typ 1 aufwies und deswegen als **Shiga-like-Toxin** (SLT) bezeichnet wurde (O'Brien et al., 1977; O'BRIEN et al., 1982; O'BRIEN und LA VECK, 1983). Unter den untersuchten Isolaten befand sich auch ein Stamm, bei dem KONOWALCHUK in der o. e. Studie die Produktion von Verotoxin hatte nachweisen können. Diese Arbeitsgruppe konnte weiterhin zeigen, daß es sich bei Verotoxin und Shiga-like-Toxin um die gleiche Verbindung handelt (O'BRIEN et al., 1983). Auf dem „2<sup>nd</sup> International Symposium and Workshop on ‚Verocytotoxin (Shiga-like toxin)-producing *Escherichia coli* infections‘ “ sprachen sich O'BRIEN et al. dafür aus, diese beiden bestehenden Nomenklaturen Verotoxin (VT) und Shiga-like-Toxin (SLT) als alternative, austauschbare Bezeichnungen beizubehalten (O'BRIEN et al., 1994).

Im Jahr 1996 schlugen CALDERWOOD et al. in einer vielzitierten Veröffentlichung eine Vereinheitlichung dieser bis dato parallel verwendeten Toxinbezeichnungen VT und SLT vor. Gemeinsamkeiten in DNA-Sequenz, Holotoxin-Aufbau, Enzymaktivität, Bindungsfähigkeit sowie diversen biologischen Eigenschaften der Verotoxin-Subtypen von *Escherichia coli* sowie des Shiga-Toxins von *Shigella dysenteriae* 1 recht-

fertigten ihrer Meinung nach die Etablierung einer Toxin-Familie, welche aufgrund der historischen Bedeutung des bereits 1898 entdeckten Shiga-Toxins (O'LOUGHLIN and ROBINS-BROWNE, 2001) nach diesem benannt werden sollte. KARMALI et al. (1996) widersprachen dem Vorschlag der Forschergruppe um CALDERWOOD. Ihrer Meinung nach waren die Toxinbezeichnungen VT und SLT durch langjährigen parallelen Gebrauch und ihre historische Entwicklung bereits so etabliert, daß sie keine Vorteile in einer Umbenennung in **Shiga-Toxin (Stx)** erkennen konnten. Bis heute werden die beiden Nomenklaturen Shiga-Toxin und Verotoxin in der Literatur parallel und synonym verwendet, und die Toxin-produzierenden Bakterien dementsprechend als Shiga-Toxin-bildende *E. coli* (STEC) oder Verotoxin-bildende *E. coli* (VTEC) bezeichnet (ACHESON, 1998; RKI, 2001a). Wie in der Kapitelüberschrift ersichtlich, wird in der vorliegenden Arbeit auf die VT-Nomenklatur zurückgegriffen.

### 2.3.2 Enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC)

Im Gegensatz zu diesen Virulenzfaktor-geprägten Bezeichnungen basiert der Begriff enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC) auf den durch dieses Pathovar verursachten klinischen Erscheinungen. Über die exakte Definition in Abgrenzung zu den Begriffen STEC oder VTEC bestehen kontroverse Ansichten.

LEVINE (1987) bezeichnete solche Stämme als EHEC, welche HC oder HUS verursachen, Verotoxine exprimieren, A/E-Läsionen hervorrufen und ein 60 MDa-Plasmid beherbergen. NATARO und KAPER (1998) unterscheiden „typische EHEC“ wie beispielsweise *E. coli* O157:H7, welche Verotoxine produzieren, A/E-Läsionen verursachen und ein 60 MDa-Plasmid besitzen, von den „atypischen EHEC“, welchen mindestens eins der beiden letztgenannten Merkmale fehlt.

Auf nationaler Ebene vertritt das RKI die Ansicht, der Begriff EHEC sei synonym zu den Begriffen VTEC oder STEC zu gebrauchen. Als „EHEC im engeren Sinne“ werden VTEC aufgefaßt, welche beim Menschen typische Erkrankungsbilder wie Enteritis, HC, HUS oder TTP verursachen können. Da nach Meinung der Autoren bislang jedoch eindeutige Marker zur Differenzierung zwischen VTEC und humanpathogenen EHEC fehlen, bezeichnen sie weiterhin alle vom Menschen isolierten VTEC als EHEC (RKI und BgVV, 2001) bzw. alle VTEC als „potentielle EHEC“ (RKI, 2001a). Dementsprechend kennt das IfSG nur den Begriff EHEC, ohne diesen von den VTEC abzugrenzen (ANONYMOUS, 2000a). In der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG, L 07.18-1, werden EHEC als humanpathogene Untergruppe der STEC bzw. VTEC bezeichnet. Auch diese Autoren empfehlen, aus Sicherheitsgründen alle VTEC/STEC als potentielle EHEC zu betrachten, da noch nicht bekannt sei, welche Eigenschaften einen VTEC/STEC zu einem EHEC machten (AMTLICHE SAMMLUNG [...], 2002b).

Im Widerspruch dazu vertritt BÜLTE die Ansicht, daß die Aussage, jeder VTEC sei ein potentieller EHEC, nicht mehr gerechtfertigt erscheint. Vielmehr bezeichnet er solche VTEC-Stämme, die gleichzeitig im Besitz des *eae*-Gens sind, als potentielle EHEC, da diese aufgrund ihres Virulenzprofils klinische Erscheinungen auszulösen befähigt sein könnten (s. auch Kapitel 2.5.6). Die Bezeichnung „EHEC“ ist seiner Meinung

nach solchen Stämmen vorbehalten, die tatsächlich bereits eine Erkrankung beim Menschen ausgelöst haben, beschränkt sich also auf klinische Isolate (BÜLTE, 2000; BÜLTE, 2001).

Das „Scientific Committee on Veterinary Measures Relating to Public Health“ (SCVPH) verwendet aufgrund der uneinheitlichen Nomenklaturen den Begriff „human pathogenic VTEC (HP-VTEC)“ und empfiehlt die Einführung einer einheitlichen Terminologie als Voraussetzung zur Klärung der epidemiologischen Situation in der EU (SCVPH, 2003).

### 2.3.3 *E. coli* O157

In diesem Zusammenhang ist auch die Verwendung der Bezeichnungen *E. coli* O157 bzw. *E. coli* O157:H7 zu erläutern. Primär nur eine Serogruppe bzw. einen Serotyp benennend, werden diese Formulierungen v. a. im angloamerikanischen Sprachraum häufig anstelle der o. g. Begriffe VTEC, STEC bzw. EHEC gebraucht.

Zurückzuführen ist dies auf die Tatsache, daß die ersten in den 80er Jahren bekanntgewordenen Lebensmittelinfektionsausbrüche dieses Pathovars in den USA, Kanada und dem Vereinigten Königreich diesem Serotyp angehörten (RILEY et al., 1983; CARTER et al., 1987; MORGAN et al., 1988). Mittlerweile wurde jedoch bei über 250 unterschiedlichen Serotypen Verotoxinbildungsvermögen nachgewiesen, wovon über 100 in Zusammenhang mit Erkrankungen beim Menschen standen (BETTELHEIM, 2004). Dabei ist die klinische Bedeutung der non-O157-VTEC regional unterschiedlich ausgeprägt, insbesondere im nordamerikanischen Raum scheint *E. coli* O157:H7 zu dominieren (WHO, 1997; WHO, 1998; LOCKING et al., 2003). In Deutschland entfielen im Jahr 2003 78 % der nach IfSG gemeldeten EHEC-Fälle (ohne HUS) sowie 12 % der HUS-Meldungen, denen Angaben zur Serogruppe beigefügt waren, auf non-O157-VTEC (RKI, 2004a; s. Kapitel 2.5.6.1).

Wenngleich *E. coli* O157:H7 weltweit häufiger mit schwerwiegenden Krankheitsverläufen assoziiert ist als non-O157-VTEC (KARCH et al., 1997; TARR et al., 1997; BEUTIN et al., 1998; RKI, 2003b), so ist aufgrund der epidemiologischen Datenlage eine ausschließliche Konzentrierung auf diesen Serotyp nicht vorteilhaft. *E. coli* O157:H7 stellt vielmehr nur den „Prototyp“ der heterogenen EHEC-Gruppe dar (BÜLTE und HECKÖTTER, 1997). Darüber hinaus weisen nicht alle *E. coli* O157-Stämme Verotoxinbildungsvermögen auf, wie auch in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte. Aus diesem Grund sieht der im EHEC-Merkblatt für Ärzte vom RKI und damaligen BgVV empfohlene Stufenplan die Shigatoxinogenität als Leitmerkmal der Nachweismethodik vor (FRUTH et al., 2000; RKI und BgVV, 2001). Auch international wird zunehmend die Einbeziehung der non-O157-VTEC sowohl in Labor Diagnostik und Surveillance, als auch in die Lebensmitteluntersuchung gefordert (WHO, 1998; ACHESON, 2000; EKLUND et al., 2001; BETTELHEIM und BEUTIN, 2003; SCVPH, 2003).

## **2.4 Virulenzeigenschaften der VTEC**

### **2.4.1 Verotoxine**

Bei VTEC konnten bislang eine Vielzahl möglicher Virulenzfaktoren identifiziert werden, deren pathogenetische und klinische Bedeutung im Einzelnen oftmals noch unklar ist (LAW, 2000). Allgemein wird jedoch das namensgebende Verotoxin als Hauptvirulenzfaktor angesehen (PRAGER et al., 1998), welcher diesem Pathovar ja *per definitionem* zugrunde liegt. Die unterschiedlichen Nomenklaturen dieses Zytotoxins wurden bereits in Abschnitt 2.3.1 erläutert.

#### **2.4.1.1 Einteilung**

Verotoxine bilden zusammen mit dem Shiga-Toxin von *Shigella dysenteriae* Typ 1 eine Toxinfamilie, deren Charakteristika in Tabelle 3 zusammengefaßt sind.

Tabelle 3: Charakteristika der Verotoxin- bzw. Shiga-Toxin-Familie (modifiziert nach CALDERWOOD et al., 1996; MELTON-CELSA und O'BRIEN, 1998)

Operon-Struktur	Gen der A-Untereinheit unmittelbar proximal des Gens der B-Untereinheit
Stöchiometrie	Holotoxin besteht aus einer A- und fünf B-Untereinheiten
Bindungseigenschaften	spezifische Bindung an Glykolipid-Rezeptoren eukaryotischer Zellmembranen (Gb <sub>3</sub> bzw. Gb <sub>4</sub> )
enzymatische Aktivität der A-Untereinheit	RNA-N-Glycosidase: Abspaltung eines Adenin-Restes der 28S rRNA in 60S-Ribosomen
biologische Eigenschaften	zytotoxisch für Vero- und HeLa-Zellen

Aufgrund fehlender serologischer Kreuzneutralisierung lassen sich die beiden Haupttypen VT 1 und VT 2 unterscheiden (SCOTLAND et al., 1985; STROCKBINE et al., 1986). Ersteres wird auch durch gegen Shiga-Toxin von *Shigella dysenteriae* Typ 1 gerichtete Antiseren neutralisiert, da diese beiden Toxine nahezu identisch sind. Lediglich in einigen Fällen konnte ein Sequenzunterschied von einer Aminosäure nachgewiesen werden (STROCKBINE et al., 1988). Die Übereinstimmungsrate zu VT 2 beträgt hingegen nur ca. 56 % (JACKSON et al., 1987b).

Beide Haupttypen können wiederum aufgrund unterschiedlicher biologischer Aktivität, serologischer Reaktivität oder Rezeptorbindung in weitere Subtypen bzw. Varianten unterteilt werden (CALDERWOOD et al., 1996). Während die Variabilität der VT 2-Gruppe bereits seit vielen Jahren bekannt ist (WEINSTEIN et al., 1988; Ito et al., 1990; Schmitt et al., 1991; s. Tabelle 5), galt VT 1 lange Zeit als vergleichsweise homogen (MELTON-CELSA und O'BRIEN, 1998). Mittlerweile wurden jedoch auch hiervon Subtypen identifiziert und definiert (PATON et al., 1995; ZHANG et al., 2002c; BÜRK et al., 2003; s. Tabelle 4).

Tabelle 4: Prominente VT 1-Varianten (vereinheitlichte Nomenklatur)

Toxin-Variante	Referenzstamm	Nukleotidsequenz-homologie zu vtx 1		Quelle	Bemerkungen
		A <sup>1)</sup>	B <sup>1)</sup>		
VT 1 <sup>2)</sup>	H19 C600 (933J)	100 %	100 %	SCOTLAND et al., 1985 STROCKBINE et al., 1986	
VT 1c	3115/97, 4756/98, 295/00		95 %	ZHANG et al., 2002c	identisch mit VT 1-OX3 nach PATON et al., 1995
VT 1d	MHI 813		91 %	BÜRK et al., 2003	Amisosäuresequenz identisch mit VT 1v51 und VT 1v52 nach OHMURA-HOSHINO et al., 2003
VT 1v51, VT 1v52	92-1251, 92-1252	k. A. [94 % AS] <sup>3)</sup>	k. A. [92 % AS] <sup>3)</sup>	OHMURA-HOSHINO et al., 2003	Amisosäuresequenz von VT 1v51 und VT 1v52 identisch; identisch mit VT 1d nach BÜRK et al., 2003
VT1-Variante mit IS1203v(1)	2000-182	k. A.	k. A.	SUZUKI et al., 2004	IS1203-ähnliches Element in A-Untereinheit

<sup>1)</sup> Sequenzen, die für die A- bzw. B-Untereinheit codieren

<sup>2)</sup> Verotoxin (VT)-Nomenklatur einheitlich angewandt; ursprüngliche Publikation teilweise als Shiga-Toxin (Stx) oder Shiga-like-Toxin (SLT)

<sup>3)</sup> k. A.: keine Angabe; % AS: Aminosäuresequenz-Homologie

Tabelle 5: Prominente VT 2-Varianten (vereinheitlichte Nomenklatur)

Toxin-Variante	Referenzstamm	Nukleotidsequenzhomologie zu vtx 2		Quelle	Bemerkungen
		A <sup>1)</sup>	B <sup>1)</sup>		
VT 2 <sup>2)</sup>	C600 (933W)	100,0 %	100,0 %	STROCKBINE et al., 1986	
VT 2vh (VT 2vh-a, VT 2vh-b)	B2F1	98,6 % <sup>3)</sup>	95,5 % <sup>3)</sup>	ITO et al., 1990	Reklassifizierung zu VT 2c nach WHO, 1991; Umbenennung in VT2 d (VT 2d1, VT 2d2) nach MELTON-CELSA et al., 1998
VT 2vh-c	7279	99 %	95 %	MEYER et al. 1992	
VT 2va	H.I.8	69,5 %	78,1 %	GANNON et al., 1990	Vorschlag von SCHMIDT et al., 2000: Reklassifizierung in VT 2f
VT 2c	E32511	99,7 %	95,2 %	SCHMITT et al., 1991	Miteinbeziehung von VT 2vh-a und VT 2vh-b gemäß WHO, 1991
VT 2e	S1191	94 %	79 %	WEINSTEIN et al., 1988	ursprünglich VT 2v

<sup>1)</sup> Sequenzen, die für die A- bzw. B-Untereinheit codieren

<sup>2)</sup> Verotoxin (VT)-Nomenklatur einheitlich angewandt; ursprüngliche Publikation teilweise als Shiga-Toxin (Stx) oder Shiga-like-Toxin (SLT)

<sup>3)</sup> bezogen auf VT 2vh-a

Fortsetzung Tabelle 5: Prominente VT 2-Varianten (vereinheitlichte Nomenklatur)

Toxin-Variante	Referenzstamm	Nukleotidsequenzhomologie zu vtx 2		Quelle	Bemerkungen
		A <sup>1)</sup>	B <sup>1)</sup>		
VT 2d <sup>2)</sup> (VT 2d1, VT 2d2)	B2F1	[siehe bei VT 2vh]		MELTON-CELSA et al., 1998	nicht identisch mit VT 2d nach PIÉRARD et al., 1998; identisch mit VT 2vh (VT 2vh-a, VT 2vh-b) nach ITO et al., 1990
VT 2d (VT 2d-Ount, VT 2d-O111, VT 2d-OX3a)	EH250	94,9 % <sup>3)</sup>	86,6 % <sup>3)</sup>	PIÉRARD et al., 1998	nicht identisch mit VT 2d nach MELTON-CELSA et al., 1998; Miteinbeziehung von VT 2-OX3a und VT 2-O111 nach PATON et al., 1992 und PATON et al., 1993
VT 2f	T4/97	63,4 %	75,4 % <sup>4)</sup>	SCHMIDT et al., 2000	Miteinbeziehung von VT 2a
VT 2g	7v	k. A. <sup>5)</sup> [63,0-94,9 %] <sup>6)</sup>	k. A. [76,7-90,7 %] <sup>6)</sup>	LEUNG et al., 2003	
VT 2-NV206	NV206	k. A. [94,5-99,0 %] <sup>6)</sup>	k. A. [81,5-96,0 %] <sup>6)</sup>	BERTIN et al., 2001	

1) Sequenzen, die für die A- bzw. B-Untereinheit codieren

2) Verotoxin (VT)-Nomenklatur einheitlich angewandt; ursprüngliche Publikation teilweise als Shiga-Toxin (Stx) oder Shiga-like-Toxin (SLT)

3) nach FRIEDRICH et al., 2002

4) nach FRIEDRICH et al., 2002; Angabe nach SCHMIDT et al., 2000: 57,4 %

5) keine Angabe

6) bezogen auf VT 2 und VT 2-Varianten

### 2.4.1.2 Verotoxin-Varianten

Die Unterteilung der Verotoxin-Familie in Subtypen und Varianten erfüllt nicht nur akademische Zwecke, sondern spiegelt auch Unterschiede in Epidemiologie und klinischer Bedeutung wider. Die Bestimmung des Verotoxintyps kann somit zur Abschätzung des Komplikationsrisikos beitragen (FRIEDRICH et al., 2002), aber auch die Identifizierung der Infektionsquelle erleichtern und einen Beitrag zur Genotypisierung von Stämmen leisten (ZHANG et al., 2002c).

**VT 1** wird im Vergleich zu VT 2 allgemein eine geringere Virulenz bescheinigt, da es relativ häufiger bei Enteritiden nachgewiesen wird als bei HUS (BOCKEMÜHL et al., 1997; FRUTH et al., 2002; s. auch Kapitel 2.5.6.2). Prinzipiell sind VT 1-positive Isolate in unterschiedlichen Habitaten nachweisbar; sie finden sich sowohl bei erkrankten als auch bei gesunden Menschen, bei Wiederkäuern und in Lebensmitteln (BÜLTE, 2001). VT 1 galt lange Zeit als vergleichsweise homogen. 1995 berichteten PATON et al. von VT 1-Varianten dreier Stämme, die sich jeweils in zwei Aminosäuren in der A-Untereinheit von VT 1 unterschieden; die B-Untereinheiten waren identisch.

In dieser Arbeit berichteten PATON et al. (1995) auch von einer VT 1-OX3-Variante, welche später von ZHANG et al. (2002c) gemäß den o. e. Nomenklatur-Empfehlungen von CALDERWOOD et al. (1996) in **VT 1c** umbenannt wurde. Dieser Toxin-Subtyp wird bei einer Vielzahl unterschiedlicher Serotypen gefunden, jedoch nicht bei der Serogruppe O157 (FRIEDRICH et al., 2003). Während VTEC allgemein ihr Reservoir sowohl bei großen als auch bei kleinen Wiederkäuern haben, scheint das Hauptreservoir der VT 1c-Isolate bei Schafen zu liegen, wohingegen sie nur vergleichsweise selten bei Rindern und Ziegen nachgewiesen werden können (KOCH et al., 2001; ZHANG et al., 2002c; BRETT et al., 2003). Auch bei humanen Isolaten ist VT 1c zu finden, vornehmlich bei milden Erkrankungsverläufen und symptomlosen Ausscheidern. Von HUS-Patienten werden sie nur ausnahmsweise nachgewiesen; in bislang aufgetretenen Fällen lag meist parallel eine Infektion mit VT 2-positiven VTEC vor, die als virulenter gelten und häufiger mit HUS assoziiert sind (KOCH et al., 2001; ZHANG et al., 2002c; BRETT et al., 2003; FRIEDRICH et al., 2003). VT 1c tritt häufig vergesellschaftet mit VT 2d auf, wird jedoch nur ausgesprochen selten zusammen mit dem *eae*-Gen nachgewiesen (KOCH et al., 2001; ZHANG et al., 2002c; BRETT et al., 2003; FRIEDRICH et al., 2003; BEUTIN et al., 2004). Als mögliche Adhäsionsfaktoren treten bei humanen Stämmen vielmehr das *saa*-Gen (96,1 %) sowie das *iha*-Homolog der Pathogenitätsinsel LPA (65,8 %) in Erscheinung. Desweiteren können sie das Enterohämolysin-Gen (81,6 %) sowie die Pathogenitätsinsel HPI (21,1 %) beherbergen (s. Kapitel 2.4.2.2). Es ist bislang unklar, ob die vergleichsweise geringe Virulenz der VT 1c-Isolate auf spezifischen Eigenschaften des Toxintyps beruht oder durch das Fehlen des *eae*-Gens zu erklären ist, welches häufig mit schwereren Krankheitsverläufen assoziiert ist. Der Nachweis von VT 1c kann möglicherweise als Marker für mildere Erkrankungsformen dienen (FRIEDRICH et al., 2003).

**VT 1d** wurde kürzlich von BÜRK et al. (2003) beschrieben. Diese Toxin-Variante stammt aus einem bovinen *E. coli* ONT:H19-Isolat und zeigt Gemeinsamkeiten mit der VT 1c (92 % Nukleotidsequenz-Homologie zu VT 1c, 91 % Nukleotidsequenz-Homologie zu VT 1); die Autoren vermuten, daß sich beide Varianten aus einer ge-

meinsamen Vorläuferzelle entwickelt haben. Über Vorkommen und klinische Bedeutung dieser Variante ist noch nichts bekannt.

Im gleichen Jahr wurden die Toxin-Varianten **VT 1v51** und **VT 1v52** beschrieben. Die hierfür codierenden Gene differieren um zwei Basenpaare, die abgeleiteten Aminosäuresequenzen sind jedoch identisch und entsprechen der Aminosäuresequenz von VT 1d nach BÜRK et al. (2003). VT 1v51 und VT 1v52 wurden in bovinen Isolaten identifiziert. Die Stämme beherbergten das Enterohämolysin-Gen, jedoch nicht das *eae*-Gen. Auch hier liegen noch keine Erkenntnisse zu Verbreitung und klinischer Bedeutung vor (OHMURA-HOSHINO et al., 2003).

**VT 2** wird häufig bei klinischen Isolaten nachgewiesen, es ist insbesondere mit schweren Verlaufsformen wie dem HUS signifikant assoziiert (BOCKEMÜHL et al., 1997; BOERLIN et al., 1999; EKLUND et al., 2002; FRIEDRICH et al., 2002). Aber auch in Lebensmittel- sowie bovinen Isolaten ist dieser Toxin-Typ regelmäßig anzutreffen (BÜLTE, 2001).

1990 identifizierten ITO et al. in einem HUS-Isolat des Serotyps O91:H21 zwei Verotoxin-Genvarianten, deren DNA-Sequenzen zu 99 % identisch waren, sich aber deutlich von der VT 2-Genesequenz unterschieden (98,6 % bzw. 95,5 % Sequenz-Homologie in den A- bzw. B-Untereinheit-codierenden Genabschnitten, bezogen auf VT 2vh-a). In Abgrenzung zu der bis dato bekannten porcinen Variante VT 2e, die damals noch als VT 2v bezeichnet wurde, benannten die Autoren diese neue Variante aufgrund ihres humanen Ursprungs **VT 2vh**, die beiden Untertypen als VT 2vh-a und VT 2vh-b bzw. VT 2ha und VT 2hb.

Ein Jahr später konnten SCHMITT et al. (1991) auch im Stamm E32511 das Vorliegen zweier unterschiedlicher VT 2-Genkopien nachweisen. Dieses Isolat hatte in verschiedenen Untersuchungen widersprüchliche Ergebnisse gezeigt, was im nachhinein durch das Vorhandensein der zwei unterschiedlichen Toxintypen zu erklären war. Diese neuartige Toxinvariante, welche von den Autoren **VT 2c** genannt wurde, zeigte eine hohe Ähnlichkeit zu VT 2vh-a nach ITO et al. (1990) (99,1 % Aminosäuresequenz-Homologie zwischen den A-Untereinheiten, identische B-Untereinheiten). Aus diesem Grund wurde vorgeschlagen, die Varianten von VT 2vh unter dem neuen Toxintyp VT 2c zu subsumieren (WHO, 1991). VT 2c zeigt eine ähnliche Verbreitung wie VT 2, mit dem es auch oft in Kombination auftritt. Ebenso wie dieses wird es v. a. in Zusammenhang mit schweren Erkrankungsformen wie HUS, aber auch in anderen klinischen Isolaten sowie Lebensmitteln und bovinen Stämmen nachgewiesen (BÜLTE, 2001; EKLUND et al., 2002; FRIEDRICH et al., 2002).

Die Bezeichnung **VT 2d** wurde von verschiedenen Autoren für unterschiedliche VT-Varianten gewählt, weshalb zur Klarstellung oftmals der Serotyp des Stammes, in dem die Toxin-Variante zum ersten Mal identifiziert wurde, angehängt wird.

PIÉRARD et al. (1998) identifizierten in einem *E. coli* Ount:H12-Stamm, der von einem 9-jährigen Mädchen mit Abdominalkrämpfen isoliert worden war, einen neuartigen Toxintyp. Aufgrund des hohen Verwandtschaftsgrades zu zwei Toxin-Varianten, die zuvor von PATON et al. (1992, 1993) beschrieben worden waren (96,9 % bis 99,9 %

Homologie in den für die A-Untereinheit bzw. 99,6 % bis 100 % in den für die B-Untereinheit codierenden Gensequenzen), wählten die Autoren für die gesamte Gruppe die Bezeichnung VT 2d, welche die Toxintypen **VT 2d-Ount**, **VT 2d-OX3a** sowie **VT 2d-O111** mit einschließt. PIÉRARD et al. (1998) untersuchten weiterhin das Vorkommen dieser neuen Toxin-Variante. In 18,1 % der 359 aus menschlichen Stuhlproben, tierischen Fäzes und Fleisch isolierten VTEC konnte VT 2d nachgewiesen werden, teilweise in Kombination mit VT 1. Keines dieser VT 2d-positiven Isolate gehörte der Serogruppe O157 an, bei keinem war das *eae*-Gen nachweisbar, 34 % zeigten aber einen enterohämolytischen Phänotyp. Die Autoren schlußfolgerten, daß VT 2d-VTEC eventuell als weniger virulent für den Menschen anzusehen seien, da keines dieser Isolate mit HUS assoziiert war und sich auch eine negative Assoziation mit klinischer Symptomatik insgesamt abzeichnete. Zu ähnlichen Ergebnissen kommen auch RAMACHANDRAN et al. (2001) sowie FRIEDRICH et al. (2002); letztere konnten bei 21,9 % der Isolate von asymptomatischen Ausscheidern und 15,6 % der Isolate von Diarrhöe-Patienten, nicht jedoch bei HUS-Patienten VT 2d nachweisen. In beiden Untersuchungen waren VT 2d-VTEC stets *eae*-negativ, ebenso in der Studie von BEUTIN et al. (2004). RAMACHANDRAN et al. (2001) konnten allerdings in 96,6 % ihrer Isolate das Enterohämolysin-Gen nachweisen, desweiteren stammten zwei ihrer Isolate von HUS-Patienten. Bemerkenswert war auch die Tatsache, daß sie bei 96,6 % der 146 untersuchten Isolate ovinen Ursprungs VT 2d nachweisen konnten. Ähnliche Ergebnisse erzielten auch GOBIUS et al. (2003), die bei 80,9 % der 141 untersuchten Isolate aus Schaf-Fäzes bzw. Lammfleisch VT 2d fanden. Ebenso wie bei VT 1c ist auch bei VT 2d noch unklar, inwieweit die vergleichsweise geringe Virulenz tatsächlich auf einer geringeren Toxizität dieser Variante beruht oder durch das Fehlen weiterer Virulenzfaktoren wie dem *eae*-Gen bedingt ist (PIÉRARD et al., 1998). Möglicherweise spielt auch die Altersstruktur der betroffenen Patienten eine Rolle, denn der Altersmedian bei Infektionen mit VT 2d-positiven VTEC lag in der Untersuchung von FRIEDRICH et al. (2002) bei 38,5 Jahren im Vergleich zu 3 bzw. 3,5 Jahren bei Patienten mit VT 2- bzw. VT 2c-positiven VTEC-Infektionen.

Verkompliziert wird die Toxin-Nomenklatur durch die Tatsache, daß im selben Jahr wie PIÉRARD et al. (1998) auch MELTON-CELSA et al. (1998) die Bezeichnung VT 2d einführen, allerdings für eine andere Toxin-Variante. Dabei handelte es sich um die ursprünglich von ITO et al. (1990) im Stamm B2F1 identifizierte Variante VT 2vh mit den Subtypen VT 2vh-a und VT 2vh-b, welche von MELTON-CELSA et al. (1998) in **VT 2d1** und **VT 2d2** umbenannt wurden. Hintergrund war die Beobachtung, daß dieser Stamm bei oral infizierten Streptomycin-behandelten Mäusen eine LD<sub>50</sub> von < 10 KbE aufwies, wohingegen die LD<sub>50</sub> für Stamm E32511 (Referenzstamm für VT 2c nach SCHMITT et al., 1991) bei ca. 10<sup>10</sup> KbE lag (LINDGREN et al., 1993). Aufgrund dieses auffälligen Unterschiedes unterstützten MELTON-CELSA et al. (1996) nicht die Integration der Toxinbezeichnung VT 2vh nach ITO et al. (1990) in VT 2c nach SCHMITT et al. (1991), sondern führten sie weiterhin als separate Variante, allerdings eben unter der Bezeichnung VT 2d. Die höhere Virulenz dieses Toxintyps im Mausmodell läßt sich auch *in vitro* darstellen: Inkubation des Toxins mit humanem oder murinem Darm-Mukus steigert die Zytotoxizität für Verozellen um den Faktor 10 bis 1.000, was als Aktivierung bezeichnet wird (MELTON-CELSA et al., 1996). Als Akti-

vator wurde Maus-Elastase identifiziert, welche starke Ähnlichkeit zur humanen Elastase IIB aufweist (KOKAI-KUN et al., 2000). Elastase spaltet das A<sub>2</sub>-Fragment des VT-Moleküls (s. Abschnitt „Struktur und Wirkungsweise“) zwischen Position 295 und 296, wodurch sich das Fragment um zwei Aminosäuren verkürzt und der aktivierte Phänotyp entsteht. Auch die B-Untereinheiten sind an diesem Prozeß beteiligt, ihre genaue Funktion ist jedoch noch unklar (MELTON-CELSA et al., 2002). Als aktivierbar zeigen sich solche Verotoxin-Varianten, welche an Position 291 Serin und/oder an Position 297 Glutaminsäure beinhalten. Dies scheint eine notwendige, jedoch keine hinreichende Bedingung zu sein, da beispielsweise auch VT 2e diese Sequenz aufweist, aber genauso wenig aktivierbar ist wie VT 2, VT 2c oder VT 1 (MELTON-CELSA et al., 1996). Während die VT 2d-Variante nach PIÉRARD et al. (1998) bevorzugt bei ovinen Isolaten zu finden ist, treten die VT 2d1- und VT 2d2-Varianten nach MELTON-CELSA et al. (1998), auch als VT 2d-activatable bezeichnet, v. a. bei Isolaten bovinen Ursprungs in Erscheinung. Die Nachweisraten in Isolaten aus Fleisch und Fäzes betragen zwischen 25 % und 44 % (GOBIUS et al., 2003). Innerhalb der *vtx* 2d-positiven Stämme wurden auch sogenannte „non-secretors“ entdeckt, welche zwar das intakte Gen beherbergen, bei denen jedoch mit phänotypischen Nachweismethoden wie EIA, Immunoblot und Zellkultur, auch nach Stimulation durch „enhancer“-Substanzen wie Mitomycin C, keine Verotoxinproduktion nachweisbar war (ZHANG et al., 2005).

**VT 2e** ist der am längsten bekannte VT-Subtyp. Ursprünglich als VT 2v oder auch VT 2vp bezeichnet, nimmt er in mehrerer Hinsicht eine Sonderstellung unter den VT-Varianten ein. VT 2e-positive VTEC treten als Erreger der Ödemkrankheit der Absatzferkel in Erscheinung (WEINSTEIN et al., 1988). Während lange Zeit vermutet wurde, daß diese Variante im Gegensatz zu anderen Verotoxinen nicht über Phagen, sondern chromosomal codiert sei, konnte jetzt eine Assoziation zu Phagen-Sequenzen nachgewiesen werden (MUNIESA et al., 2000; s. Abschnitt „Genetische Organisation“). Auch die Rezeptorbindungsfähigkeit unterscheidet diese Variante von den anderen, denn sie bindet bevorzugt an Gb<sub>4</sub> anstelle von Gb<sub>3</sub> (DEGRANDIS et al., 1989; KEUSCH et al., 1995). Inwieweit VT 2e-positive VTEC tatsächlich als Krankheitserreger beim Menschen eine Rolle spielen, ist noch fraglich. Zwar konnten solche Stämme von Diarrhöe-Patienten isoliert werden, sie sind jedoch auch bei symptomlosen Ausscheidern nachweisbar (FRUTH et al., 2002; FRIEDRICH et al., 2002). Bei HUS-Fällen treten sie nur ausnahmsweise in Erscheinung (THOMAS et al., 1994). Auch bei Stämmen mit *vtx* 2e-Gen traten die bei *vtx* 2d beschriebenen „non-secretors“ auf (ZHANG et al., 2005).

Im Jahr 2000 berichteten SCHMIDT et al. über eine neuartige VT-Variante, die sie aus Taubenfäzes isolieren konnten und **VT 2f** nannten. Da sich die Aminosäuresequenz lediglich an zwei Stellen in der A-Untereinheit von der von GANNON et al. (1990) beschriebenen Variante VT 2va unterscheidet, schlugen die Autoren eine Umbenennung in VT 2f vor. Tauben scheinen das natürliche Reservoir für VT 2f-positive VTEC darzustellen, denn solche Stämme können regelmäßig bei diesen Vögeln nachgewiesen werden, wobei die Tiere keine Krankheitssymptome zeigen. Häufig ist diese Toxin-Variante mit dem *eae*-Gen vergesellschaftet (SCHMIDT et al., 2000; MORABITO et al., 2001; GROSSMANN, 2002). Abgesehen von VT 2va-Referenzstamm H.I.8 traten solche Isolate jedoch noch nicht als Krankheitserreger beim Menschen in Erscheinung (FRUTH et al., 2002; FRIEDRICH et al., 2002).

**VT 2g** wurde kürzlich von LEUNG et al. (2003) beschrieben. Diese Variante stammt aus einem bovinen *E. coli* O2:H25-Isolat und weist eine hohe DNA-Sequenz-Homologie zu VT 2 und VT 2c auf. Es ist nicht durch Darm-Mucus aktivierbar. 3 von 409 (0,7 %) getesteten bovinen VTEC-Stämmen aus Hong Kong zeigten sich VT 2g-positiv. Weitere Daten liegen zu diesem Toxintyp noch nicht vor.

#### 2.4.1.3 Struktur und Wirkungsweise

Das Holotoxin besteht aus einer enzymatisch aktiven A-Untereinheit von ca. 32 kDa sowie fünf ringförmig angeordneten B-Untereinheiten, die an der Rezeptorbindung beteiligt und je ca. 7,7 kDa groß sind (JACKSON et al., 1987a; O'BRIEN und HOLMES, 1987; STROCKBINE et al., 1988; JAMES et al., 2003; FRASER et al., 2004). Soweit bekannt, binden die meisten Vertreter der Verotoxine an Globotriosylceramid (Gb<sub>3</sub>), einem Glykolipid-Rezeptor auf der Oberfläche eukaryotischer Zellen (LINGWOOD et al., 1987). Eine Ausnahme hiervon bildet die Variante VT 2e, welche hauptsächlich an Globotetraosyl (Gb<sub>4</sub>) bindet (DEGRANDIS et al., 1989).

Die Aufnahme des Toxins in die Zielzellen erfolgt durch Rezeptor-vermittelte Endozytose. Während des retrograden Transports über Golgi-Apparat und endoplasmatischem Reticulum zum Zytosol wird die A-Untereinheit durch die membrangebundene Protease Furin in das 27 kDa große N-terminale A<sub>1</sub>-Fragment und das 4 kDa große C-terminale A<sub>2</sub>-Fragment gespalten, welche zunächst noch über eine Disulfidbrücke verbunden bleiben (GARRED et al., 1995; SANDVIG und VAN DEURS, 1996). Nach Reduktion dieser Verbindung wird schließlich das katalytisch aktive A<sub>1</sub>-Fragment freigesetzt, welches RNA-N-Glykosidase-Aktivität besitzt und eine spezifische N-glykosidische Bindung in der 28S rRNA spaltet. Durch diesen bereits vom Pflanzentoxin Ricin her bekannten Mechanismus kommt die Proteinbiosynthese zum Erliegen, was schließlich zum Tod der Zelle führt (ENDO et al., 1988; PATON und PATON, 1998).

#### 2.4.1.4 Genetische Organisation

Bereits kurz nach Entdeckung dieser neuen Pathogruppe konnte gezeigt werden, daß die Gene von VT 1 und VT 2 auf temperenten lambdoiden Phagen lokalisiert sind (SCOTLAND et al., 1983; SMITH et al., 1983). Dieser Nachweis gelang sukzessive auch für die Verotoxin-Varianten VT 1c, VT 2c, aktivierbares VT 2d1 und VT 2f (UNKMEIR und SCHMIDT, 2000; KOCH et al., 2001; TEEL et al., 2002). Eine Ausnahme hiervon bildete die Variante VT 2e, bei der eine chromosomale Codierung angenommen wurde (WEINSTEIN et al., 1988), ebenso wie für das Shiga-Toxin von *Shigella dysenteriae* Typ 1 (O'BRIEN und HOLMES, 1987; McDONOUGH und BUTTERTON, 1999). Mittlerweile konnte jedoch auch für diese beiden Toxintypen eine Verbindung zu Phagensequenzen nachgewiesen werden (MUNIESA et al., 2000; UNKMEIR und SCHMIDT, 2000). Aufgrund ihrer Untersuchungen an verschiedenen VT-Varianten vertreten die letztgenannten Autoren die Hypothese, daß Shiga- bzw. Verotoxin-Gene generell als Phagen-assoziiert anzusehen sind. Dabei muß es sich aber nicht notwendigerweise um intakte, infektiöse Phagen handeln. Für Shiga-Toxin von *Shigella dysenteriae* Typ 1 beispielsweise wird vermutet, daß ein ursprünglich vorhandener lambdoider Prophage aufgrund von Insertionen und Rearrangements defekt wurde (McDONOUGH und BUTTERTON, 1999). Ebenso werden Insertionen für

die Inaktivierung des Prophagen VT 2-Sakai verantwortlich gemacht (MAKINO et al., 1999).

Die bislang untersuchten Verotoxin-codierenden Phagen differierten in Größe und Gengehalt, zeigten aber einen ähnlichen Aufbau (KARCH et al., 1999a). Die Verotoxin-Gene sind dabei in der späten Region des Phagen zwischen dem Antiterminator Q und der sogenannten Lysiskassette lokalisiert, welche aus den Genen S und R besteht und an der Freisetzung der reifen Phagenpartikel beteiligt ist. Die Expression der Verotoxin-Gene scheint somit an den Phagenzyklus gekoppelt (SCHMIDT, 2001). Bei einigen VT 2-positiven Stämmen findet sich „upstream“ noch ein *ileX* tRNA-Gen. Diese tRNA erkennt das seltene Isoleucin-Codon AUA, welches in VT 2-Genen in ungewöhnlicher Häufigkeit auftritt (SCHMIDT et al., 1997b).

Aus dieser genetischen Lokalisation ergeben sich Konsequenzen für Epidemiologie, Labordiagnostik sowie Therapie. So gelang mehreren Untersuchern die Transduktion von VT-Phagen(-derivaten) auf verschiedene pathogene und apathogene *E. coli*-Stämme (SCHMIDT et al., 1999c; JAMES et al., 2001; KOCH et al., 2001). Es ist davon auszugehen, daß Phagen auch *in vivo* als Vektoren fungieren und so aus apathogenen *E. coli*-Stämmen der Darmflora neue VTEC-Isolate entstehen können (TÓTH et al., 2003b). Der horizontale Transfer der Verotoxin-Gene innerhalb der *E. coli*-Population über Phagen erklärt die große Heterogenität der VTEC-Gruppe, zu der, wie bereits erwähnt, mittlerweile über 250 Serotypen zu zählen sind. Neben der Entstehung neuer VTEC-Stämme muß jedoch auch mit dem Verlust der Verotoxin-Gene unter bestimmten Bedingungen gerechnet werden, was insbesondere in der Labordiagnostik zu berücksichtigen ist (REIDA et al., 1994). So berichteten KARCH et al. (1992), daß die Isolate von 15 der 45 einbezogenen Patienten nach Subkultivierung ihr Verotoxinbildungsvermögen verloren hatten, was die Notwendigkeit direkter Screening-Methoden in der klinischen Labordiagnostik unterstreicht. Schließlich hat die direkte Kopplung an den Phagen-Zyklus auch Auswirkungen auf die einsetzbaren Therapien bei VTEC-Infektionen. Es ist mittlerweile gut belegt, daß subinhibitorische Konzentrationen an antimikrobiellen Stoffen zur Induktion der Prophagen führen können, wodurch parallel vermehrt Verotoxin freigesetzt wird (GRIF et al., 1998b; KÖHLER et al., 2000; HEROLD und SCHMIDT, 2004). Aus diesem Grund wird der Antibiotika-Einsatz zur Therapie von VTEC-Infektionen kontrovers diskutiert und meistens abgelehnt, so auch im „Ratgeber Infektionskrankheiten“ des RKI (2001a).

#### **2.4.1.5 Verotoxine in anderen Bakterien-Spezies**

Auch in anderen Bakterien-Spezies gelang der Nachweis von Zytotoxinen, welche einen hohen Verwandtschaftsgrad zu Verotoxinen zeigen. So wurden sowohl in *Citrobacter freundii*-Stämmen, als auch in einem *Enterobacter cloacae*-Stamm VT 2c-ähnliche Toxine gefunden (SCHMIDT et al., 1993b; PATON und PATON, 1996). Letzterer wurde von einem HUS-Patienten isoliert; da parallel dazu jedoch auch ein Verotoxin-produzierender *E. coli*-Stamm nachgewiesen wurde, blieb die klinische Bedeutung dieses Stammes unklar. *Citrobacter freundii* hingegen wird als ursächliches Agens eines Gastroenteritis-Ausbruchs in einem Kindergarten angesehen, bei dem neun Kinder an HUS erkrankten, von denen eines starb. Als Vektor wurde Kräuterbutter identifiziert. Transduktion über *vtx*-codierende Phagen könnte also nicht nur

*intra speciem*, sondern auch zwischen verschiedenen Bakterienspezies für die Verbreitung dieses Virulenzfaktors verantwortlich sein (TSCHÄPE et al., 1995). Denkbar wäre aber auch ein Transport von Virulenzgenen über Membranvesikel, wie es *in vitro* gezeigt werden konnte (KOLLING und MATTHEWS, 1999). Verotoxin-Gene wurden weiterhin auch bei *Hafnia alvei*, *Enterobacter gergoviae*, *Escherichia fergusonii* sowie *Pantoea* spp. nachgewiesen (ROGERIE et al., 2001; SANDER, 2002; ALBERT et al., 2003).

## 2.4.2 Pathogenitätsinseln

Mit dem Begriff „Pathogenitätsinsel“ werden chromosomale DNA-Abschnitte bezeichnet, welche diverse Virulenzgene beinhalten, sich aber in ihrer Zusammensetzung wie beispielsweise G+C-Gehalt oder Codon-Verteilung vom restlichen Genom unterscheiden und deshalb als fremd angesehen werden. Sie fehlen in nahe verwandten, avirulenten Bakterien. Durch horizontalen Transfer solcher Pathogenitätsinseln können Bakterienzellen komplexe Virulenzeigenschaften in einem einzigen Schritt erwerben (MECSAS und STRAUSS, 1996). Denkbar ist jedoch auch eine schrittweise Übertragung einzelner Gene (SCHMIDT et al., 2001). Bei VTEC wurden bislang fünf verschiedene Pathogenitätsinseln näher beschrieben (s. [Tabelle 6](#)).

Tabelle 6: Bei verotoxinogenen *E. coli* beschriebene Pathogenitätsinseln

Akronym	Bezeichnung	Quelle
LEE	locus of enterocyte effacement	MCDANIEL et al., 1995
HPI	high-pathogenicity island	KARCH et al., 1999b
TAI	tellurite resistance- and adherence-conferring island	TARR et al., 2000
LPA	locus of proteolysis activity	SCHMIDT et al., 2001
ETT2	<i>E. coli</i> type III secretion 2	HAYASHI et al., 2001

### 2.4.2.1 Locus of enterocyte effacement (LEE)

Die am längsten bekannte und bestuntersuchte Pathogenitätsinsel der VTEC ist der „locus of enterocyte effacement“ (LEE), der für Virulenzfaktoren codiert, die an der Ausprägung der sogenannten „attaching and effacing“ (A/E)-Läsionen beteiligt sind. Wie bereits in Kapitel 2.2.1 beschrieben, sind A/E-Läsionen durch eine enge Adhäsion der Bakterien an das Darmepithel („attaching“) sowie lokale Degeneration der Bürstensaum-Mikrovilli („effacing“) charakterisiert. An der Anheftungsstelle sind oftmals sockelartige Ausstülpungen der Wirtszelle zu beobachten. Das Zytoskelett der Epithelzelle wird unterhalb dieser Kontaktstellen umstrukturiert, es kommt zu einer Anreicherung an polymerisiertem Aktin (MOON et al., 1983; NATARO und KAPER, 1998). Ursprünglich in EPEC beschrieben und dort *per definitionem* obligater Bestandteil des Virulenzspektrums, konnte LEE außer in VTEC auch in anderen Patho-

gruppen und Bakterienspezies nachgewiesen werden, so z. B. in Kaninchen-pathogenen *E. coli* (RDEC), in *Hafnia alvei* und in *Citrobacter rodentium*, ehemals *Citrobacter freundii* Biotyp 4280 (McDANIEL et al., 1995). *E. coli*, die den A/E-Phänotyp aufweisen, werden auch zur Gruppe der AEEC (attaching and effacing *Escherichia coli*) zusammengefaßt. Im Gegensatz zu den EPEC stellt der LEE für die VTEC-Gruppe nur einen fakultativen Teil des möglichen Virulenzspektrums dar, wenngleich er bei klinischen Stämmen besonders häufig nachgewiesen werden kann.

### Genetische Organisation

PERNA et al. (1998) sequenzierten den LEE des *E. coli* O157-Stammes EDL 933, welcher eine Länge von 43.359 bp aufweist. Damit ist er deutlich umfangreicher als der 35.624 bp umfassende LEE des EPEC-Stammes E2348/69 (ELLIOTT et al., 1998b), was hauptsächlich auf die Insertion des 7,5 kb großen Prophagen 933L zurückzuführen ist. Der durchschnittliche G+C-Gehalt der LEE-Sequenz liegt bei 40,91 % und somit signifikant niedriger als der G+C-Gehalt des *E. coli* K12-Genoms von 50,80 %. Auch die Codon-Verteilung ist für *E. coli* atypisch, was auf einen horizontalen Transfer dieses Elementes hinweist. Die Genstruktur der LEE der beiden untersuchten EPEC- bzw. *E. coli* O157-Stämme ist sehr ähnlich, die Nukleotidsequenz-Homologie beträgt 93,9 %. Dabei ist die Varianz nicht gleichmäßig über die gesamte Sequenz verteilt. Vielmehr zeigen insbesondere solche Gene eine höhere Variabilität, deren codierte Proteine direkt mit der Wirtszelle interagieren, wie beispielsweise das *eae*-, das *tir*- oder die *esp*-Gene, wohingegen die Gene des Typ III-Sekretionssystems zwischen beiden LEE hochkonserviert sind (PERNA et al., 1998).

Wie oftmals bei Pathogenitätsinseln zu beobachten, sind auch die LEE dieser beiden untersuchten Stämme in der Nähe von tRNA-Genen lokalisiert, in diesem Fall bei ***seI***. Als weitere mögliche Insertionsstellen wurden sowohl bei EPEC-, als auch bei VTEC-Stämmen Gene für Phenylalanin-tRNA, ***pheU*** und ***pheV*** identifiziert (JORES et al., 2001). Dabei ist der LEE jedoch in eine größere Pathogenitätsinsel integriert, wohingegen er im *seI*-Lokus als eigenständiges Element auftritt (RUMER et al., 2003). Die unterschiedlichen Insertionsstellen stützen nach Meinung von WIELER et al. (1997) sowie RUMER et al. (2003) die Hypothese, daß die Aufnahme des LEE in der Evolution der EPEC und VTEC kein singuläres Ereignis darstellt, sondern mehrfach auftrat.

Der LEE des *E. coli* O157-Stammes EDL 933 beinhaltet 54 offene Leserahmen (open reading frames, ORF). 13 davon entfallen auf den mutmaßlichen Prophagen, die übrigen 41 entsprechen den im LEE des EPEC-Stammes E2348/69 gefundenen ORF (PERNA et al., 1998). Die bislang identifizierten Gene codieren für ein Typ III-Sekretionssystem, für das outer-membrane-protein Intimin, seinen translozierten Intimin-Rezeptor, diverse sezernierte Proteine sowie sogenannte "chaperones".

### Typ III-Sekretionssystem

Typ III-Sekretionssysteme (TTSS) finden sich bei gramnegativen Pflanzen-, Tier- und Humanpathogenen. Sie bestehen aus ca. 20-25 Proteinen, die eine Art Kanal durch die Bakterienmembran bilden und so den Bakterien ermöglichen, Virulenzfaktoren direkt in die Wirtszelle einzuschleusen. Dabei unterscheidet man Effektorproteine, die im Zytoplasma der Wirtszelle ihre Funktion ausüben, wohingegen Translokations-

proteine deren Transport durch die eukaryotische Zellmembran vermitteln. Im Aufbau ähneln die TTSS den Bakteriengeißeln, weshalb ein gemeinsamer Ursprung vermutet wird. Als Prototyp gilt das TTSS von *Yersinia* spp., weitere finden sich beispielsweise bei *Bordetella* spp., *Chlamydia* spp., *Shigella* spp. sowie *Salmonella* spp. (MECSAS und STRAUSS, 1996; CORNELIS und VAN GIJSEGEM, 2000; AIZAWA, 2001; GAUTHIER und FINLAY, 2002).

Die TTSS-Proteine werden bei den EPEC bzw. VTEC durch die **sep**-Gene (secretion of *E. coli* proteins) codiert, die später teilweise analog der bei *Yersinia* spp. gebräuchlichen *ysc*-Nomenklatur in **esc** (*E. coli* secretion) umbenannt wurden: *escC* (*sepC*), *escD*, *escF*, *escJ* (*sepD*), *escN* (*sepB*), *escR* (*sepI*), *escS* (*sepH*), *escT* (*sepG*), *escU* (*sepF*), *escV* (*sepA*), *sepQ*, *sepZ*; (JARVIS et al., 1995; JARVIS und KAPER, 1996; ELLIOTT et al., 1998b; PERNA et al., 1998). Die durch die innere und äußere Bakterienmembran reichende, ca. 20 nm große Pore des Esc-Komplexes wird durch die Translokationsproteine **EspA**, **EspB** und **EspD** fortgesetzt (DONNENBERG et al., 1993; KENNY und FINLAY, 1995; KENNY et al., 1996; LAI et al., 1997). Dabei ummantelt EspA das nadelartig aus der äußeren Bakterienmembran ragende EscF, wohingegen EspB und EspD in die Membran der Zielzelle integriert werden und dort ebenfalls eine Art Pore bilden, die den Durchtritt von Effektorproteinen erlaubt (GAUTHIER und FINLAY, 2002). McNALLY et al. (2001) konnten zeigen, daß die von ihnen untersuchten *E. coli* O157-Stämme humanen Ursprungs signifikant mehr EspD bilden als bovine Isolate.

### Effektorproteine

Bislang konnten acht Effektorproteine identifiziert werden, die durch das TTSS in die Wirtszelle eingeschleust werden. Neben den LEE-codierten Molekülen EspB, Tir (= EspE), EspF, EspG, EspH und Map wurden mittlerweile auch nicht-LEE-codierte Effektorproteine beschrieben, Cif und NleA (= EspI) (KENNY et al., 1997; DEIBEL et al., 1998; McNAMARA und DONNENBERG, 1998; TAYLOR et al., 1999; KENNY und JEPSON, 2000; ELLIOTT et al., 2001b; TU et al., 2003; MARCHÈS et al., 2003; DENG et al., 2004; GRUENHEID et al., 2004).

Da **EspB** neben seiner Rolle als Translokationsprotein auch an der Umverteilung des Aktingerüsts der Epithelzelle beteiligt ist, wird es von TAYLOR et al. (1999) als Zytoskelett-Toxin bezeichnet und zu den Effektorproteinen gezählt. Der translozierte Intimin-Rezeptor **Tir** wurde ursprünglich für ein Epithelzell-eigenes Membranprotein namens Hp90 gehalten (ROSENSHINE et al., 1996). KENNY et al. (1997) konnten aber kurz darauf zeigen, daß es sich um ein bakterielles Protein handelt, welches über das TTSS in die Wirtszelle eingeschleust, in deren Membran integriert wird und dort als Rezeptor für das ebenfalls durch den LEE codierte outer-membrane-protein Intimin fungiert. DEIBEL et al. (1998) veröffentlichten parallel dazu eine Arbeit über ein ca. 90 kDa großes Effektorprotein, das sie als EspE bezeichneten, und äußerten darin die Vermutung, daß es sich dabei um das vermeintliche Hp90 handeln könnte. Dies bestätigte sich, Tir und EspE sind also synonyme Bezeichnungen. Tir wird als das wichtigste Effektormolekül angesehen. Abgesehen von seiner entscheidenden Funktion bei der Adhärenz der Bakterien- an die Epithelzellen ist Tir auch an der Umstrukturierung des Zytoskeletts beteiligt, es zeigt GAP-Aktivität (GTPase-activating

protein) und führt dadurch zur Rückbildung Map-induzierter Filopodien und Ausbildung sockelartiger Ausstülpungen (KENNY et al., 2002).

Das Prolin-reiche Effektorprotein **EspF** beeinträchtigt die Funktion der Darmschranke durch Störung des Membranpotentials, Erhöhung der Membranpermeabilität, Änderung der tight junctions-Struktur und Apoptose-Induktion (CRANE et al., 2001; MCNAMARA et al., 2001); als Zielstruktur wurden Mitochondrien identifiziert (NOUGAYRÈDE und DONNENBERG, 2004). Die Wirkungsweise des Effektorproteins **EspG** ist gegenwärtig noch unklar (ELLIOTT et al., 2001b). **EspH** wurde erst kürzlich von TU et al. (2003) beschrieben. Dieses in der Nähe der Zellmembran lokalisierte Effektorprotein unterdrückt die Bildung von Filopodien und verstärkt die Ausbildung von Aktin-reichen sockelartigen Ausstülpungen, moduliert also die Struktur des Zytoskeletts ähnlich wie Tir. Das Effektorprotein **Map** (mitochondrial associated protein) erhielt seinen Namen aufgrund seiner Fähigkeit, Störungen im Membranpotential von Mitochondrien hervorzurufen (KENNY und JEPSON, 2000). KENNY et al. (2002) entdeckten auch bei diesem Effektorprotein noch eine zweite Funktion, die Induktion der Filopodienausbildung. In dieser Hinsicht müssen die entgegengesetzten zellulären Effekte von Tir und Map während der Infektion einer Wirtszelle also zeitlich reguliert werden.

MARCHÈS et al. (2003) beschrieben zum ersten Mal ein Effektormolekül des LEE-TTSS, welches nicht auf dem LEE selbst, sondern auf einem lambdoiden Prophagen codiert ist: den "cycle inhibiting factor", kurz **Cif**. Neben der namensgebenden Fähigkeit, den Zellzyklus beim G<sub>2</sub>/M-Übergang zu blockieren, führt er weiterhin zur Ausbildung sogenannter "stress fibres", gehört also zu den Cyclomodulinen. **NleA** (non-LEE-encoded effector A) ist in einer Prophagen-assoziierten Pathogenitätsinsel codiert; als Zielstruktur in der Wirtszelle gilt der Golgi-Apparat (GRUENHEID et al., 2004). DENG et al. (2004) beschrieben bei *C. rodentium* sechs weitere putative Effektorproteine, die außerhalb des LEE codiert sind (NleB-NleG).

### Chaperones

Weiterhin sind auf dem LEE diverse Chaperones codiert, sogenannte "Gouvernantenproteine". Typ III Chaperones sind ca. 15 kDa große Proteine, die spezifisch mit ein oder zwei Effektor- oder Translokationsproteinen interagieren. Das Fehlen eines spezifischen Chaperones verhindert i. A. die Sekretion des zugehörigen Proteins, ohne die der anderen Proteine zu stören. Meist liegen die Chaperones in Dimer-Form vor und binden an die N-terminale Region des zugehörigen Proteins, in deren unmittelbarer Nachbarschaft sie auch oftmals codiert sind. Ihnen wird eine stabilisierende Wirkung auf die zugehörigen Proteine zugesprochen, während diese noch im Zytosol der Bakterienzelle vorliegen bzw. sezerniert werden (FELDMAN und CORNELIS, 2003). Die bislang im EPEC-LEE identifizierten Chaperones sind in Tabelle 7 aufgelistet.

**Tabelle 7:** Im "locus of enterocyte effacement" (LEE) von „attaching and effacing *E. coli*" (AEEC) identifizierte Chaperones

Bezeichnung	zugehöriges Protein	Quelle
CesD	EspB, EspD	WAINWRIGHT und KAPER, 1998
CesF	EspF	ELLIOTT et al., 2002
CesT	Tir, Map	CREASEY et al., 2003b
CesD2	EspD	NEVES et al., 2003
CesAB	EspA, EspB	CREASEY et al., 2003a

### ***E. coli* attaching and effacing (eae)-Gen**

Das am längsten bekannte Gen des LEE ist das *E. coli* attaching and effacing (*eae*)-Gen, welches 1990 von JERSE et al. bei EPEC, RDEC und VTEC beschrieben wurde. Es codiert das 94-97 kDa große äußere Membranprotein Intimin, dessen Name auf die enge Anheftung zurückgeht, welche es zwischen Bakterium und Darmepithelzelle vermittelt. Dabei bindet das C-terminale Ende des Intimins an das oben beschriebene Effektorprotein Tir, welches zuvor über das Typ III-Sekretionssystem in die Wirtszelle eingebracht und in dessen Membran integriert wurde.

Besondere Bedeutung erlangt das *eae*-Gen aufgrund der Tatsache, daß es zu hohen Prozentsätzen bei klinischen Isolaten nachweisbar ist. Insbesondere zeichnet sich in der Mehrzahl der Untersuchungen eine signifikante Assoziation zu schweren Krankheitsverläufen wie der HC oder dem HUS ab (BEUTIN et al., 1998; BOERLIN et al., 1999). So konnten BEUTIN et al. (2004) bei 95,2 % der HUS-Isolate, aber nur bei 66,7 % der Isolate von Patienten mit unblutiger Diarrhöe das *eae*-Gen nachweisen. Nach Untersuchungen von BÜLTE (2001) beherbergten 92,0 % der HUS/HC-Isolate und 81,3 % der Isolate von symptomlosen Ausscheidern, aber nur 7,0 % der bovinen Isolate sowie 10,9 % der Lebensmittel-Isolate das *eae*-Gen.

LUO et al. (2000) identifizierten bei Kristallisationsuntersuchungen des Intimins eine C-terminale Anker-Region sowie die vier extrazellulären Domänen D0 bis D3. Während das N-terminale Ende als hochkonserviert gilt, zeigt die 280 Aminosäuren umfassende bindungsaktive C-terminale Region, auch als Int280 bekannt, deutliche Sequenzvariabilität (AGIN und WOLF, 1997; ADU-BOBIE et al., 1998). Mittlerweile sind 18 Intimin-Subtypen beschrieben, die teilweise in weitere Untergruppen unterteilt werden können (s. Tabelle 8). Ähnlich wie die Typisierung der Verotoxine leistet auch die Intimin-Subtypisierung einen Beitrag zur Charakterisierung von Isolaten, sie kann epidemiologische und phylogenetische Untersuchungen erleichtern und eventuell Hinweise auf das krankheitsauslösende Potential eines Stammes geben (RAMACHANDRAN et al., 2003). Weiterhin scheint der Intimin-Subtyp den Gewebstropismus von AAEC zu beeinflussen. Während der  $\alpha$ -Intimin-exprimierende EPEC-Stamm E2348/69 die Dünndarm-Mukosa besiedelt, beschränkt sich die Adhäsion seines  $\gamma$ -Intimin-tragenden Mutanten auf das Follikel-assoziierte Epithel (FAE) der Peyerschen Platten, wie dies auch von VTEC O157:H7-Stämmen bekannt ist (PHILLIPS und FRANKEL, 2000; PHILLIPS et al., 2000). Auch  $\beta$ -Intimin-positive *E. coli* O26- und  $\epsilon$ -

Intimin-positive *E. coli* O103-Stämme zeigen einen FAE-Tropismus (FITZHENRY et al., 2003; PHILLIPS et al., 2003). Allerdings scheinen auch Intimin-unabhängige Faktoren den Gewebstropismus von AEEC zu beeinflussen, wie insbesondere bei EPEC der Serogruppe O55 gezeigt werden konnte (FITZHENRY et al., 2002; PHILLIPS et al., 2003).

**$\alpha$ -Intimin** wird v. a. bei klassischen EPEC-Serovaren wie z. B. O127:H6 oder O55:H6 nachgewiesen, selten bei verotoxinogenen Stämmen (ADU-BOBIE et al., 1998; OSWALD et al., 2000; RAMACHANDRAN et al., 2003). Aufgrund unterschiedlicher RFLP-Profile unterteilten OSWALD et al. (2000) diese Gruppe in die beiden Untergruppen  $\alpha_1$  und  $\alpha_2$ . Generell werden nach einem Vorschlag von ZHANG et al. (2002b) solche *eae*-Varianten, die sich mit den bislang bekannten spezifischen Primern nicht amplifizieren lassen, als neue Subtypen angesehen, wohingegen solche Sequenzen, die sich zwar mit den bestehenden Primern amplifizieren lassen, jedoch nach Restriktionsverdau unterschiedliche Restriktionsmuster zeigen, als neue Untergruppe einer bestehenden Variante gelten.

Am weitesten verbreitet ist das  **$\beta$ -Intimin**, welches sowohl bei EPEC-, als auch bei VTEC-Isolaten zu finden ist (ADU-BOBIE et al., 1998; OSWALD et al., 2000; RAMACHANDRAN et al., 2003). Auch  $\beta$ -Intimin kann gemäß den Untersuchungen von OSWALD et al. (2000) in die beiden Untergruppen  $\beta_1$  und  $\beta_2$  unterteilt werden, wobei die von ADU-BOBIE et al. (1998) beschriebene  $\delta$ -Intimin-Variante des *E. coli* O86:H34-Stammes ICC95 von OSWALD et al. (2000) als  $\beta_2$  klassifiziert wurde.

Auch das  **$\gamma$ -Intimin** kann nach OSWALD et al. (2000) in zwei Untergruppen unterteilt werden; dieser Subtyp findet sich ebenfalls sowohl bei EPEC-, als auch bei VTEC-Isolaten. *E. coli*-Stämme der Serotypen O157:H7 bzw. O157:H<sup>-</sup> beherbergen bis auf wenige Ausnahmen diese Intimin-Variante (ADU-BOBIE et al., 1998; GALLIEN et al., 2000; SCHÖNENBRÜCHER et al., 2002; RAMACHANDRAN et al., 2003). Lediglich OSWALD et al. (2000) fanden bei *E. coli* O157:H45- sowie bei Sorbit-fermentierenden *E. coli* O157:H<sup>-</sup>-Isolaten  $\alpha$ -Intimin. Auch EPEC O55:H7-Stämme, die phylogenetisch eng mit dem *E. coli* O157:H7-Klon verwandt sind, beherbergen  $\gamma$ -Intimin (ADU-BOBIE et al., 1998).

**$\delta$ -Intimin** wurde bislang als solches nur selten nachgewiesen (ADU-BOBIE et al., 1998; GALLIEN et al., 2000; SCHÖNENBRÜCHER et al., 2002) und kann nach Untersuchungen von OSWALD et al. (2000) zur Untergruppe  $\beta_2$  gerechnet werden. Ähnliches gilt auch für die  **$\theta$ -Variante** des Intimins. Da deren *eae*-Gen sich mit den  $\gamma$ -*eae*-spezifischen Primern SK1 und LP3 amplifizieren lässt, kann es nach dem Nomenklatur-Vorschlag von ZHANG et al. (2002b) als Untergruppe des  $\gamma$ -Intimins angesehen werden.

Tabelle 8: Intimin-Subtypen von „attaching and effacing *E. coli*“ (AEEC)

Bezeichnung		Quelle	Bemerkungen
$\alpha$	alpha	ADU-BOBIE et al., 1998	Unterteilung in $\alpha_1$ und $\alpha_2$ nach OSWALD et al., 2000
$\beta$	beta	ADU-BOBIE et al., 1998	Unterteilung in $\beta_1$ und $\beta_2$ nach OSWALD et al., 2000
$\gamma$	gamma	ADU-BOBIE et al., 1998	Unterteilung in $\gamma_1$ und $\gamma_2$ nach OSWALD et al., 2000
$\delta$	delta	ADU-BOBIE et al., 1998	Miteinbeziehung in $\beta_2$ nach OSWALD et al., 2000; identisch mit $\kappa$ nach ZHANG et al., 2002b
$\epsilon$	epsilon	OSWALD et al., 2000	
$\zeta$	zeta	JORES et al., 2003	
$\eta$	eta	ZHANG et al., 2002b	
$\theta$	theta	TARR und WHITTAM, 2002	Untergruppe von $\gamma$ auf Vorschlag von ZHANG et al., 2002b
$\iota$	jota	ZHANG et al., 2002b	
$\kappa$	kappa	ZHANG et al., 2002b	identisch mit $\delta$ nach ADU-BOBIE et al., 1998
$\lambda$	lambda	AF439538 <sup>1)</sup>	
$\mu$	my	RAMACHANDRAN et al., 2003	umbenannt in $\iota_2$
$\nu$	ny	RAMACHANDRAN et al., 2003	umbenannt in $\epsilon_2$
$\xi$	xi	RAMACHANDRAN et al., 2003	nicht identisch mit $\xi$ nach BLANCO et al., 2004; identisch mit $\beta_2$ nach BLANCO et al., 2004
$\xi$	xi	BLANCO et al., 2004	nicht identisch mit $\xi$ nach RAMACHANDRAN et al., 2003
$\pi$	pi	AJ705052 <sup>1)</sup>	
$\rho$	rho	AJ748082, AJ748083, AJ748084 <sup>1)</sup>	
$\sigma$	sigma	J781125 <sup>1)</sup>	

<sup>1)</sup> keine Veröffentlichung, aber Bereitstellung der Sequenz in Gendatenbanken

RAMACHANDRAN et al. (2003) stellten fest, daß manche Intimin-Typen bevorzugt mit bestimmten H-Antigenen assoziiert sind. So tritt  $\beta$ -Intimin beispielsweise in 95,1 % der untersuchten Fälle bei H<sup>-</sup>, H<sub>2</sub>- oder H<sub>11</sub>-Stämmen auf, wohingegen bei  $\alpha$ -Intimin-exprimierenden Stämmen der Geißeltyp H<sub>6</sub> überwiegt. Darüber hinaus verglichen sie auch das Vorkommen der Intimin-Varianten in Bezug auf die Herkunft der Isolate. Dabei konnten sie keine Unterschiede zwischen Stämmen ovinen und bovinen Ursprungs erkennen. SCHÖNENBRÜCHER et al. (2002) verglichen die Intimin-Varianten von Isolaten symptomloser Ausscheider mit denen klinisch erkrankter Patienten. Auch hierbei konnten keine signifikanten Unterschiede entdeckt werden.

#### 2.4.2.2 High-pathogenicity island (HPI)

Diese Pathogenitätsinsel enthält die Gene *irp1*, *irp2* und *fyuA*, welche für ein Eisen-Aufnahme-System namens Yersiniabactin codieren. Sie wurde zum ersten Mal bei pathogenen *Yersinia* spp. beschrieben, ist jedoch auch bei anderen Vertretern der Familie der Enterobacteriaceae wie z. B. *Klebsiella* sp. und *Citrobacter* sp. zu finden (KARCH et al., 1999b). SCHUBERT et al. (1998) gelang bei 93 % der untersuchten EAggEC-Stämme sowie vereinzelt bei EIEC-, EPEC- und ETEC-Isolaten der Nachweis von HPI. Auch 32 % der untersuchten *E. coli*-Isolate aus Stuhlproben gesunder Probanden wiesen dieses Gencluster auf. Nicht nachweisbar war HPI bei *Salmonella enterica*-Serovaren und *Shigella* spp. sowie den untersuchten VTEC-Isolaten der Serogruppen O<sub>26</sub>, O<sub>55</sub>, O<sub>111</sub> und O<sub>157</sub>. In der Untersuchung von KARCH et al. (1999b) erwiesen sich 27,2 % der 206 getesteten VTEC-Stämme als HPI-positiv, darunter auch alle getesteten *E. coli* O<sub>26</sub>:H<sub>11</sub>/H<sup>-</sup>, jedoch kein Isolat der Serotypen O<sub>157</sub>:H<sub>7</sub>/H<sup>-</sup>, O<sub>103</sub>:H<sub>2</sub> oder O<sub>111</sub>:H<sup>-</sup>. Ähnliche Ergebnisse erzielten auch GALLIEN et al. (2001). Diese Autoren konnten bei 19,3 % der untersuchten VTEC-Stämme aus unterschiedlichen Habitaten HPI nachweisen, wobei es sich um Isolate der Serogruppen O<sub>26</sub>, O<sub>118</sub> sowie O<sub>157</sub> handelte, die aus Stuhl-, Rinderkot- und Lebensmittelproben stammten. Auch in dieser Arbeit erwiesen sich die *E. coli* O<sub>157</sub>-Stämme als HPI-negativ. KARCH et al. (1999b) konnten zeigen, daß HPI in STEC in der Nähe des tRNA-Gens *asnT* lokalisiert ist. Das von HPI codierte Eisen-Aufnahme-System ermöglicht ihnen das Überleben in bestimmten ökologischen Nischen, leistet aber keinen direkten Beitrag zur Schädigung des Wirtsorganismus. KARCH et al. (1999) stellen daher die Frage, inwieweit die Bezeichnung „Pathogenitätsinsel“ für HPI zutreffend ist, da sie vielmehr zur Erhöhung der metabolischen Fitness beiträgt.

#### 2.4.2.3 Tellurite resistance- and adherence-conferring island (TAI)

TARR et al. (2000) berichteten über ein mögliches chromosomal codiertes Adhäsin bei *E. coli* O<sub>157</sub>:H<sub>7</sub>, welches große Ähnlichkeit zu *irgA* von *Vibrio cholerae* aufweist und dementsprechend „IrgA homologue adhesin“ (Iha) genannt wurde. Die Übertragung dieses *iha*-Gens auf einen nicht-adhärierenden *E. coli*-Laborstamm befähigt diesen zur Ausprägung von Adhärenz. Allerdings können die Autoren nicht ausschließen, daß es sich bei dem outer-membrane-protein Iha nicht direkt um ein Adhäsin, sondern um einen Aktivator handelt, der die Expression eines bislang noch unbekanntes Adhäsins steigert. Aus diesem Grund verwenden sie anstelle des Begriffs „Adhäsin“ die Umschreibung „adherence conferring“. Da das *iha*-Gen außerdem in Nachbarschaft zu Gensequenzen liegt, die die Tellurit-Resistenz codieren, führten TARR et al. (2000) den Begriff der „tellurite resistance- and adherence-conferring

island“ (TAI, TRACI) ein. TAI ist außer bei *E. coli* O157:H7-Stämmen auch bei anderen VTEC- und EPEC-Isolaten nachweisbar. Zu ähnlichen Ergebnissen kommen auch JELACIC et al. (2003), die das Virulenzspektrum humaner VTEC-Stämme untersuchten und *iha* in allen *E. coli* O157:H7-Isolaten sowie bei einigen VTEC-Isolaten anderer Serotypen fanden.

#### 2.4.2.4 Locus of proteolysis activity (LPA)

SCHMIDT et al. (2001) beschrieben in einem VT 2d-positiven, LEE-negativen *E. coli* O91:H<sup>-</sup>-Stamm eine weitere, 33 kb umfassende Pathogenitätsinsel, die u. a. für eine Serinprotease codiert und deshalb „locus of proteolysis activity“ genannt wurde. Um diese Serinprotease von der plasmidal codierten Serinprotease EspP (siehe 2.4.3.3) zu differenzieren, wurde neben der Bezeichnung Esp (*E. coli* secreted protease) der Zusatz „I“ für „island encoded“ gewählt. Weiterhin befindet sich auf dieser Pathogenitätsinsel ein *iha*-Homolog, dessen Protein eine 91 %ige Sequenzhomologie zu dem von TARR et al. (2000) bei *E. coli* O157:H7 beschriebenen Iha aufweist. Weitere Sequenzabschnitte codieren für einen *E. coli* Vitamin B<sub>12</sub>-Rezeptor (BtuB), einen möglichen Transkriptionsregulator vom AraC-Typ, sowie vier Phosphotransferase-Homologe. Insertionsstelle von LPA ist der *se/C*-Locus, welcher auch als typischer Integrationsort des LEE bekannt ist. Nach SCHMIDT et al. (2001) könnte somit das Vorhandensein des LPA eine Insertion des LEE in *se/C* verhindern. Auch GALLIEN et al. (2002b) konnten bei keinem LPA-positiven Stamm den LEE nachweisen. Diese Autoren untersuchten das Vorkommen von LPA bei VT 2d-positiven Isolaten von Wild. Dabei erwiesen sich 67,6 % der 34 untersuchten Kotproben sowie 60 % der 25 getesteten Fleischproben als *iha*-, *espl*- und *btuB*-positiv. Bei drei porcinen VT 2e- sowie fünf VT 2f-Isolaten von Tauben konnten keine LPA-typischen Gene nachgewiesen werden. Von 13 untersuchten VTEC-Stämmen humanen Ursprungs konnte nur bei einem Isolat *espl* sowie *btuB* detektiert werden; dieser Stamm war VT 1- und VT 2d-positiv. SCHMIDT et al. (2001) konnten zwar das Vorliegen von *iha* bei verschiedenen *E. coli*-Pathogruppen nachweisen, *espl* war jedoch nur vereinzelt bei EaggEC-Isolaten zu finden, und *btuB* konnte bei keinem der 95 untersuchten *E. coli*-Stämme detektiert werden.

#### 2.4.2.5 *E. coli* type III secretion 2 (ETT2)

Neben dem LEE-codierten Typ III-Sekretionsapparat wurde beim *E. coli* O157:H7-Stamm „Sakai“ noch ein weiteres Gencluster entdeckt, das für ein Typ III-Sekretionssystem codiert, welches große Ähnlichkeit zur SPI-1-Pathogenitätsinsel von *Salmonella* Typhimurium aufweist und „*E. coli* type III secretion 2“ (ETT2) genannt wurde (HAYASHI et al., 2001). Gemäß den Untersuchungen von MAKINO et al. (2003) umfaßt ETT2 bei diesem Stamm 17 kb und beinhaltet 21 ORF. Der G+C-Gehalt liegt mit 36,9 % deutlich unter dem des *E. coli* K12-Genoms von 50,8 %. Nach HARTLEIB et al. (2003) sowie PRAGER et al. (2004) umfaßt ETT2 29,9 kb und ist bei dem tRNA-Gen *glyU* lokalisiert.

ETT2 kann bei verschiedenen *E. coli*-Pathovaren nachgewiesen werden, zeigt jedoch eine hohe Variabilität. Während bei *E. coli* O157:H7/H<sup>-</sup> üblicherweise die komplette Sequenz detektiert werden kann, liegen bei VTEC anderer Serotypen sowie EPEC, ETEC, EIEC und EAggEC oftmals nur Fragmente dieser Pathogenitäts-

insel vor (MAKINO et al., 2003; HARTLEIB et al., 2003). Bei extraintestinalen oder apathogenen *E. coli*-Stämmen sowie anderen Vertretern der Enterobacteriaceae konnten diese Autoren ETT2 nicht nachweisen. Im Unterschied dazu detektieren REN et al. (2004) auch bei apathogenen *E. coli*-Stämmen zumindest Fragmente dieser Pathogenitätsinsel. Nach ihren Untersuchungen ist ETT2 bei den meisten Isolaten jedoch soweit degeneriert, daß eine Funktionalität nicht gegeben ist.

#### 2.4.2.6 Weitere potentielle Pathogenitätsinseln

Bei der Sequenzierung von *E. coli* O157-Stämmen wurde noch eine Reihe von DNA-Abschnitten gefunden, die Homologe zu bekannten bakteriellen Virulenzgenen enthalten und somit als mögliche Pathogenitätsinseln in Betracht zu ziehen sind (HAYASHI et al., 2001; PERNA et al., 2001). Insbesondere die in *E. coli* EDL 933 beschriebene „O-island“ Nr. 122, abgekürzt **OI-122**, welche dem **SpLE3** des *E. coli* O157 „Sakai“-Stammes entspricht, war Gegenstand mehrerer Untersuchungen. OI-122 umfaßt 23.029 bp und besteht aus 26 ORF, von denen einige signifikante Homologien zu *pagC* von *S. Typhimurium*, *Shigella flexneri* Enterotoxin 2-Gen (*sen*) sowie „EHEC factor for adherence“-Gen (*efa1*) zeigen (KARMALI et al., 2003). *efa1* wurde 2000 von NICHOLLS et al. bei einem VTEC-Isolat der Serogruppe O111 identifiziert und ist homolog zu dem von KLAPPROTH et al. im gleichen Jahr bei einem EPEC O127-Stamm beschriebenen Lymphostatin-Gen *lifA*. Lymphostatin inhibiert spezifisch die Lymphozytenproliferation sowie die Produktion von Interleukin 2 und 4 sowie Interferon (KLAPPROTH et al., 2000). Die Bezeichnung *efa1* beruht auf der Annahme, daß dieser Faktor zur Adhärenz von AEEC beiträgt, was *in vitro* an CHO-Zellen gezeigt werden konnte (NICHOLLS et al., 2000). Weiterhin beeinflusst er die Kolonisierung des Rinderdarms (STEVENS et al., 2002). OI-122 bzw. *efa1/lifA* wird bei der Mehrzahl der AEEC-Stämme, jedoch nicht bei anderen *E. coli*-Pathovaren gefunden (KLAPPROTH et al., 2000; NICHOLLS et al., 2000; MORABITO et al., 2003). Bei *E. coli* O157:H7-Stämmen ist das *efa1/lifA*-Gen im Gegensatz zu *E. coli* O157:H- und non-O157-Stämmen nur fragmentär vorhanden (JANKA et al., 2002; MORABITO et al., 2003). MORABITO et al. (2003) vermuten, daß OI-122 und LEE als zusammenhängende Mosaik-Pathogenitätsinsel auf AEEC übertragen wurde.

#### 2.4.3 Plasmid-codierte Virulenzfaktoren

Die Heterogenität der VTEC spiegelt sich auch in der Variabilität ihrer Plasmid-Profile wieder (PRADEL et al., 2001; FRUTH et al., 2002). Selbst innerhalb eines Serotyps können Gengehalt und -anordnung der Plasmide variieren (BRUNDER et al., 1999). Bei *E. coli* O157:H7-Stämmen läßt sich jedoch mit hoher Regelmäßigkeit das 90 kb-große Virulenzplasmid pO157 nachweisen, auf welchem Gene für das EHEC-Hämolyysin, eine Katalase-Peroxidase, eine Serin-Protease sowie ein Typ II-Sekretionssystem identifiziert werden konnten (SCHMIDT et al., 1994a; BURLAND et al., 1998). Diese Gene sind auch bei anderen *E. coli*-Serovaren nachweisbar, treten jedoch nicht zwangsläufig in Kombination miteinander auf (BRUNDER et al., 1999; FRUTH et al., 2002). pO157 des Referenzstammes *E. coli* EDL 933 umfaßt insgesamt 100 ORF (BURLAND et al., 1998).

### 2.4.3.1 Enterohämolysin

Bei *E. coli* können verschiedene Hämolysin-Typen nachgewiesen werden. Das bestuntersuchte ist wohl das  $\alpha$ -Hämolysin, welches mit extraintestinalen *E. coli*-Infektionen assoziiert ist (BHAKDI et al., 1988).

BEUTIN et al. (1988) beschrieben ein neuartiges Hämolysin bei EPEC-Stämmen der Serogruppe O26, das sie Enterohämolysin nannten. Im Unterschied zu  $\alpha$ -Hämolysin, welches auf Schafblutagar bereits nach 3-stündiger Inkubation bei 37 °C eine deutliche, klare Hämolysezone hervorruft, zeichnet sich der enterohämolytische Phänotyp durch schmale, trübe Hämolysezonen aus, welche erst nach Übernachtskultur erkennbar werden. Da es regelmäßig bei VTEC unterschiedlicher Serotypen, aber nur selten bei anderen *E. coli*-Pathovaren nachgewiesen werden kann, wird es auch als EHEC-Hämolysin bezeichnet (SCHMIDT et al., 1995; GYLES et al., 1998).

Anders als  $\alpha$ -Hämolysin wird Enterohämolysin nicht in das Nährmedium sezerniert, was auf ein defektes Sekretionssystem zurückzuführen ist (BEUTIN et al. 1988; SCHMIDT et al., 1995). Beiden Hämolysin-Typen gemeinsam ist die Zugehörigkeit zur Familie der RTX-Proteine, welche durch die namensgebenden tandemartigen Wiederholungen von Nonapeptiden charakterisiert und bei gramnegativen tier- und humanpathogenen Bakterienstämmen verbreitet sind. Typisch ist weiterhin die Hitze-stabilität und Calcium-Abhängigkeit (BAUER und WELCH, 1996). Da Enterohämolysin eine höhere Zielzell-Spezifität aufweist, als dies für Hämolysine üblich ist, schlagen diese Autoren die Bezeichnung "enterohemorrhagic *E. coli* toxin (Ehx)" anstelle von Enterohämolysin (Ehly) vor; beide Nomenklaturen werden in der Literatur parallel verwendet.

Codiert werden  $\alpha$ -Hämolysin und Enterohämolysin jeweils durch ein *hlyCABD*-Operon, wobei die Aminosäuresequenz-Homologie der A- bzw. C-Proteine 61,2 % bzw. 66,0 % beträgt (SCHMIDT et al., 1995). Manche Isolate beherbergen offensichtlich "stille" EHEC-Hämolysin-Gene, die mittels genotypischer Methoden nachweisbar sind, jedoch nicht mit einem enterohämolytischen Phänotyp einhergehen, wie SCHMIDT und KARCH (1996) bei zwei von insgesamt 22 *hly*<sub>EHEC</sub>-positiven *E. coli* O111:H<sup>-</sup>-Isolaten sowie BOCKEMÜHL et al. (1997) bei 15,9 % von insgesamt 148 *hly*<sub>EHEC</sub>-positiven klinischen VTEC-Stämmen unterschiedlicher Serogruppen zeigen konnten.

Bei EPEC O26:H<sup>-</sup>-Stämmen gelang der Nachweis zweier Bakteriophagen-assoziierteter Enterohämolysine, Ehly1 und Ehly2 (BEUTIN et al., 1990; BEUTIN et al., 1993b; STROEHER et al., 1993). Später konnte jedoch gezeigt werden, daß diese Proteine keine Hämolysine im eigentlichen Sinne darstellen, sondern mittelbar die Produktion von Zytolysin A steigern, was in einer sichtbaren Zellyse auf Blutagar resultiert (OSCARSSON et al., 2002).

Die klinische Bedeutung von Enterohämolysin ist umstritten. Zwar konnte BÜLTE (2001) bei 90,0 % der HUS-/HC-Isolate *hly*<sub>EHEC</sub> detektieren, jedoch lag die Nachweisrate bei Isolaten symptomloser Ausscheider mit 93,4 % in vergleichbarer Höhe. In Untersuchungen von BOCKEMÜHL et al. (1997) zeigten sich HUS- bzw. Enteritis-Isolate zu 95,1 % bzw. 95,3 % *hly*<sub>EHEC</sub>-positiv, während die Nachweisrate für Isolate

symptomloser Ausscheider bei 70,7 % lag. SCHMIDT und KARCH (1996) fanden bei VTEC O111-Stämmen einen signifikanten Unterschied zwischen HUS- und Diarrhöe-Isolaten, die zu 88 % bzw. 22 % einen enterohämolytischen Phänotyp aufwiesen. Die von BOERLIN et al. (1999) durchgeführte Untersuchung ergab keinen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen dem Vorkommen des *hly*<sub>EHEC</sub>-Gens und dem Auftreten von Erkrankungen.

BEUTIN et al. (1989) sprechen Enterohämolysin eine Markerfunktion für die VTEC-Diagnostik zu, da dieser Virulenzfaktor in ihren Untersuchungen zu 89 % mit der Verotoxin-Produktion assoziiert war. BOCKEMÜHL et al. (1997) betonen demgegenüber jedoch die Unabdingbarkeit der Fokussierung auf das Verotoxin(-gen) und lehnen den Einsatz des Enterohämolysin-Agars als alleinige Screeningmethode ab, da in ihren Untersuchungen 24,8 % der Isolate keine Hämolyse zeigten. Ähnlich äußerten sich auch SCHMIDT und KARCH (1996), da 34 % der von ihnen untersuchten klinischen VTEC O111-Isolate keine Enterohämolyse zeigten.

#### 2.4.3.2 Katalase-Peroxidase (KatP)

BRUNDER et al. (1996) identifizierten auf pO157 einen 2208 bp umfassenden ORF, dessen vorhergesagte Aminosäuresequenz große Ähnlichkeit zur Familie der bifunktionalen Katalase-Peroxidasen aufweist. Um den mutmaßlichen Virulenzfaktor von der chromosomal codierten Katalase-Peroxidase abzugrenzen, wurde er KatP genannt, wobei „P“ den plasmidalen Ursprung verdeutlicht. Durch Schutz vor oxidativem Streß könnte das 81,8 kDa umfassende Enzym einen Beitrag zur Virulenz leisten. Aufgrund einer N-terminal gelegenen Signalsequenz wird vermutet, daß KatP durch die zytoplasmatische Membran transportiert wird. Es kann bei einer Vielzahl verschiedener VTEC-Serogruppen nachgewiesen werden (BRUNDER, 1999; FRUTH et al., 2002). GALLIEN et al. (1998) detektierten *katP* bei 21,2 % der Milch- und 40,0 % der Stuhl-Isolate, jedoch nicht bei Stämmen aus Fleisch oder Fleischerzeugnissen.

#### 2.4.3.3 Serin-Protease (EspP)

Die extrazelluläre Serin-Protease EspP gehört zur Familie der sogenannten Autoporter, die bei verschiedenen gramnegativen Pathogenen zu finden sind (BRUNDER et al., 1997). Prototyp dieser auch als Typ IV-Sekretionssystem bekannten Proteine ist die IgA1-Protease von *Neisseria gonorrhoe*. Die Fähigkeit, ihre Ausschleusung aus der Bakterienzelle selbst zu vermitteln, war namensgebend für diese Gruppe (JOSE et al., 1995; FINLAY und FALKOW, 1997).

Das 3.900 bp umfassende *espP*-Gen codiert für ein Vorläufer-Protein, welches während der Sekretion durch N- und C-terminale Prozessierung zur 104 kDa großen EspP-Protease reift. Diese ist in der Lage, Pepsin A sowie den Gerinnungsfaktor V zu spalten. Letzteres könnte *in vivo* zu einer Verstärkung des hämorrhagischen Krankheitsbildes führen (BRUNDER et al., 1997). BOERLIN et al. (1999) konnten jedoch keinen Zusammenhang zwischen EspP und klinischer Erkrankung feststellen. DJAFARI et al. (1997) berichteten ebenfalls über ein 104 kDa großes Polypeptid, welches eine starke Ähnlichkeit zu Autoporter-Proteinen sowie Serinprotease-Aktivität aufwies und **Pssa** genannt wurde. BRUNDER et al. (1999) konnten zeigen, daß sich Pssa und EspP in nur einem Aminosäurerest an Position 1113 unter-

scheiden. Diese Autoren konnten *espP* bei einer Vielzahl unterschiedlicher VTEC-Serotypen nachweisen, insgesamt beherbergten 57 % der untersuchten VTEC-Stämme dieses potentielle Virulenzgen; bei anderen *E. coli*-Pathovaren war es jedoch nicht nachweisbar. GALLIEN et al. (1998) detektierten *espP* in 51,5 % der Milch-, 45,3 % der Fleisch-, 33,3 % der Wurst- sowie 50,0 % der Stuhl-VTEC-Isolate.

#### 2.4.3.4 EHEC type II secretion pathway (*etp*)

Typ II-Sekretionssysteme sind bei gramnegativen Bakterien ebenfalls weit verbreitet. Die Ausschleusung der Moleküle erfolgt hier in zwei separaten Schritten, zunächst durch die innere, anschließend durch die äußere Bakterienmembran. Als Prototyp gilt das Pullulanase-System von *Klebsiella* sp. (FINLAY und FALKOW, 1997). SCHMIDT et al. (1997a) entdeckten auf dem pO157-Plasmid 13 ORF, die große Ähnlichkeit zu diesen *pul*-Genen aufwiesen. In Anlehnung an deren Nomenklatur wurden die neu entdeckten Sequenzen mit *etpC* bis *etpO* in alphabetischer Reihenfolge bezeichnet, wobei *etp* für „EHEC type II secretion pathway“ steht. Die Autoren konnten das *etp*-Gencluster bei 100 % der untersuchten *E. coli* O157:H7-Stämme, bei 60 % der EHEC-Stämme anderer Serovare sowie bei 10 % der VTEC-Isolate bovinen Ursprungs detektieren. Ebenso wie die anderen pO157-assoziierten Virulenzfaktoren waren sie jedoch nicht bei *E. coli*-Stämmen anderer Pathovare nachzuweisen. GALLIEN et al. (1998) fanden *etpD* in 33,3 % der Milch-, 3,1 % der Fleisch- sowie 62,9 % der Stuhl-VTEC-Isolate.

LATHEM et al. (2002) beschrieben eine Metalloprotease, welche durch das Typ II-Sekretionssystem sezerniert wird. **StcE** (secreted protease of C1 esterase inhibitor from EHEC) spaltet C1-Esterase-Inhibitor, eine Hauptkomponente der klassischen Komplementkaskade. Die Metalloprotease konnte in aktiver Form in Stuhlproben eines mit *E. coli* O157:H7 infizierten Patienten nachgewiesen werden. Die Autoren vermuteten, daß durch lokalisierte proinflammatorische Reaktionen und Koagulation Gewebsschädigung, intestinale Ödeme und thrombotische Störungen hervorgerufen werden könnten. Neuere Ergebnisse weisen jedoch darauf hin, daß StcE sowohl *E. coli* O157-Zellen, als auch deren Wirtszellen vor Komplement-vermittelter Lyse und inflammatorischer Schädigung schützen könnte (LATHEM et al., 2004).

#### 2.4.3.5 ToxB

Auf pO157 des Referenzstammes EDL 933 konnte ein Gen identifiziert werden, welches starke Ähnlichkeit mit dem ToxB-Gen von *Clostridium difficile* aufwies (BURLAND et al., 1998). Auch der *E. coli* O157 „Sakai“-Stamm beherbergt ein solches Gen. Nach den Ergebnissen von TATSUNO et al. (2001) scheint ToxB zur Adhärenz der *E. coli* O157-Zellen an Epithelzellen beizutragen, indem es die Produktion und/oder Sekretion von über das Typ III Sekretionssystem sezernierten Proteinen fördert. Die Aminosäuresequenz von ToxB zeigt außerdem deutliche Homologien zu *efa1/lifA* (KLAPPROTH et al., 2000; NICHOLLS et al., 2000).

#### 2.4.3.6 STEC autoagglutination adhesin (*Saa*)

*Saa* (STEC autoagglutination adhesin) ist ein 460-534 Aminosäuren umfassendes, Plasmid-codiertes Adhäsion, welches erstmals von PATON et al. (2001) bei einem HUS-Ausbruchsstamm des Serotyps O113:H21 beschrieben wurde. Besondere Auf-

merksamkeit wurde diesem potentiellen Virulenzfaktor aufgrund der Tatsache zuteil, daß dem untersuchten HUS-Isolat die Pathogenitätsinsel LEE fehlte, deren Geneprodukte die Adhäsion der Bakterienzellen an das Darmepithel vermitteln. Über die Adhäsionsmechanismen solcher LEE-negativer EHEC-Isolate war wenig bekannt; das neu beschriebene Adhäsion stellte somit einen potentiellen Kandidaten zur Differenzierung hochvirulenter von weniger virulenten Stämmen innerhalb der LEE-negativen VTEC dar. Neuere Ergebnisse weisen jedoch nicht darauf hin, daß das Vorkommen von *saa* mit schweren Krankheitsverläufen assoziiert ist (JENKINS et al., 2003; FRIEDRICH et al., 2003).

*Saa* konnte mittlerweile bei einer Vielzahl unterschiedlicher Serotypen nachgewiesen werden. Allen Isolaten gemeinsam ist das Fehlen des LEE; die meisten beherbergen jedoch das ebenfalls Plasmid-codierte Enterohämolysin-Gen (PATON et al., 2001; FRIEDRICH et al., 2003; JENKINS et al., 2003; ZWEIFEL et al., 2004). Weiterhin ist es häufig mit der Verotoxin-Variante VT 1c assoziiert (FRIEDRICH et al., 2003; ZWEIFEL et al., 2004). *Saa*-positive Stämme wurden bei HUS- und Diarrhöe-Patienten sowie symptomlosen Ausscheidern, bei Rindern und Schafen sowie in Meeresfrüchten identifiziert (FRIEDRICH et al., 2003; JENKINS et al., 2003; KUMAR et al., 2004; ZWEIFEL et al., 2004).

#### 2.4.3.7 Subtilase-Zytotoxin

Kürzlich wurde von PATON et al. (2004) ein neuartiges Zytotoxin mit AB<sub>5</sub>-Struktur beschrieben, welches sich keiner bislang bekannten Toxinfamilie zuordnen läßt. Die 35 kD umfassende A-Untereinheit stellt eine Subtilase-ähnliche Serin-Protease dar; die pentamerartig angeordneten, 13 kD großen B-Untereinheiten binden an GM2-ähnliche Strukturen. *SubA*- und *subB*-Gene konnten bei 32 von 68 untersuchten VTEC-Stämmen nachgewiesen werden, u. a. bei einem *E. coli* O113:H21-Stamm, welcher bei einem HUS-Ausbruch isoliert wurde. Im Tierversuch führte die orale Verabreichung von *subA*- und *subB*-exprimierenden *E. coli* K12-Stämmen zu hochgradigen Gewichtsverlusten. Die intraperitoneale Toxin-Injektion führte bei Mäusen zu mikrovaskulärer Thrombose sowie Nekrosen in Gehirn, Niere und Leber und verursachte den Tod der Tiere. Nach Ansicht der Autoren deuten diese Ergebnisse auf einen möglichen Beitrag des neuartigen Toxins zur Pathogenese humaner Erkrankungen hin.

### 2.4.4 Weitere (mögliche) Virulenzfaktoren

#### 2.4.4.1 Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin (EAST1)

Wie der Name vermuten läßt, wurde EAST1 zuerst bei EAggEC-Stämmen identifiziert (SAVARINO et al., 1991), konnte mittlerweile jedoch auch bei anderen *E. coli*-Pathovaren wie VTEC, EPEC und ETEC regelmäßig nachgewiesen werden (SAVARINO et al., 1996; PAIVA DE SOUSA und DUBREUIL, 2001; s. auch Kapitel 2.2.5). Das Molekulargewicht dieses durch das *astA*-Gen codierten Proteins beträgt 4.104 Da (MENARD et al., 2004), seine klinische Bedeutung bei VTEC-Infektionen ist jedoch noch unklar (NATARO und KAPER, 1998).

#### 2.4.4.2 Cytolethal distending toxin (CDT)

Wie bereits in Kapitel 2.2.8 geschildert, ist dieser potentielle Virulenzfaktor bei verschiedenen *E. coli*-Pathovaren nachweisbar, so auch bei den VTEC. Bei *E. coli* O157-Stämmen wurde bislang ausschließlich die Variante CDT V gefunden, besonders häufig bei Sorbit-fermentierenden EHEC O157:H<sup>-</sup> (87 %), in deutlich geringerer Prozentzahl auch bei den klassischen EHEC O157:H7 (6 %; JANKA et al., 2003). Nach Arbeiten von BIELASZEWSKA et al. (2004) tritt bei VTEC der Serotypen O73:H18, O91:H21 und O113:H21 ebenfalls ein chromosomal codiertes Homolog dieser Toxinvariante auf, während bei VTEC O153:H18 der Plasmid-codierte Toxintyp CDT III nachgewiesen wurde. CDT I, CDT II und CDT IV konnten in dieser Untersuchung nicht identifiziert werden. Insgesamt waren 17 von 340 untersuchten non-O157-VTEC CDT-positiv, dabei handelte es sich ausschließlich um *eae*-negative Isolate. Innerhalb der *eae*-negativen STEC war das Vorkommen von *cdt* signifikant mit Erkrankung assoziiert. BIELASZEWSKA et al. (2005a) konnten kürzlich zeigen, daß CDT V humane Endothelzellen durch Blockade des Zellzyklus in der G<sub>2</sub>/M-Phase irreversibel schädigt und somit zur Pathogenese EHEC-assoziiierter Erkrankungen beitragen könnte.

### 2.5 EHEC-Erkrankungen beim Menschen

Die Erstbeschreibung von *E. coli* O157:H7 als Krankheitserreger erfolgte 1983 durch RILEY et al. Die Autoren beschrieben zwei Ausbrüche von hämorrhagischer Colitis in den USA, welche mit dem Verzehr von Sandwiches in Fast Food-Restaurants assoziiert waren und bei denen 47 Personen erkrankten. Dieser Serotyp war bis dahin nur selten in Erscheinung getreten; in den Aufzeichnungen des CDC fand sich der Hinweis auf einen *E. coli* O157:H7-Stamm aus dem Jahr 1975, der von einer Patientin mit blutiger Diarrhöe isoliert worden war (RILEY et al., 1983). Im gleichen Jahr berichteten KARMALI et al. (1983) von Verotoxin-produzierenden *E. coli* bei mehreren sporadischen Fällen von hämolytisch-urämischem Syndrom (HUS). Retrospektiv ließ sich auch ein mit dem Verzehr von „apple cider“ assoziierter HUS-Ausbruch in Kanada im Jahr 1980 mit *E. coli* O157:H7 assoziieren (LUEDTKE und POWELL, 2002).

#### 2.5.1 Krankheitsbild

Wie bei allen Infektionskrankheiten ist die Ausprägung der klinischen Symptomatik abhängig von der Virulenz des infizierenden Stammes und der Empfänglichkeit des Patienten (ROLLE und MAYR, 1993; MORRIS und POTTER, 1997). Während viele VTEC-Infektionen des Menschen als milde Gastroenteritis verlaufen und deshalb nicht als solche diagnostiziert werden, können insbesondere bei Säuglingen, Kleinkindern, alten und abwehrgeschwächten Menschen lebensbedrohliche Krankheitsbilder und Komplikationen auftreten (RKI und BgVV, 2001).

Nach einer Inkubationszeit von durchschnittlich 1-3 (-8) Tagen entwickelt sich wäßriger Durchfall, der im Verlauf der Erkrankung zunehmend blutig werden kann.

Typisch sind Übelkeit, Erbrechen und Abdominalschmerz, wohingegen Fieber nur selten zu beobachten ist (SLUTSKER et al., 1997; RKI und BgVV, 2001). In ca. 10-20 % der Fälle entwickelt sich das Krankheitsbild der **hämorrhagischen Colitis (HC)**, welches durch starke Leibschmerzen und blutigen Stuhl und oftmals auch Fieber gekennzeichnet ist (RILEY et al., 1983; RKI und BgVV, 2001).

In ca. 5-10 % der symptomatischen EHEC-Erkrankungen treten extraintestinale Komplikationen wie HUS oder thrombotisch-thrombozytopenische Purpura (TTP) auf (RKI, 2001a). Das Krankheitsbild des **HUS** wurde zuerst von GASSER et al. (1955) beschrieben und ist durch hämolytische Anämie, Thrombozytopenie sowie akutes Nierenversagen charakterisiert („komplettes HUS“). In ca. 90 % der Fälle handelt es sich um ein sogenanntes „enteropathisches HUS“, d. h. es geht eine Diarrhöe-Episode voraus (SIEGLER, 1995; GERBER et al., 2002). Hauptursache für HUS stellen VTEC-Infektionen dar (SIEGLER, 1995); eine derartige Assoziation ist in 68-83 % der Fälle nachweisbar (BANATVALA et al., 2001; GERBER et al., 2002; GIANVITI et al., 2003). Daneben sind noch andere, jedoch weitaus seltenere Assoziationen beschrieben worden, u. a. Infektionen mit Shigellen und verschiedenen Viren (LEE et al., 1998).

HUS betrifft vor allem Kinder; zum überwiegenden Teil sind Kleinkinder unter fünf Jahren betroffen. Die klinischen Symptome setzen im Schnitt fünf Tage nach Beginn der Diarrhöe ein. Aufgrund des akuten Nierenversagens werden ca. 60 % der Patienten dialysepflichtig. Anurie, Hypertonie sowie neurologische Symptome können ebenfalls auftreten. Die Mortalitätsrate beträgt ca. 5 % (BANATVALA et al., 2001; ELLIOTT et al., 2001a; GERBER et al., 2002; s. Tabelle 9). Von Spätfolgen wie verminderter glomerulärer Filtrationsrate, Proteinurie und Hypertonie wird in unterschiedlichen Anteilen berichtet (SIEGLER, 1995; HUSEMAN et al., 1999; SMALL et al., 1999; BLÁHOVÁ et al., 2002; GARG et al., 2003; ZIMMERHACKL, 2004; s. Tabelle 10). Über die Indikatoren für eine schlechte renale Prognose bestehen unterschiedliche Ansichten (s. Tabelle 10), jedoch werden in diesem Zusammenhang mehrfach das Fehlen einer vorausgehenden Diarrhöe-Episode sowie die Nicht-Nachweisbarkeit von VTEC-Infektionen aufgeführt (GIANVITI et al., 2003; ZIMMERHACKL, 2004). Die Erregerausscheidung dauert im Schnitt ca. 5-20 Tage, kann aber im Einzelfall auch mehrere Monate betragen (RKI und BgVV, 2001).

Bei adulten Patienten tritt eher das klinische Bild der **TTP** auf, welches bereits in den 20er Jahren von MOSHCOWITZ (1925) beschrieben wurde. Pathogenetisch zählt es wie HUS zu den thrombotischen Mikroangiopathien, das Krankheitsbild ist jedoch stärker durch neurologische Symptomatik geprägt (BANATVALA et al., 2001; RUGGENENTI et al., 2001).

**Tabelle 9:** Vergleich verschiedener Studien zum hämolytisch-urämischem Syndrom (HUS; Prozentangaben nicht immer auf Gesamtkollektiv bezogen)

Quelle	<b>BANATVALA et al., 2001</b>	<b>GERBER et al., 2002</b>	<b>ELLIOTT et al., 2001a</b>
Land	USA <sup>1)</sup>	Österreich und Deutschland	Australien
Untersuchungszeitraum	1987-1991	1997-2000	1994-1998
Krankheitsbild	D <sup>+</sup> HUS <sup>2)</sup>	HUS	D <sup>+</sup> HUS, sporadisch
Patientenkollektiv	n = 83 keine Alters- beschränkung	n = 394 < 21 Jahre	n = 64 < 15 Jahre
Alter	4 Jahre <sup>^</sup>	2,9 Jahre <sup>°</sup>	30 Monate <sup>^</sup>
Anteil < 5 Jahre	55 %	72 %	77 %
Symptome	abdominale Schmerzen	78 %	k. A. <sup>3)</sup>
	Diarrhöe	k. A.	91 %
	blutige Diarrhöe	73 %	57 %
	Anurie	k. A.	40 %
	neurologische Symptome	25 %	25 %
	Bluthochdruck	k. A.	15 %
	respiratorische Symptome	22 %	k. A.
Therapie	Dialyse [Dauer]	55 %	55 %
	Erythrozyten-Transfusion	37 %	61 % [10 Tage <sup>°</sup> ]
	Thrombozyten-Transfusion	k. A.	75 %
	Plasmapherese	k. A.	16 %
Todesfälle	7 %	9 %	k. A.
VTEC-Assoziation (*serologisch, #kulturell)	72 %* #	2 %	3 %
Serovare	O157:H7	73 %	83 %* #
	O157:H <sup>-</sup>	10 %	31 % <sup>#</sup>
	O26:H11/H <sup>-</sup>	3 %	0 %
	O111:H <sup>-</sup>	3 %	10 %
	O145:H <sup>-</sup>	0 %	15 %

<sup>1)</sup> Vereinigte Staaten von Amerika

<sup>4)</sup> nur Diarrhöe-assoziiertes HUS einbezogen

<sup>2)</sup> Diarrhöe-assoziiert

<sup>^</sup> Median

<sup>3)</sup> keine Angabe

<sup>°</sup> Durchschnitt

Tabelle 10: Langzeitfolgen bei hämolytisch-urämischem Syndrom

Quelle	Patienten-kollektiv	Abstand zur Akutphase	Spätfolgen	Risikofaktoren
SIEGLER, 1995	[Review]	k. A. <sup>1)</sup>	30-50 % milde chronische Nierenschäden	k. A.
HUSEMAN et al., 1999	n = 127 D <sup>+</sup> HUS <sup>2)</sup>	5 Jahre [Median]	23 % renale Spätfolgen (Proteinurie, Bluthochdruck, verminderte glomeruläre Filtrationsrate)	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Anurie &gt; 7 Tage</li> <li>▪ Bluthochdruck während Akutphase</li> <li>▪ effektiver renaler Plasmafluß im 2. Jahr reduziert</li> </ul>
SMALL et al., 1999	n = 92 D <sup>+</sup> HUS	1 Jahr	1 % chronische Peritonealdialyse 5 % mittlere bis schwere Niereninsuffizienz 22 % milde Niereninsuffizienz	k. A.
BLÁHOVÁ et al., 2002	n = 18 D <sup>+</sup> HUS	> 10 Jahre	39 % renale Symptome (Hämaturie, Proteinurie, Bluthochdruck, mittlere Niereninsuffizienz) 25 % chronische Niereninsuffizienz, Nierenversagen, Dialyse, Transplantation	▪ Alter > 2 Jahre
GARG et al., 2003	[Review] n = 3.476 D <sup>+</sup> HUS	4 Jahre [Durchschnitt]	25 % verminderte glomeruläre Filtrationsrate, Bluthochdruck, Proteinurie	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ schwerwiegender Verlauf in der Akutphase (neurologische Symptome, Dialysepflicht)</li> </ul>
ZIMMERHACKL, 2004	n = 388	1 Jahr	35 % Proteinurie, arterielle Hypertonie etc.	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Dialysepflicht</li> <li>▪ fehlender Durchfall</li> <li>▪ fehlender EHEC<sup>3)</sup>-Nachweis</li> </ul>

<sup>1)</sup> keine Angabe

<sup>2)</sup> Diarrhöe-assoziiertes hämolytisch-urämisches Syndrom

<sup>3)</sup> enterohämorrhagische *Escherichia coli*

Neben diesen klinischen Verlaufsformen unterschiedlichen Schweregrades können VTEC-Infektionen jedoch auch symptomlos verlaufen. So konnten STEPHAN et al. (2000) bei 3,5 % der untersuchten Mitarbeiter fleischverarbeitender Betriebe Verotoxin-Gene im Stuhl nachweisen. Auch unter Kontaktpersonen von HUS-Patienten wurden symptomose Ausscheider gefunden (RKI, 1997; LUDWIG et al., 2002). SILVESTRO et al. (2004) wiesen bei 1,1 % der untersuchten landwirtschaftlich tätigen Personen VTEC der Serogruppe O157 nach. Dies stützt die Hypothese, wonach Bauernhof-Bewohner oftmals eine Immunität gegenüber *E. coli* O157 entwickeln, indem sie wiederholt mit weniger virulenten VTEC-Stämmen in Kontakt kommen. Die Dauer der Ausscheidung kann mehrere Wochen betragen (RKI, 2001b). GAREIS et al. (2000) beschrieben einen Fall intermittierender Langzeitausscheidung von nahezu zehn Wochen.

### 2.5.2 Therapie

Die antimikrobielle Therapie von EHEC-Erkrankungen ist in der Literatur umstritten. In zahlreichen Untersuchungen konnte belegt werden, daß verschiedene antimikrobiell wirksame Stoffe die Produktion bzw. Freisetzung von Verotoxinen verstärken (KARCH et al., 1986; WALTERSPIEL et al., 1992; ZHANG et al., 2000). Nach einer Studie von WONG et al. (2000) erhöht eine Antibiotika-Therapie das HUS-Risiko. SAFDAR et al. (2002) konnten jedoch in einer Meta-Analyse der vorhandenen Literaturdaten keinen Zusammenhang zwischen Antibiotikatherapie von *E. coli* O157:H7-Infektionen und erhöhtem HUS-Risiko darstellen. Japanische Arbeitsgruppen berichteten, daß eine frühzeitige Fosfomycin-Therapie innerhalb der ersten beiden Tage nach Einsetzen der klinischen Symptome die Ausprägung von HUS verhindern könne (IKEDA et al., 1999). RKI und BgVV (2001) betrachten im „Merkblatt für Ärzte“ eine antibiotische Therapie bei EHEC-Infektionen als nicht angezeigt.

Bei der Behandlung von VTEC-Enteritiden steht die Infusionstherapie im Vordergrund (TARR und NEILL, 2001); diese kann bei frühzeitigem Einsatz auch den Verlauf einer HUS-Erkrankung abmildern (KARCH, 2004, persönliche Mitteilung). HUS und TTP können bislang nur symptomatisch behandelt werden. Neben forcierter Diurese kommt die Hämo- oder Peritonealdialyse zur Anwendung. Bei atypischen Verlaufsformen des HUS sowie bei TTP wird eine Plasmapherese durchgeführt (RKI und BgVV, 2001).

Die spezifische Therapie von EHEC-Erkrankungen ist gegenwärtig Gegenstand der Forschung. Ansatzpunkt ist die Entwicklung Verotoxin-bindender und -inaktivierender Agenzien, wie synthetischer Verotoxin-Rezeptor-Analogs, rekombinanter, Gb<sub>3</sub>-Trisaccharide-exprimierender Bakterien, sowie monoklonaler Anti-VT-Antikörper (McCONNACHIE und TODD, 2004). Ausgangspunkt war die Entwicklung von SYNSORB Pk (SYNSORB Biotech Inc., Calgary, Alberta, Kanada) Mitte der 90er Jahre. Dieses synthetische, oral zu verabreichende Molekül besteht aus Trisaccharidresten des Gb<sub>3</sub>-Rezeptors, welche kovalent an kalziniertes Silikon-Material gebunden sind. Eine klinische Phase 2-Studie mit EHEC-assoziierten Diarrhöe-Erkrankten erbrachte jedoch keine schlüssigen Ergebnisse (ARMSTRONG et al., 1998), eine Phase 3-Studie wurde ohne Angabe von Gründen vorzeitig abgebrochen

(KARMALI, 2004). Eine Verminderung des Krankheitsschweregrades bei HUS-Patienten durch die Gabe von SYNSORB Pk konnte in klinischen Studien ebenfalls nicht nachgewiesen werden (TRACHTMAN et al., 2003). Einen ähnlichen Ansatz verfolgte eine japanische Arbeitsgruppe mit der Entwicklung dendritischer Polymere, an welche Gb<sub>3</sub>-Trisaccharide in unterschiedlicher Anzahl und Ausrichtung gebunden sind. Die intravenöse Verabreichung einer solchen als „SUPER TWIG“ bezeichneten Substanz bewirkte im Maus-Modell Schutz vor einer tödlichen Dosis *E. coli* O157:H7 (NISHIKAWA et al., 2002). Diese konnte auch für eine oral zu verabreichende Substanz namens „Gb<sub>3</sub>-Polymer“ gezeigt werden, bei welchem die Gb<sub>3</sub>-Trisaccharid-Reste über Spacer-Substanzen an lineare Acrylamid-Polymere gebunden vorliegen. Im Maus-Modell konnte weiterhin eine Verminderung des Verotoxingehaltes im Blut beobachtet werden, was möglicherweise auf eine effektive Bindung des Verotoxins im Darmlumen hindeutet (WATANABE et al., 2004). Alle diese neueren Toxinbindenden Substanzen wurden bislang nur im Tierversuch getestet; klinische Studien werden erwartet (McCONNACHIE und TODD, 2004).

Einen anderen Ansatz wählten PATON et al (2000). Sie entwickelten einen rekombinanten *E. coli*-Stamm, welcher ein Gb<sub>3</sub>-Rezeptor-Analogen auf seiner Oberfläche exprimiert. Seine Wirksamkeit konnte im Maus-Modell gezeigt werden. Da es sich dabei jedoch um einen pathogenen Stamm handelt, der zudem ein Plasmidcodiertes Antibiotika-Resistenzgen beherbergt, ist er für die Anwendung beim Menschen ungeeignet. PINYON et al. (2004) stellten kürzlich eine apathogene Weiterentwicklung eines solchen „probiotischen“ Bakteriums vor, welcher in Humanstudien zum Einsatz kommen soll.

Als dritte Möglichkeit ist die Anwendung von monoklonalen Antikörpern zu nennen. SHEORAN et al. (2003) stellten einen Antikörper namens 5C12 vor, welcher gegen die A-Untereinheit von Verotoxin 2 inklusive seiner Varianten gerichtet ist und sich im Maus-Modell nach parenteraler Applikation als wirksam erwies. Ein möglicher Vorteil der systemischen Applikation von monoklonalen Antikörpern wird in der potentiellen Wirksamkeit gegen bereits aus dem Darmlumen resorbiertes Verotoxin gesehen, was ein therapeutisches Eingreifen zu einem vergleichsweise späten Zeitpunkt des Infektionsgeschehens ermöglichen könnte. Demgegenüber erscheint das therapeutisch nutzbare Zeitfenster bei oraler Verabreichung von Verotoxin-bindenden Substanzen oder rekombinanten Bakterien vergleichsweise begrenzt; solche Behandlungen könnten jedoch in einem Ausbruchsgeschehen prophylaktisch bei gefährdeten Kontaktpersonen in der Inkubationszeit zum Einsatz kommen (McCONNACHIE und TODD, 2004).

### 2.5.3 Kosten

ROBERTS et al. (2000) untersuchten die ökonomischen Auswirkungen eines *E. coli* O157:H7-Ausbruchs, der 1994 in Schottland auftrat und auf den Verzehr von Milch einer lokalen Molkerei zurückgeführt wurde. 71 Personen erkrankten, darunter 10 an HUS und eine an TTP; ein Patient verstarb. Die Kostenschätzung ist in Tabelle 11 wiedergegeben. Sie berücksichtigt sowohl Behandlungs-, Krankenhaus- und Pflegekosten, als auch Ausbruchaufklärung, Arbeitsausfall und Todesfälle. Weiterhin

wurden die aufgrund von zu erwartenden Spätfolgen in den nächsten Jahrzehnten noch anfallenden Kosten hochgerechnet.

**Tabelle 11:** Geschätzte Kosten für einen *E. coli* O157:H7-Ausbruch in Schottland (ROBERTS et al., 2000)

	<b>geschätzte Kosten</b>	
HUS-Fall <sup>1)</sup>	62.353 £	pro Fall
TTP-Fall <sup>2)</sup>	21.422 £	"
non-HUS-, non-TTP-Fall	1.030 £	"
Kosten über 30 Jahre	168.032 £	"
Ausbruchsuntersuchung und -management	171.848 £	gesamt

<sup>1)</sup> hämolytisch-urämisches Syndrom

<sup>2)</sup> thrombotisch-thrombozytopenische Purpura

Auch für einen *E. coli* O157:H7-Ausbruch, der 1996 an einer japanischen Schule auftrat, wurde eine Kostenabschätzung publiziert. 268 Personen erkrankten nach Verzehr einer Schulmahlzeit, zehn davon mußten stationär behandelt werden. Extra-intestinale Komplikationen wie HUS wurden allerdings nicht diagnostiziert, es traten keine Todesfälle ein. Die Kostenschätzung ist in Tabelle 12 wiedergegeben.

Die Autoren schätzen die Gesamtkosten des Ausbruchs als vergleichsweise niedrig ein, da nur wenige Patienten stationäre Versorgung benötigten. Erfahrungsgemäß verursacht die Behandlung von schwerwiegenden Krankheitsverläufen wie HUS einen erheblichen Kostenaufwand (ABE et al., 2002).

**Tabelle 12:** Geschätzte Kosten für einen *E. coli* O157:H7-Ausbruch in Japan (ABE et al., 2002)

	<b>geschätzte Kosten</b>	
<b><u>Ökonomische Verluste</u></b>		
Kosten durch Erkrankungsfälle	12.712.000 Yen	15,4 %
medizinische Kosten	6.600.000 Yen	
Arztbesuche	4.239.000 Yen	
stationäre Behandlung	2.361.000 Yen	
Versicherungszahlungen	5.960.000 Yen	
Transportkosten für medizinische Behandlungen	152.000 Yen	
Laborkosten	21.204.000 Yen	25,6 %
Meetings für Ausbruchsauflärung und -management	1.590.000 Yen	1,9 %
Produktivitätskosten (Verdienstaufschlag von Familienangehörigen)	3.291.000 Yen	4,0 %
<b><u>Indirekte ökonomische Folgen</u></b>		
Kosten für nicht gekaufte Mahlzeiten	16.048.000 Yen	19,4 %
Personalkosten für Küchenpersonal	14.318.000 Yen	17,3 %
Ausgaben für Strom-, Gas- und Wasserversorgung	851.000 Yen	1,0 %
Renovierungskosten	12.672.000 Yen	15,3 %
<b>Gesamtkosten</b>	<b>82.686.033 Yen</b>	<b>100,0 %</b>

## 2.5.4 Vorkommen

Seit der Erstbeschreibung 1983 in den USA treten VTEC-Infektionen weltweit in Erscheinung, v. a. in Industrienationen (WHO, 1997). In Tabelle 13 sind die publizierten Inzidenzraten verschiedener Länder zusammengetragen. Diese sind allerdings nur bedingt vergleichbar, da zum einen das Surveillance- und Meldesystem zwischen den Ländern differiert (Erreger: VTEC allgemein oder *E. coli* O157; Population: Gesamtpopulation oder Kinder; Parameter: Erregernachweis oder HUS-Erkrankung). Zum anderen bestehen teilweise erhebliche Unterschiede bei der Nachweismethodik sowie den Indikationen zur Durchführung der Diagnostik (SCVPH, 2003). Auffällig sind allerdings Unterschiede in der Erregerpopulation: Während beispielsweise in Kontinentaleuropa non-O157-VTEC bei humanen Erkrankungsfällen dominieren, scheint in Nordamerika und Großbritannien der Serotyp O157:H7 vorzuherrschen (WHO, 1997; LOCKING et al., 2003; s. auch Tabelle 14).

In den Tabellen 14 bis 16 sind exemplarisch einige Ausbrüche aufgelistet. Aus afrikanischen Ländern liegen vergleichsweise wenig Daten vor, jedoch wird auch hier von sporadischen VTEC-Infektionen sowie von Ausbrüchen berichtet (EFFLER et al., 2001; OKEKE et al., 2003).

**Tabelle 13:** Inzidenzen von hämolytisch-urämischem Syndrom (HUS) sowie von Infektionen mit Verotoxin-bildenden *E. coli* (VTEC) und *E. coli* O157 im internationalen Vergleich

Land <sup>1)</sup>	Inzidenz <sup>2)</sup> [pro 100.000]	Population	Quelle
<b><u>HUS</u></b>			
AUS	1,4	< 5 Jahre	ELLIOTT et al., 2001a
I	0,8	"	TOZZI et al., 2003
F	1,8	"	DECLUDT et al., 2000
NZ	3,9	"	BAKER et al., 1999
RA	12,2	"	RIVERO et al., 2004
D	0,1	gesamt	RKI, 2004a
<b><u>VTEC</u></b>			
DK	18,2-23,2 <sup>#</sup>	< 5 Jahre	STATENS SERUM INSTITUT, 2003
"	4,0-8,1*	"	"
"	1,7-3,0 <sup>#</sup>	≥ 5 Jahre	"
"	0,3-0,4*	"	"
NZ	1,3	gesamt	BAKER et al., 1999
J	0,3-9,0	"	ANONYMOUS, 2004a
D	1,4 <sup>°</sup>	"	RKI, 2004a
<b><u>E. coli O157</u></b>			
GB [Schottland]	4,6-4,8	gesamt	LOCKING et al., 2003
USA	1,1-2,3	"	CDC, 2004

<sup>1)</sup> AUS: Australien      I: Italien      F: Frankreich      NZ: Neuseeland  
 RA: Argentinien      D: Deutschland      DK: Dänemark      J: Japan  
 GB: Großbritannien      USA: Vereinigte Staaten von Amerika

<sup>2)</sup> #: Regionen mit DNA-Sonden-Diagnostik      \*: Regionen mit herkömmlicher serologischer Diagnostik  
 °: ohne HUS-Fälle

Tabelle 14: Ausbrüche von Infektionen mit Verotoxin-bildenden *Escherichia coli* (VTEC) - Nordamerika

Land	Jahr	Vektor <sup>1)/„setting“</sup>	Serogruppe/ -typ	D/HC <sup>2)</sup>	HUS/TTP <sup>3)</sup> (%)	Tote (%)	Quelle
USA <sup>4)</sup>	1982	„Hamburger“	O157:H7	25	0	0	RILEY et al., 1983
	"	"	"	21	0	0	"
+ CDN <sup>5)</sup>	1996	unpasteurisierter Apfelsaft	"	45	12 (27)	0	CDC, 1996
	1999	„county fair“: Trinkwasser	"	128 (775) <sup>6)</sup>	k. A. <sup>7)</sup>	k. A.	BOPP et al., 2003
	"	Badewasser (See)	"	37	3 (8)	0	BRUCE et al., 2003
	"	„cheerleading camp“: Eis, Salat	O111:H8	58	2 (3)	0	CDC, 2000
	2000	Milchviehbetrieb: Kontakt mit Rindern	O157:H7	51	8 (16)	0	CDC, 2001
	2001	„county fair“: Gebäudeoberflächen, Sägemehl	SNF <sup>8)</sup> O157:H7	23	2 (9)	0	VARMA et al., 2003
CDN	1985	Pflegeheim: „Sandwiches“, „person-to-person“	O157:H7	73	12 (16)	17 (23)	CARTER et al., 1987
	1995	Krankenhaus: Eisbergsalat	"	21	0	0	PRESTON et al., 1997
	1999	Salami	O157	143	6 (4)	0	MCDONALD et al., 2004
	2001	Badewasser	O157:H7	4	0	0	BRUNEAU et al., 2004
	2002	Krankenhäuser: „food-handler“, Salat, „Sandwiches“	"	109	0	2 (2)	BOLDUC et al., 2004

1) nachgewiesen oder vermutet

2) Diarrhöe, hämorrhagische Colitis

3) hämolytisch-urämisches Syndrom/thrombotisch-thrombozytopenische Purpura

4) Vereinigte Staaten von Amerika

5) Kanada

6) 128 bestätigte, 775 vermutete Fälle (auch *Campylobacter jejuni* nachgewiesen)

7) keine Angaben

8) nicht Sorbit-fermentierend

**Tabelle 15:** Ausbrüche von Infektionen mit Verotoxin-bildenden *Escherichia coli* (VTEC) - Australien, Asien, Afrika

Land	Jahr	Vektor <sup>1)/„setting“</sup>	Serogruppe/ -typ	D/HC <sup>2)</sup>	HUS/ITP <sup>3)</sup> (%)	Tote (%)	Quelle
AUS <sup>4)</sup>	1995	Mettwurst	O111:H <sup>5)</sup>	k. A. <sup>5)</sup>	23	1	CDC, 1995
J <sup>6)</sup>	1996	Schulmahlzeiten: Rettichsprossen	O157:H7 <sup>7)</sup>	6561	101 (2)	2 (< 1)	WHO, 1996
"	"	Fabrik: Rettichsprossen	" <sup>7)</sup>	47	3 (6)	1 (2)	WATANABE et al., 1999
	2002	Restaurantkette: Rindfleisch	"	43	k. A.	k. A.	TSUJI et al., 2002
SD +ZA <sup>8)</sup>	1992	Wasser, kontaminiert durch Rinder-Kadaver und -Fäzes (starke Regenfälle nach Dürre)	O157	„Tausende“	„einige“	„einige“	ISAÄCSON et al., 1993
CN <sup>9)</sup>	k. A.	v. a. ältere Menschen (> 60 Jahre), keine Angaben zum Vektor	O157:H7	35	32 (91)	28 (80)	ZHANG et al., 2002a

<sup>1)</sup> nachgewiesen oder vermutet

<sup>4)</sup> Australien

<sup>7)</sup> identische Restriktionsmuster in Pulsfeldgelelektrophorese

<sup>2)</sup> Diarrhöe, hämorrhagische Colitis

<sup>5)</sup> keine Angaben

<sup>8)</sup> Swasiland und Südafrika

<sup>3)</sup> hämolytisch-urämisches Syndrom/thrombotisch-thrombozytopenische Purpura

<sup>6)</sup> Japan

<sup>9)</sup> Volksrepublik China

Tabelle 16: Ausbrüche von Infektionen mit Verotoxin-bildenden *Escherichia coli* (VTEC) - Europa

Land	Jahr	Vektor <sup>1)/„setting“</sup>	Serogruppe/ -typ	D/HC <sup>2)</sup>	HUS/TTP <sup>3)</sup> (%)	Tote (%)	Quelle
GB <sup>4)</sup> Schottland	1996/97	„Sandwiches“	O157	424	k. A. <sup>5)</sup>	17 (4)	COWDEN et al., 2001
	1997	Musikfestival: Schlamm	"	7	1 (14)	0	CRAMPIN et al., 1999
	1999	Festival auf Besuchsbauernhof: Speiseeis, Zuckerwatte	"	24	3 (13)	0	PAYNE et al., 2003
(F) <sup>6)</sup>	2002	Schülergruppe: Gurkensalat	"	10	0	0	DUFFELL et al., 2003
S <sup>7)</sup>	1995/96	k. A.	"	110	29 (26)	0	ZIESE et al., 1996
	1999	Pflegepersonal einer Kinderklinik, Party: Salat	"	37	0	0	WELINDER-OLSSON et al., 2003
DK <sup>8)</sup>	2003/04	Konsummilch	"	25	0	0	ANONYMOUS, 2004b
D <sup>9)</sup>	1988	k. A.	O157:H <sup>-</sup>	6	6 (100)	0	KARCH et al., 1990
	1992	Kindertagesstätte: „person-to- person“, diverse Lebensmittel (Personal Ausscheider)	SF <sup>10)</sup> O157:H7	41	3 (7)	1 (2)	REIDA et al., 1994
	1995/96	Mortadella, Teewurst	"	k. A.	45	7 [16] <sup>11)</sup>	RKI, 1996a;
	2000	Krankenhaus, Kindertagesstätte: Rinder-Seemerle	O26	6	0	0	AMMON et al., 1999 RKI, 2001b

<sup>1)</sup> nachgewiesen oder vermutet

<sup>2)</sup> Diarrhöe, hämorrhagische Colitis

<sup>3)</sup> hämolytisch-urämisches Syndrom/thrombotisch-thrombozytopenische Purpura

<sup>4)</sup> Großbritannien

<sup>5)</sup> keine Angaben

<sup>6)</sup> Reise nach Frankreich

<sup>7)</sup> Schweden

<sup>8)</sup> Dänemark

<sup>9)</sup> Deutschland

<sup>10)</sup> Sorbit-fermentierend

<sup>11)</sup> bezogen auf HUS-Fälle

### 2.5.4.1 Situation in Deutschland

Seit 1987 liegen Berichte über sporadische VTEC-Infektionen in Deutschland vor, wobei auch der Serotyp *E. coli* O157:H7 gefunden wurde (WUTHE, 1987; KARCH et al., 1987). Aus dieser Zeit stammen ebenfalls die ersten Nachweise von VTEC-Assoziationen bei HUS-Fällen (STENGER et al., 1988; BOCKEMÜHL et al., 1990; KARCH et al., 1990). Bundesweite Meldedaten nach dem IfSG liegen erst seit 2001 vor, wobei in der Statistik des RKI seit 2003 HUS-Fälle separat geführt werden; die Fallzahlen sind in Abbildung 1 dargestellt.

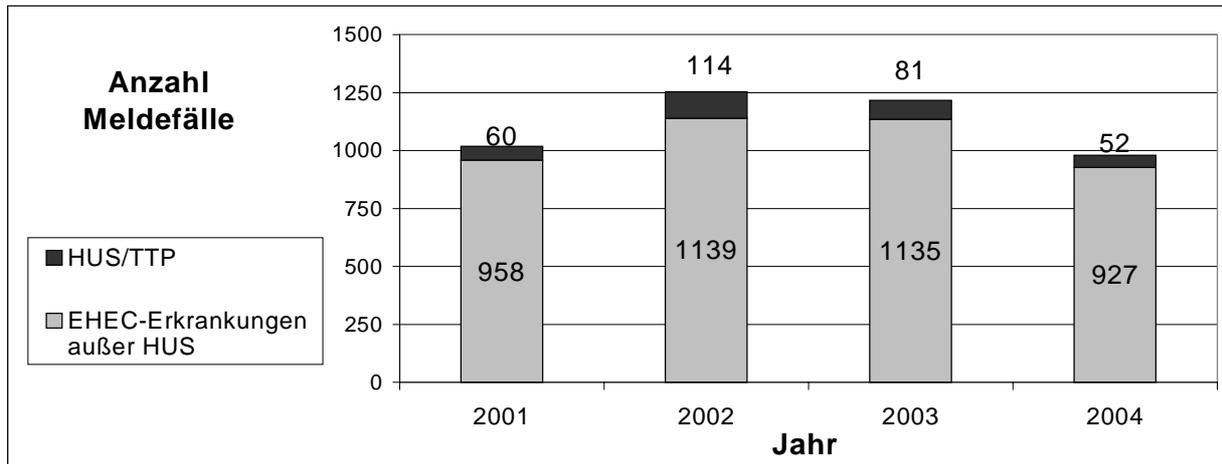


Abbildung 1: Nach Infektionsschutzgesetz übermittelte Meldungen an Erkrankungen mit enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC) sowie hämolytisch-urämischem Syndrom (HUS) und thrombotisch-thrombozytopenischer Purpura (TTP) für die Jahre 2001-2004 (RKI, 2002b; RKI, 2003b; RKI, 2004a; RKI, 2005: vorläufige Zahlen)

2003 lag damit die bundesweite Inzidenz von EHEC-Erkrankungen außer HUS bei 1,4 Erkrankungen pro 100.000 Einwohner, von HUS/TTP-Fällen bei 0,1 Erkrankungen pro 100.000 Einwohner (RKI, 2004a). Überdurchschnittlich hohe EHEC-Inzidenzraten sind in den Gebieten Friesland/Ostfriesland, Bremen, Ost-Eifel/Hunsrück, Sauerland/Eggegebirge, Südbayern, Ostalb, am Nordrand des Erzgebirges sowie im Elbtal zwischen Wittenberge und Lauenburg zu finden. In den Sommer- und Herbstmonaten werden überdurchschnittlich viele EHEC-Fälle gemeldet (RKI, 2002b; RKI, 2003b; RKI, 2004a); diese Saisonalität ist aus der Literatur gut bekannt (DOUGLAS und KURIEN, 1997; SIMMONS, 1997; WHO, 1997; BANATVALA et al., 2001). Der überwiegende Teil der Meldungen beinhaltet sporadische Fälle. Durch Veränderungen in den Strukturen der Lebensmittel-Industrie und damit einhergehender überregionaler Verteilung von Produkten scheint jedoch die Häufigkeit von diffusen Ausbrüchen zuzunehmen, die nicht immer als solche erkennbar sind (RKI, 2001b).

Erwartungsgemäß betreffen mehr als die Hälfte der EHEC-Erkrankungen Kinder unter fünf Jahren; bei isolierter Betrachtung der HUS-Fälle steigt dieser Anteil auf über 75 %. Ein zweiter Häufigkeitsgipfel bei höherem Lebensalter, wie aus anderen Ländern bekannt (SIMMONS, 1997), kann nicht verzeichnet werden. Die Autoren des RKI führen dies darauf zurück, daß bei adulten Diarrhöe-Patienten häufig keine mikrobiologische Stuhluntersuchung durchgeführt wird. Bei ca. 90 % der Meldungen

wird Deutschland als Infektionsland angegeben (RKI, 2002b; RKI, 2003b; RKI, 2004a).

In der Serovarverteilung zeigen sich deutliche Unterschiede zwischen den klinischen Krankheitsbildern: während bei HUS-Erkrankungen *E. coli* O157 dominiert (88 % der Meldungen, denen Angaben zum Serovar beigefügt waren), liegt diese Serogruppe bei EHEC-Erkrankungen ohne HUS zwar auch an erster Stelle, jedoch mit 21,7 % in einem deutlich geringeren Anteil. Auf die Serogruppen O103 und O26 entfallen 17,9 % bzw. 12,8 % der Meldungen, denen Angaben zum Serovar beigefügt waren (RKI, 2004a). Diese Serovarverteilung wird bereits seit mehreren Jahren beobachtet (BOCKEMÜHL et al., 1997; BOCKEMÜHL et al., 1998; FRUTH et al., 2002).

### 2.5.5 Pathogenese

#### **Magenpassage und *dosis infectiosa minima***

Nach oraler Aufnahme gelangen die VTEC-Zellen in den Magen, dessen saures Milieu bereits einen Bestandteil des wirtseigenen Abwehrsystems gegen enterale Erreger darstellt. *E. coli*-Stämme verfügen jedoch über verschiedene Säure-Adaptations-Systeme (Säure-induziertes oxidatives System, Säure-induziertes Arginin-abhängiges System, Glutamat-abhängiges System), welche ein Überleben bei pH-Werten von 2,5 und darunter ermöglichen (LIN et al., 1996; FOSTER, 2004). Insbesondere bei *E. coli* O157-Stämmen sind ausgeprägte Säuretoleranzen beschrieben worden. Einmal induziert, bleibt diese Säureresistenz auch bei Kühlung (Lebensmittel!) längere Zeit erhalten (LIN et al., 2003). Dabei reicht die Adaptationsgeschwindigkeit aus, um während der Magenpassage die Ausbildung einer Säuretoleranz zu ermöglichen (DE JONGE et al., 2003). Generell ist die Fähigkeit zur Säureadaptation bei enteralen Erregern negativ mit deren *dosis infectiosa minima* korreliert (LIN et al., 2003). Dementsprechend wurden für EHEC-Erkrankungen, insbesondere des Serotyps O157:H7, vergleichsweise niedrige minimale Infektionsdosen beschrieben (siehe Tabelle 17).

**Tabelle 17:** Geschätzte Infektionsdosen bei Ausbrüchen durch enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC)

Land <sup>1)</sup>	Vektor/„setting“	Serogruppe/-typ	Infektionsdosis [KbE] <sup>2)</sup>	Quelle
USA	Salami	O157:H7	< 50	TILDEN et al., 1996
"	Fast Food-Kette: „Hamburger-Patties“	"	< 700	TUTTLE et al., 1999
J	Grundschule: Schulmahlzeit	"	31-35	TEUNIS et al., 2004
AUS	Mettwurst	O111:H <sup>-</sup>	1 pro 10 g	PATON et al., 1996

<sup>1)</sup> USA: Vereinigte Staaten von Amerika

J: Japan

AUS: Australien

<sup>2)</sup> Kolonie-bildende Einheiten

### Kolonisierung des Darmes

EHEC sind nicht-invasive Mikroorganismen, welche nach der Magenpassage den Dünndarm kolonisieren. Dabei variieren die Ädhäsionsmechanismen bei den verschiedenen EHEC-Stämmen in Abhängigkeit von ihrem Virulenzprofil. LEE-positive Stämme bilden die in Kapitel 2.4.2.1 beschriebenen „attaching and effacing“-Läsionen aus. Der Gewebstropismus wird dabei maßgeblich vom Intimin-Subtyp beeinflusst; so adhären *E. coli* O157:H7-Stämme an das Follikel-assoziierte Epithel (FAE) der Peyerschen Platten. Allerdings werden auch LEE-negative VTEC-Stämme bei humanen Erkrankungsfällen gefunden, wenngleich in geringerer Frequenz und seltener bei extraintestinalen Komplikationen (BEUTIN et al., 2004; siehe auch Kapitel 2.5.6.3). Es ist jedoch davon auszugehen, daß die Fähigkeit zur Adhärenz an das Darmepithel zu den Faktoren gehört, die human-virulente VTEC-Stämme von klinisch weniger bedeutsamen unterscheidet (PATON und PATON, 1998). Diese Hypothese wird durch eine Arbeit von PATON et al. (1997) gestützt, die zeigen konnten, daß die Adhärenz von klinischen VTEC-Stämmen an Henle 407-Zellen signifikant größer ist als diejenige von VTEC-Stämmen aus Lebensmitteln, welche nicht bei Patienten wiedergefunden wurden. Aus diesem Grund ist die Identifizierung möglicher Adhärenzfaktoren LEE-negativer EHEC-Stämme gegenwärtig Gegenstand der Forschung, um auch bei solchen VTEC-Stämmen eine klinische Risikoabschätzung anhand des Virulenzprofils zu ermöglichen. Ebenfalls an Adhärenzmechanismen beteiligt, obgleich weniger gut erforscht wie der LEE, sind die Virulenzfaktoren Saa, Iha und Efa1, welche in den Kapiteln 2.4.3.6, 2.4.2.3 und 2.4.2.6 beschrieben sind.

### Verotoxin-Migration durch das Darmepithel

Nach Kolonisierung des Darmepithels sezernieren die EHEC-Zellen Verotoxine ins Darmlumen, welche parazellulär durch das Darmepithel wandern. Die Menge an transloziertem Verotoxin korreliert mit der Menge an neutrophilen Granulozyten, die entgegengesetzt durch das Darmepithel in Richtung Darmlumen transmigrieren. Die Diapedese der neutrophilen Granulozyten erhöht die parazelluläre Permeabilität des Darmepithels, so daß auch größere Moleküle, wie Verotoxine, die Darmschranke

passieren können (HURLEY et al., 2001). Labordiagnostisch äußert sich dies im häufigen Nachweis fäkaler Leukozyten in der Stuhlprobe (SLUTSKER et al., 1997). Verotoxine sind in der Lage, die Produktion von Chemokinen wie beispielsweise Interleukin-8 zu stimulieren, welche chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten wirken. Weitaus bedeutsamer für eine verstärkte Chemokin-Produktion scheinen jedoch Flagelline zu sein, wobei H7 und H21 besonders starke Reaktionen hervorrufen (ROGERS et al., 2003).

### **Verotoxin-Transport im Blut**

Der Transport der Verotoxine über die Blutbahn erfolgt über eine Bindung an polymorphkernige Leukozyten, weshalb sich Verotoxine nicht im Plasma nachweisen lassen. Dabei ist die Bindungsaffinität des Leukozyten-Rezeptors ca. 100-fach schwächer als die von Globotriosylceramid (Gb<sub>3</sub>), so daß das gebundene Verotoxin in den entsprechenden Gb<sub>3</sub>-reichen Geweben an die Zielzellen abgegeben wird (TE LOO et al., 2000).

### **Zielzellen und Rezeptor-Bindung**

Zielzellen der Verotoxine sind Gb<sub>3</sub>-reiche Gewebe wie renale Endothelzellen, glomeruläre und tubuläre Epithelzellen (BOYD und LINGWOOD, 1989; OBRIG et al., 1993; LINGWOOD, 1994; HUGHES et al., 1998; HUGHES et al., 2000), ZNS-Gewebe (REN et al., 1999) und intestinale Endothelzellen (JACEWICZ et al., 1999), was sich auch im klinischen Bild widerspiegelt. Nach Rezeptor-vermittelter Endozytose der A-Untereinheit des Verotoxins wird das A<sub>1</sub>-Fragment freigesetzt, welches spezifische N-glykosidische Bindung in der 28S rRNA spaltet. Infolgedessen kommt die Proteinbiosynthese zum Erliegen, was schließlich zum Tod der Zelle führt (siehe Kapitel 2.4.1.3).

### **Ausprägung von HUS**

Die beschriebene Schädigung renaler Endothelzellen führt zur Aktivierung von Thrombozyten, wobei auch Verotoxine selbst sowie Lipopolysaccharide von *E. coli* O157 Thrombozyten aktivieren können (KARPMAN, 2003). Dieser Verbrauch an Thrombozyten führt zu der labordiagnostisch nachweisbaren Thrombozytopenie, die zur Symptomentrias des kompletten HUS gehört. Die Gefäßschädigungen verursachen weiterhin Fragmentation der Erythrozyten und somit hämolytische Anämie, das zweite charakteristische HUS-Symptom. Thrombenbildung und Schädigung der tubulären Epithelzellen verringern die glomeruläre Filtrationsrate und führen schließlich zum Nierenversagen, welches das Krankheitsbild des kompletten HUS vervollständigt (PROULX et al., 2001).

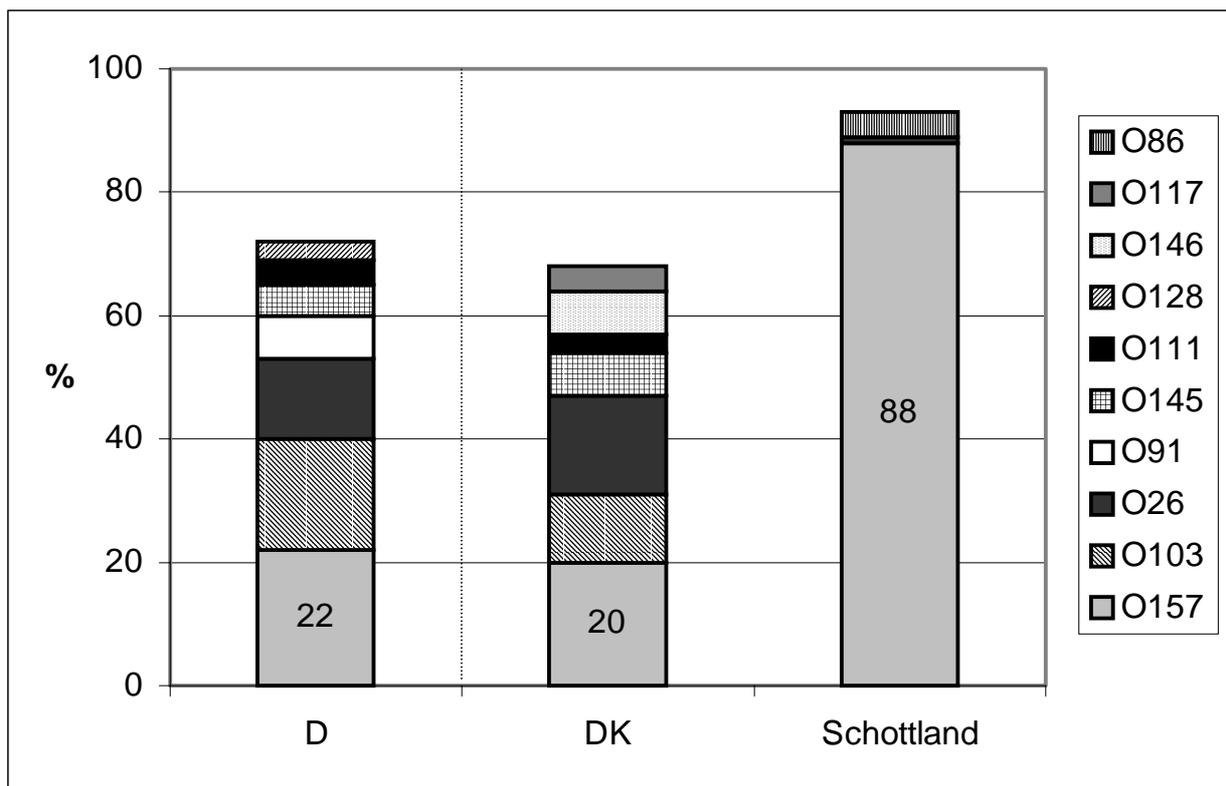
## **2.5.6 Charakterisierung der EHEC-Isolate**

Wenngleich die Verotoxine namensgebend für die Pathogruppe der VTEC sind und gleichzeitig die einzige Gemeinsamkeit dieses *E. coli*-Pathovars darstellen, so wird doch mittlerweile vermutet, daß der alleinige Besitz von Verotoxin-Genen nicht ausreicht, um einen *E. coli*-Stamm humanpathogen werden zu lassen; dazu scheint vielmehr das Zusammenspiel verschiedener Virulenzfaktoren notwendig zu sein (SCHMIDT et al., 1999a). Diese Ansicht vertritt auch BÜLTE, der VTEC-Stämme mit *eae*-Gen als „potentielle EHEC“ bezeichnet (BÜLTE, 2000) und auf die Unterschiede

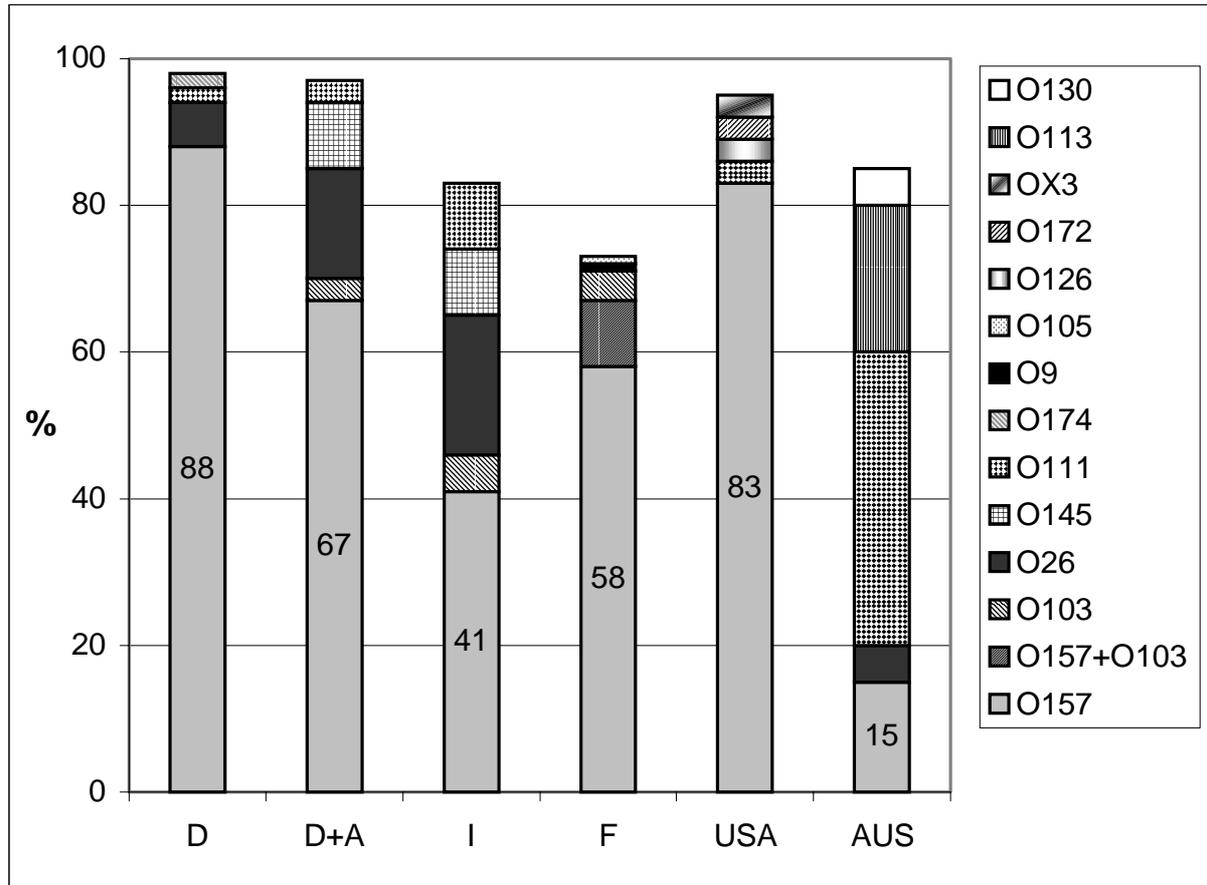
in den Virulenzprofilen humaner und boviner VTEC-Stämme sowie aus Lebensmitteln stammender Isolate hinweist (BÜLTE, 2001). Dementsprechend werden von der Zentralen Kommission für die Biologische Sicherheit (ZKBS) *E. coli* K12-Stämme, denen gentechnisch ein Verotoxin-Gen übertragen wurde, lediglich der Sicherheitsstufe 2 zugeordnet, wohingegen die ursprünglichen EHEC-Stämme der Sicherheitsstufe 3\*\* unterliegen (RKI, 2004d). Bislang ist es noch nicht möglich, anhand des Virulenzprofils eines Isolates auf seine klinische Bedeutsamkeit rückzuschließen (RKI und BgVV, 2001; AMTLICHE SAMMLUNG [...], 2002b; FRUTH et al., 2002); aufgrund der bisher gesammelten epidemiologischen Daten ist jedoch, wie im folgenden dargestellt, eine Risikoabschätzung möglich.

### 2.5.6.1 Serogruppen/-typen

Die Serogruppen-Verteilung bei EHEC-Erkrankungen variiert nicht nur geographisch, sondern auch in Abhängigkeit vom Schweregrad der Erkrankung. Während in Deutschland und anderen europäischen Ländern (außer Großbritannien) bei unkomplizierten Krankheitsverläufen non-O157-VTEC vorherrschen (siehe [Abbildung 2](#)), dominieren bei extraintestinalen Komplikationen wie dem HUS beinahe weltweit Stämme der Serogruppe O157; eine Ausnahme hiervon bildet Australien, wo insbesondere Isolate der Serogruppe O111 gefunden werden (siehe [Abbildung 3](#)).



**Abbildung 2:** Anteil nachgewiesener Serogruppen bei EHEC-Erkrankungen in verschiedenen Ländern (D: Deutschland, EHEC-Erkrankungen ohne HUS, RKI, 2004a; DK: Dänemark, EHEC-Erkrankungen gesamt, STATENS SERUM INSTITUT, 2003; Schottland: EHEC-Erkrankungen gesamt, LOCKING et al., 2003)



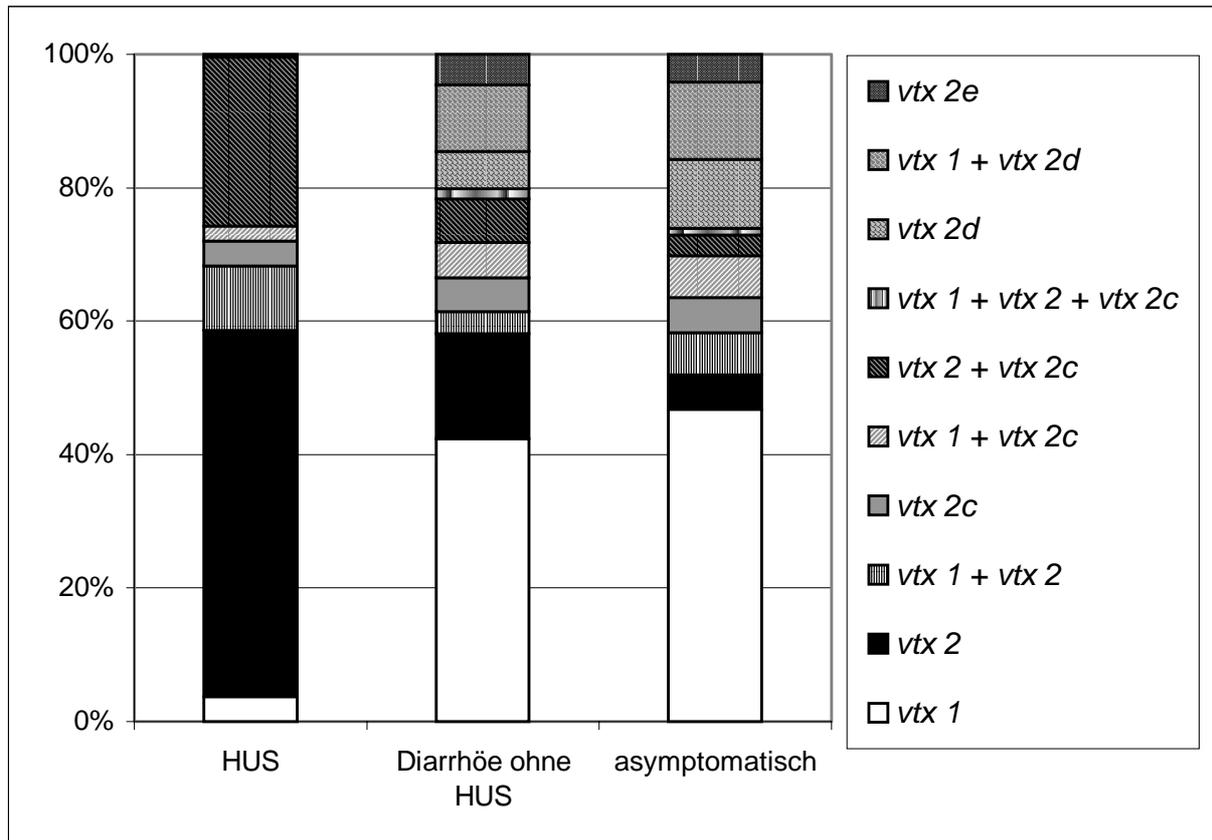
**Abbildung 3:** Anteil nachgewiesener Serogruppen bei HUS-Erkrankungen in verschiedenen Ländern (D: Deutschland, RKI, 2004a; A: Österreich, GERBER et al., 2002; I: Italien, TOZZI et al., 2003; F: Frankreich, DECLUDT et al., 2000; USA: Vereinigte Staaten von Amerika, BANATVALA et al., 2001; AUS: Australien, ELLIOTT et al., 2001a)

WERBER et al. (2003) führen diese Dominanz von *E. coli* O157-Stämmen jedoch nicht auf die Serogruppe *per se* zurück, sondern vielmehr auf das regelmäßige Vorhandensein der Virulenzgene *eae* und *vtx 2*, welche häufig mit schweren Krankheitsverläufen assoziiert sind (siehe Kapitel 2.5.6.2 und 2.5.6.3) und zu 92 % bei klinischen *E. coli* O157-Isolaten auftreten. Ähnliches berichtet auch eine dänische Arbeitsgruppe, welche das gleichzeitige Vorkommen von *eae*- und *vtx 2*-Gen, jedoch nicht das Vorliegen einer bestimmten Serogruppe als Risikofaktor für die Ausprägung eines HUS ermittelte (ETHELBERG et al., 2004). Demgegenüber sehen GYLES et al. (1998) jedoch den Serotyp als konstantesten Virulenz-assoziierten Faktor an.

### 2.5.6.2 Verotoxine

Eine Vielzahl an Untersuchungen konnte einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Vorkommen des *vtx 2*-Gens und schwerwiegenden Krankheitsverläufen wie dem HUS belegen (OSTROFF et al., 1989; BOCKEMÜHL et al., 1997; BOERLIN et al., 1999; EKLUND et al., 2002; FRIEDRICH et al., 2002; ROLDGAARD et al., 2004). Auch *vtx 2c* wird, alleine oder vergesellschaftet mit *vtx 2*, bei HUS-Erkrankungen

kungen nachgewiesen; jedoch scheint nach den Ergebnissen von FRIEDRICH et al. (2002) das HUS-Risiko bei einer Erkrankung durch einen EHEC-Stamm des Genotyps *vtx 2c* geringer als bei *vtx 2*. *vtx 1* wird demgegenüber häufiger bei unkomplizierten Krankheitsbildern sowie bei symptomlosen Ausscheidern gefunden (BOCKEMÜHL et al., 1997; BOERLIN et al., 1999; FRIEDRICH et al., 2002; s. auch Abbildung 4).



**Abbildung 4:** Anteil der Verotoxin-Gen (*vtx*)-Genotypen bei Isolaten von Patienten mit hämolytisch-urämischem Syndrom (HUS), Patienten mit Diarrhöe und asymptomatischen Personen (nach FRIEDRICH et al., 2002)

Die Variante *vtx 2d* wird überwiegend bei milden Erkrankungsverläufen und symptomlosen Ausscheidern nachgewiesen (PIÉRARD et al., 1998; FRIEDRICH et al., 2002; BEUTIN et al., 2004); bei Isolaten von HUS-Patienten wird dieser Genotyp nur vereinzelt gefunden (RAMACHANDRAN et al., 2001). Da in der Studie von FRIEDRICH et al. (2002) die Nachweishäufigkeit dieser Genvariante bei Isolaten von Patienten mit unkomplizierter Diarrhöe vergleichbar mit derjenigen bei Isolaten von symptomlosen Ausscheidern war, hinterfragen die Autoren die ätiologische Rolle dieser Stämme bei der Entwicklung der Diarrhöe. Denkbar wären bei solchen Fällen auch Koinfektionen mit anderen Pathogenen, die an der Ausprägung der klinischen Symptomatik ursächlich beteiligt, jedoch nicht nachweisbar waren. Gleiches postuliert die Arbeitsgruppe für den Genotyp *vtx 2e*. Auch hier liegen nur sehr vereinzelt Berichte über das Vorkommen dieser Genvariante bei HUS-Isolaten vor (THOMAS et al., 1994). Der Geno-

typ *vtx 2f* konnte in der Arbeit von FRIEDRICH et al. (2002) bei keinem der 626 untersuchten Human-Isolate nachgewiesen werden. Der Referenzstamm der Variante *vtx va*, die später in *vtx 2f* integriert wurde (SCHMIDT et al., 2000), war jedoch mit infantiler Diarrhöe assoziiert (GANNON et al., 1990). Der alleinige Nachweis des Genotyps *vtx 1c* kann nach Ansicht von FRIEDRICH et al. (2003) ebenfalls als Marker für weniger virulente VTEC-Stämme dienen, was durch die Ergebnisse von BEUTIN et al. (2004) sowie KOCH et al. (2001) untermauert wird; HUS-Isolate mit diesem Virulenzgen beherbergen meist zusätzlich das *vtx 2*-Gen (ZHANG et al., 2002c; BRETT et al., 2003; FRIEDRICH et al., 2003). Insgesamt muß jedoch davon ausgegangen werden, daß kein einzelner Faktor für die Virulenz von VTEC-Stämmen verantwortlich ist (BOERLIN et al., 1999); und so könnte die fehlende Assoziation von VTEC-Stämmen mit den Genvarianten *vtx 1c*, *vtx 2d* und *vtx 2e* auch durch das Fehlen des zusätzlichen Virulenzgens *eae* erklärbar sein (FRIEDRICH et al., 2002; FRIEDRICH et al., 2003).

RITCHIE et al. (2003) stellten zudem deutliche Unterschiede in der Toxin-Menge zwischen HUS-assoziierten Stämmen und bovinen Isolaten fest: Sowohl die basale, als auch die induzierbare Verotoxin-Produktionsmenge der klinischen Isolate übertraf diejenige der bovinen Stämme deutlich. MELLMANN et al. (2004) berichten bei klinischen Isolaten über deutliche quantitative Unterschiede in der Toxinfreisetzung zwischen den „klassischen“ VT 1 und VT 2 einerseits und deren Varianten andererseits; letztere wurden in deutlich geringeren Mengen sezerniert.

### 2.5.6.3 *eae*-Gen

Das gehäufte Vorkommen des *eae*-Gens bei humanen Isolaten wurde bereits von einer Vielzahl von Autoren beschrieben; insbesondere bei Stämmen von schwerwiegenden Krankheitsverläufen wie dem HUS liegt die Nachweisrate regelmäßig über 90 % (s. Tabelle 18).

Tabelle 18: Vorkommen des „*E. coli* attaching and effacing“ (*eae*)-Gens bei humanen Isolaten, aufgeschlüsselt nach klinischer Symptomatik

HUS <sup>1)</sup>	HC <sup>2)</sup> /blutige Diarrhöe	Enteritis/Diarrhöe	symptomlose Ausscheider	Quelle
93,4 %	k. A. <sup>3)</sup>	73,4 %	65,9 %	BOCKEMÜHL et al., 1996
----- 100,0 % -----		----- 100,0 % -----		BOERLIN et al., 1999
----- 92,0 % -----		k. A.	81,3 %	BÜLTE, 2001
----- 17,1 % -----			4,8 %	ADWAN et al., 2002
97,0 %	k. A.	k. A.	k. A.	GERBER et al., 2002
95,2 %	85,1 %	66,7 %	53,7 %	BEUTIN et al., 2004

<sup>1)</sup> hämolytisch-urämisches Syndrom

<sup>2)</sup> hämorrhagische Colitis

<sup>3)</sup> keine Angabe

BOERLIN et al. (1999) konnten einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Vorkommen von *eae*- und *vtx* 2-Genen und Serotypen humaner Isolate, insbesondere von HUS- und HC-Patienten, nachweisen. Die Autoren postulieren einen Synergismus zwischen diesen beiden Virulenzfaktoren. Die Ergebnisse einer palästinensischen Arbeitsgruppe belegen ebenfalls eine statistische Signifikanz zwischen dem Vorkommen des *eae*-Gens und einer Erkrankung, wenngleich die Nachweisrate des *eae*-Gens insgesamt in dieser Untersuchung vergleichsweise niedrig ausfiel (ADWAN et al., 2002). BEUTIN et al. (2004) konnten eine Assoziation zwischen dem Vorkommen des *eae*-Gens und dem Alter der Patienten aufzeigen. Während bei 88,1 % der Patienten bis 6 Jahren *eae*-positive EHEC isoliert wurden, betrug die Nachweisrate bei den Isolaten von Patienten, die älter als 6 Jahre waren, lediglich 29,4 %. Die Autoren diskutieren hierfür zwei Erklärungsansätze: Zum einen könnte die geringere Nachweisrate bei adulten Patienten durch eine in der Kindheit über VTEC- und EPEC-Infektionen erworbene Immunität bedingt sein. Weiterhin könnten auch unterschiedliche Übertragungswege in den Altersklassen die Differenzen zwischen den EHEC-Stämmen verursachen. Erwachsene haben prinzipiell häufiger Kontakt mit VTEC-Stämmen aus nicht-humanen Quellen, wie Tieren, Lebensmitteln und der Umwelt; diese Stämme beherbergen deutlich seltener das *eae*-Gen (BÜLTE, 2001).

#### 2.5.6.4 Enterohämolysin-Gen

Das gleichzeitige Vorhandensein von *vtx*-, *eae*- und *hly*<sub>EHEC</sub>-Gen wird auch als "vollständiges Virulenzspektrum" bezeichnet. Ursprünglich wurde der Enterohämolysin-Produktion eine Markerfunktion für den Nachweis von Verotoxin-produzierenden Stämmen zugesprochen (BEUTIN et al., 1989); inzwischen gilt jedoch die phäno- oder genotypische Detektion des Verotoxins bzw. seines Gens als Mittel der Wahl (BOCKEMÜHL et al., 1997; FRUTH et al., 2002).

Mehrfach belegt ist die Assoziation zwischen dem Auftreten von *hly*<sub>EHEC</sub>- und *eae*-Gen (PRADEL et al., 2000; EKLUND et al., 2001; BEUTIN et al., 2004). BOERLIN et al. (1999) konnten jedoch keinen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen *hly*<sub>EHEC</sub>-Gen und Erkrankung feststellen. Die Interpretation dieses Ergebnisses gestaltet sich allerdings schwierig. Zum einen könnte es die tatsächliche biologische Bedeutungslosigkeit des Enterohämolysins in der Pathogenese von EHEC-Erkrankungen widerspiegeln, worauf auch die Ergebnisse von PRADEL et al. (2000) hindeuten. Nicht außer Acht gelassen werden darf aber die Überlegung, daß die Assoziation zwischen *hly*<sub>EHEC</sub>- und *eae*-Gen im verwendeten statistischen Modell eine eventuell vorhandene Assoziation zwischen *hly*<sub>EHEC</sub>-Gen und Erkrankung maskiert. So konnte eine palästinensische Arbeitsgruppe sehr wohl einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen dem Vorkommen des Enterohämolysin-Gens und Erkrankung aufzeigen, wenngleich die Nachweisraten dieses Gens im Vergleich zu anderen Untersuchungen markant niedriger lagen (ADWAN et al., 2002; s. Tabelle 19).

**Tabelle 19:** Vorkommen des Enterohämolysin-Gens bei humanen Isolaten, aufgeschlüsselt nach klinischer Symptomatik

HUS <sup>1)</sup>	HC <sup>2)</sup> /blutige Diarrhöe	Enteritis/Diarrhöe	symptomlose Ausscheider	Quelle
95,1 %	k. A. <sup>3)</sup>	95,3 %	70,7 %	BOCKEMÜHL et al., 1996
----- 97,8 % -----		----- 88,9 % -----		BOERLIN et al., 1999
----- 90,0 % -----		k. A.	93,4 %	BÜLTE, 2001
----- 19,5 % -----			4,8 %	ADWAN et al., 2002
97,0 %	k. A.	k. A.	k. A.	GERBER et al., 2002

<sup>1)</sup> hämolytisch-urämisches Syndrom

<sup>2)</sup> hämorrhagische Colitis

<sup>3)</sup> keine Angabe

## 2.5.7 Übertragungswege, Risikofaktoren

Ursprünglich wurden VTEC-Infektionen als „foodborne disease“ betrachtet, da die ersten bekanntgewordenen Ausbrüche von Lebensmitteln, insbesondere „Hamburger“, verursacht wurden (RILEY et al., 1983). Dies führte zu den Trivialbezeichnungen „Hamburger Disease“ oder auch „Barbecue Syndrome“ (CANADIAN PEDIATRIC SOCIETY, 1995). Mittlerweile wurden jedoch auch eine Reihe anderer Übertragungswege bekannt. Nach Angaben von RANGEL et al. (2003) werden in den USA 65 % der *E. coli* O157-Ausbrüche durch Lebensmittel verursacht; auf die Übertragung von Mensch zu Mensch entfallen 20 %, 12 % sind Wasser-assoziiert und 3 % sind auf Tierkontakt zurückzuführen. Für sporadische *E. coli* O157:H7-Infektionen identifizierte eine US-amerikanische Fall-Kontroll-Studie in der multivariaten Analyse den Verzehr nicht durcherhitzter „Hamburger“ als einzigen Risikofaktor (SLUTSKER et al., 1998). Eine neuere US-amerikanische Arbeit bestätigte die Bedeutung dieses Risikofaktors, zeigte aber zusätzlich eine starke Assoziation zwischen Farmbesuchen und *E. coli* O157-Diarrhöe-Erkrankungen auf (KASSENBERG et al., 2004).

Eine in England und Wales durchgeführte Studie identifizierte den Verzehr von „Beefburgern“ sowie kalten Bratenscheiben von Catering-Firmen als wichtige Risikofaktoren für sporadische *E. coli* O157-Infektionen; aber auch die Übertragung von Mensch-zu-Mensch sowie durch Tierkontakt spielte diesen Ergebnissen zufolge eine Rolle (PARRY et al., 1998). Demgegenüber zeigte eine ebenfalls in England durchgeführte Arbeit von O'BRIEN et al. (2001) eine starke Assoziation zwischen Kontakt mit landwirtschaftlicher Umgebung und sporadischen *E. coli* O157-Infektionen auf. Hierzu zählten Besuche in Streichelzoos, „Urlaub auf dem Bauernhof“ sowie Arbeitsbezogene Aufenthalte auf Farmen; regelmäßige Beschäftigung auf einem landwirtschaftlichen Betrieb war davon aber ausgenommen. Eine schottische Studie zählte Kontakt zu Nutztieren, Gartenarbeit bzw. Spielen im Garten, sowie Probleme in der Wasserversorgung der jeweiligen Haushalte als Risikofaktoren für sporadische *E. coli* O157-Infektionen auf (COIA et al., 1998). STRACHAN et al. (2003) legten dar, daß das Risiko, sich beim Besuch einer kürzlich von Tieren beweideten Wiese mit

*E. coli* O157 zu infizieren, 100-fach größer ist, als einen kontaminierten Hamburger zu verzehren.

Untersuchungen zu EHEC-Erkrankungen in Bayern identifizierten in 24 % bzw. 10 % der Fälle den Konsum von Rohmilch(-produkten) bzw. rohem Fleisch als möglichen Übertragungsweg. 38 % der Infizierten hatten Kontakt zu Wiederkäuern bzw. deren Fäzes; Verbindungen zum Nutztierhaltungsbereich im weiteren Sinne wurden von 59 % der Fälle berichtet. Zwischen den EHEC-Inzidenzraten der einzelnen Regionen und der Zahl der viehhaltenden Betriebe wurde eine statistisch signifikante positive Korrelation festgestellt (AKADEMIE FÜR DAS ÖFFENTLICHE GESUNDHEITSWESEN [...], 1998). Ähnliche Zusammenhänge wurden in den letzten Jahren auch aus Kanada (VALCOUR et al., 2002) und Schweden (KISTEMANN et al., 2004) berichtet.

Eine in Deutschland durchgeführte Fall-Kontroll-Studie zeigte unterschiedliche Risikofaktoren für sporadische EHEC-Erkrankungen in Abhängigkeit vom Patientenalter auf. Für Kinder unter 3 Jahren wurde der direkte Kontakt zu Wiederkäuern als wichtigster Risikofaktor identifiziert, weiterhin der Verzehr von Rohmilch. In der Altersgruppe der 3- bis 9-Jährigen stellte das Spielen im Sandkasten die wichtigste Übertragungsmöglichkeit dar, außerdem trat auch das Schwimmen und Baden außerhalb öffentlicher Schwimmbäder als Risikofaktor in Erscheinung. Demgegenüber dominieren bei älteren Kindern sowie Erwachsenen verschiedene von Wiederkäuern stammende Lebensmittel, wie beispielsweise Lammfleisch und streichfähige Rohwurst, als Risikofaktoren (RKI, 2004b). Auch eine in Bayern durchgeführte Fall-Kontroll-Studie konnte eine Altersabhängigkeit der Risikofaktoren aufzeigen. Bei diesem Patientenkollektiv erwies sich für Kinder unter 3 Jahren das Auftreten von Durchfallerkrankungen bei im Haushalt lebenden Personen als bedeutendster Risikofaktor, daneben wurde auch die Verwendung von Holzbrettern zur Zubereitung von Fleisch oder Hackfleisch als Risikofaktor identifiziert. Für die Altersgruppe der 3- bis 9-Jährigen zählten Kontakt zu Wiederkäuern, der Verzehr von Wiederkäuerfleisch und das Baden außerhalb öffentlicher Schwimmbäder zu den Risikofaktoren. Für Kinder über 10 Jahren und Erwachsene konnten keine statistisch signifikanten Risikofaktoren identifiziert werden, was nach Meinung der Autoren auf die Vielfalt möglicher Risikofaktoren für sporadische VTEC-Infektionen in dieser Altersgruppe hinweist (RKI, 2004c).

## **2.6 Vorkommen von VTEC in Lebensmitteln**

### **2.6.1 Epidemiologische Daten**

VTEC können in Deutschland in rohen, von Wiederkäuern stammenden Lebensmitteln wie Hackfleisch, Rohwürsten oder Roh- und Vorzugsmilch regelmäßig nachgewiesen werden. Dabei handelt es sich jedoch nur in seltenen Fällen um Isolate der Serogruppe O157. Die entsprechenden Untersuchungsergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen sind in den Tabellen 20 und 21 dargestellt. Soweit nicht anders angegeben, wurden in allen tabellarischen Übersichten dieses Unterkapitels nur solche

Nachweisraten berücksichtigt, die auf der Isolierung von VTEC- bzw. *E. coli* O157-Stämmen beruhen. Prävalenzangaben, welche immunologische oder molekularbiologische Screening-Ergebnisse widerspiegeln, liegen i. d. R. höher (TEUFEL et al., 1998; TRUMPF et al., 2000; PICHNER et al., 2001; PRUETT et al., 2002). Diese Diskrepanz wird auf das Vorkommen falsch-positiver Screening-Reaktionen bzw. bei PCR-Verfahren auf die Replikation von DNA nicht-lebensfähiger Bakterienzellen zurückgeführt (TEUFEL et al., 1998). Andere halten den letztgenannten Erklärungsansatz unter Praxisbedingungen allerdings für nicht relevant (PRUETT et al., 2002). Die Fokussierung auf Isolationsraten impliziert jedoch möglicherweise eine Unterschätzung der tatsächlichen Prävalenz von VTEC in Lebensmitteln, da insbesondere der PCR eine höhere Sensitivität als den Isolierungsmethoden bescheinigt wird (ARTHUR et al., 2002).

Auffällig sind insbesondere die hohen Nachweisraten bei **Lammschlachtierkörpern** (72,4 %). Der Autor verweist in diesem Zusammenhang auf die vielfach noch anzutreffende hygienewidrige schlachttechnologische Herrichtung von Schafschlachtierkörpern (BÜLTE, 2001). Generell wird von verschiedenen Autoren auf das mit dem Verzehr roher Lebensmittel, insbesondere tierischen Ursprungs, einhergehende Risiko für die Verbraucher hingewiesen, was im Übrigen nicht nur durch das Vorkommen von VTEC-Stämmen begründet ist (GALLIEN et al., 2003). Insbesondere Risikogruppen („YOPIS“) sollten auf eine ordnungsgemäße Durcherhitzung ihrer Speisen achten (KLIE et al., 1997; TRUMPF et al., 2000). **Pflanzliche Lebensmittel** werden nur sehr selten auf VTEC untersucht, obgleich in anderen Ländern bereits mehrfach von Infektionsausbrüchen durch pflanzliche Lebensmittel wie unpasteurisierten Apfelsaft oder Sprossen berichtet wurde (CDC, 1996; WATANABE et al., 1999); letztere traten beim bislang größten bekanntgewordenen EHEC-Ausbruch in Japan als Vektor in Erscheinung (WHO, 1996). Es konnte gezeigt werden, daß Salatpflanzen über ihr Wurzelsystem *E. coli* O157:H7-Zellen aus mit Dung kontaminierter Bewässerung bzw. Erdboden aufnehmen und in die eßbaren Pflanzenteile einlagern können, wo sie vor Waschmaßnahmen geschützt sind (SOLOMON et al., 2002). Ebenso sind in Rettichsprossen, welche aus mit *E. coli* O157:H7 kontaminierten Samen gezogen wurden, lebensfähige Bakterienzellen im inneren Gewebe der Keimblätter nachgewiesen worden (ITOH et al., 1998). „Apple cider“ wurde v. a. in Nordamerika als Vektor verschiedener *E. coli* O157-Ausbrüche identifiziert, wenn ungewaschenes Fallobst weiterverarbeitet wurde (BESSER et al., 1993; CDC, 1996). Schätzungen zufolge wird 65 % des in Kanada verkauften „apple cider“ nicht pasteurisiert, da er überwiegend aus kleinen Familienbetrieben stammt (LUEDTKE und POWELL, 2002). In Laborversuchen waren *E. coli* O157:H7-Stämme nach 20-tägiger Kühllagerung noch in „apple cider“ nachweisbar (BESSER et al., 1993).

**Tabelle 20:** Nachweis von Verotoxin-bildenden *E. coli* (VTEC) sowie *E. coli* O157 in Fleisch und Fleischerzeugnissen aus Deutschland

Lebensmittel	Anzahl untersuchter Proben	Anzahl positiver Proben (%)		Quelle
		<i>E. coli</i> O157	VTEC allgemein	
Hackfleisch	138	k. A. <sup>1)</sup>	17 (12,3)	GALLIEN et al., 1998
frisches Fleisch	73	"	55 (75,3)	"
rindfleischhaltige Rohwurst	168	"	14 (8,3)	"
Rinderhackfleisch	105	0	13 (12,3)	TEUFEL et al., 1998
kurzgereifte Rohwurst	158	k. A.	14 (8,8)	TIMM et al., 1999
Hackfleisch	362	0	9 (2,5)	TRUMPF et al., 2000
frisches Fleisch	98	0	1 (1,0)	"
Rohwurst	167	0	0	"
Rinderhackfleisch	1.381	3 (0,2)	95 (6,9)	BÜLTE, 2001
Rinderhackfleisch	454	2 (0,4)	n. u.	"
Lammfleisch	267	0	14 (5,2)	"
Lammschlachtierkörper	87	0	63 (72,4)	"
Schweinefleisch	307	1 (0,3)	1 (0,3)	"
streichfähige Rohwurst	753	0 <sup>2)</sup>	14 (1,9)	PICHNER et al., 2001
Rinderschlachtierkörper	100	0	3 (3,0)	GALLIEN et al., 2003

<sup>1)</sup> keine Angaben

<sup>2)</sup> bei 3 von 537 auf *E. coli* O157 untersuchten Proben wurden *E. coli* O157-Stämme ohne Verotoxin-Gen isoliert

**Tabelle 21:** Nachweis von Verotoxin-bildenden *E. coli* (VTEC) sowie *E. coli* O157 in Milch und Milcherzeugnissen sowie Trinkwasser aus Deutschland

Lebensmittel	Anzahl untersuchter Proben	Anzahl positiver Proben (%)		Quelle
		<i>E. coli</i> O157	VTEC allgemein	
Rohmilch	127	1 (0,8)	5 (3,9)	KLIE et al., 1997
Vorzugsmilch	146	0	3 (2,1)	"
Rohmilch	180	k. A. <sup>1)</sup>	22 (12,2)	GALLIEN et al., 1998
Vorzugsmilch	175	k. A.	4 (2,3)	"
Rohmilch-Weichkäse	72	0	2 (2,8)	TEUFEL et al., 1998
Weichkäse aus pasteurisierter Milch	47	0	0	"
Viertelgemelksproben Mastitis-kranker Kühe	223	0	1 (0,5)	ZSCHÖCK et al., 1998
Vorzugsmilch	246	0	2 (0,8)	TRUMPF et al., 2000
Rohmilchkäse	267	0	2 (0,7)	BÜLTE, 2001
Trinkwasser	1220	2 (0,2)	72 (5,9) <sup>2)</sup>	MORLOCK et al., 2004

<sup>1)</sup> keine Angaben

<sup>2)</sup> Erregerisolierung nicht immer möglich

Ebenfalls in Zusammenhang mit EHEC-Ausbrüchen in Erscheinung getreten sind **Rohwürste** (MCDONALD et al., 2004), u. a. 1995 in dem vielzitierten australischen Ausbruch, welcher auf den Verzehr kontaminierter Mettwurst zurückgeführt wurde (CDC, 1995). Bislang galten zumindest langgereifte Produkte aus dieser Erzeugnisgruppe aufgrund des zugrundeliegenden Hürdenkonzepts als mikrobiologisch vergleichsweise sicher (LEISTNER, 1986). STIEBING et al. (2000a; 2000b) untersuchten die Überlebensfähigkeit von *E. coli* O157:H7-Stämmen in verschiedenen Rohwurst-Erzeugnissen. Sie konnten zeigen, daß das Absterbeverhalten von *E. coli* O157:H7 in nur mäßig abgetrockneter, streichfähiger Rohwurst bei praxisüblicher Herstellung und Reifung relativ gering ist; die Reduktionsrate betrug eine Zehnerpotenz. Da das VTEC-Risiko in solchen Produkten durch die Wahl geeigneter Rezeptur- oder Reifungsbedingungen nicht sicher beherrscht werden kann, weisen die Autoren auf die Wichtigkeit der Hygiene bei Gewinnung und Verarbeitung der Rohmaterialien hin. In schnittfester Rohwurst zeigte sich die Überlebensrate von *E. coli* O157:H7-Stämmen primär abhängig vom Abtrocknungsgrad, aber auch von Geschwindigkeit und Stärke des pH-Wert-Abfalls, der Reife- bzw. Lagertemperatur sowie der Reifungsdauer. Höhere Nitritzugaben sowie unterschiedliche Starterkulturen zeigten demgegenüber einen geringeren Einfluß. Erzeugnisse mit einem  $a_w$ -Wert von unter 0,93 erreichten eine Keimreduktion zwischen 2,8 und 5,0 Zehnerpotenzen; bei Erzeugnissen mit einem  $a_w$ -Wert zwischen 0,95 und 0,93 sowie einem pH-Wert von 5,2 bis 4,8 betrug die Reduktion zwischen 1,7 und 5,0 log-Stufen. Bei Erzeugnissen mit einem  $a_w$ -Wert über 0,95 bzw. über 0,94 in Kombination mit einem pH-Wert über 5,2 konnten lediglich Reduktionsraten bis maximal 1,6 Zehnerpotenzen erzielt werden. Die Arbeitsgruppe von MÜLLER et al. (1998) berücksichtigte, den vorliegenden epidemiologischen Daten aus Deutschland entsprechend, in ihren Untersuchungen VTEC unterschiedlicher Serogruppen sowie geringere Inokulationsdichten von  $10^0$  bis  $10^2$  Kolonie-bildenden Einheiten pro Gramm (KbE/g). In den untersuchten Erzeugnissen (Teewurst, kurz- und langgereifte Salami) wurden die eingemischten VTEC-Stämme zwar zurückgedrängt, waren jedoch weiterhin regelmäßig nachweisbar bzw. reisolierbar. PICHNER et al. (2001) empfehlen, insbesondere solche frische, streichfähige Rohwürste auf *E. coli* zu untersuchen, bei denen erhöhte Keimzahlen von *E. coli* festgestellt wurden.

Die Übertragung von VTEC-Stämmen durch **Rohmilch** ist in der Literatur ebenfalls mehrfach belegt; u. a. ließ sich der erste EHEC-Erkrankungsfall in der BRD, bei dem die Infektkette lückenlos aufgeklärt werden konnte, auf den Verzehr unpasteurisierter Milch zurückführen (BOCKEMÜHL et al., 1990). ZSCHÖCK et al. (1998) konnten zeigen, daß eine sekretorische Kontamination der Milch möglich ist, insgesamt aber dem Verotoxin nur eine geringe Rolle in der Pathogenese der *E. coli*-Mastitis zuzukommen scheint. Der postsekretorischen Kontamination messen die Autoren eine größere Bedeutung bei. Wird Rohmilch bei einer Temperatur von 8 °C gelagert, was durchaus den in Verbraucher-Haushalten üblichen Kühlschranks-Temperaturen entspricht, können sich *E. coli* O157:H7-Stämme innerhalb von vier Tagen um ein bis zwei log-Stufen vermehren. Aufgrund kompetitiver Effekte der Begleitflora wächst *E. coli* O157:H7 in pasteurisierter, tertiär kontaminierter Milch schneller als in Rohmilch (WANG et al., 1997). Auch über VTEC-Nachweise in aus Rohmilch hergestellten Milcherzeugnissen wird berichtet. *E. coli* O157:H7-Stämme können beispiels-

weise selbst in niedrigen Einmischkonzentrationen von 1-10 KbE/ml den Herstellungsprozeß von Rohmilch-Weichkäse überdauern (LEUSCHNER und BOUGHTFLOWER, 2002). Das Vorkommen von VTEC in Rohmilch-Weichkäse scheint mit erhöhten Keimzahlen an Coliformen korreliert (TEUFEL et al., 1998).

In den letzten Jahren wurden vermehrt EHEC-Infektionen über **Trink- und Badewasser** bekannt (BOPP et al., 2003; BRUCE et al., 2003; BRUNEAU et al., 2004). In bayerischen Oberflächengewässerproben der Jahre 1998 bis 2002 konnten in 124 von 4.923 Proben (2,5 %) VTEC nachgewiesen werden. *E. coli* O157:H7-Stämme überleben insbesondere bei kühlen Temperaturen sowohl in Wasser aus Seen, als auch in Trinkwasser für mehrere Wochen (WANG und DOYLE, 1998); WARBURTON et al. (1998) dokumentierten eine Überlebensfähigkeit von über 300 Tagen in Trinkwasser.

Das regelmäßige Vorkommen von VTEC in rohen, von Wiederkäuern stammenden Lebensmitteln konnte mittlerweile in vielen Ländern dargestellt werden. Wie in den Tabellen 22 bis 24 ersichtlich, konzentriert sich der Nachweis außerhalb Deutschlands jedoch oftmals nur auf die Serogruppe O157.

Auffällig sind hier insbesondere die hohen VTEC-Nachweisraten auf amerikanischen **Rinderschlachtierkörpern** in der Untersuchung von ARTHUR et al. (2002), wo auf einzelnen Tierkörpern sogar mehrere unterschiedliche VTEC-Stämme gleichzeitig isoliert wurden. Faßt man *E. coli* O157 und non-O157 zusammen, so ergibt sich eine VTEC-Gesamtprävalenz von 71,9 %, welche jedoch nach antimikrobieller Behandlung auf 10,1 % reduziert werden konnte. Diese in den USA gängige Praxis der Schlachtierkörperbehandlung mittels heißem Wasser, Genußsäuren oder Dampfdruckpasteurisierung zur Reduktion der mikrobiellen Kontamination (BOLTON et al., 2001) wird jedoch in Deutschland abgelehnt, da der dadurch reduzierten saprophytären Oberflächenflora durchaus positive Effekte zugeschrieben werden. Im Laufe der mehrtägigen bis mehrwöchigen Kühlphase drängen die psychrophilen Mikrofloraanteile die mesophilen Infektions- und Intoxikationserreger zurück. Fällt diese kompetitive Hemmung der um mehrere Zehnerpotenzen höheren Begleitflora weg, können sich die meist in sehr geringen Keimzahlen vorliegenden gesundheitlich bedenklichen Mikroorganismen vermehren (BÜLTE, 2002). Die Bedeutung der Begleitflora zur Hemmung der Vermehrung von *E. coli* O157:H7 konnte für Hackfleisch aufgezeigt werden (VOLD et al., 2000). Die Behandlung mittels Genußsäuren ist gemäß EU-Gesetzgebung verboten. Zur Reduktion der VTEC-Prävalenz auf Schlachtierkörpern empfiehlt BÜLTE (2001) vielmehr das konsequente Umschneiden fäkaler Kontaminationen (sog. „trimming“) nach gezielter Inaugenscheinnahme der Tierkörperhälften, welches nach seiner Auslegung als kritischer Lenkungspunkt („CCP“) im Sinne des HACCP-Konzeptes gewertet werden kann. Andere Autoren sehen keine Möglichkeit der Implementierung eines HACCP-Konzeptes (WYSS und HOCENJOS, 1999). Abzulehnen ist hingegen das Abspülen fäkal kontaminierter Stellen mit Wasser, da dies nur zu einer optischen Verbesserung führt, die Mikroorganismen dabei auf dem Tierkörper jedoch lediglich verteilt, aber meist nicht signifikant reduziert werden (BOLTON et al., 2001). Nach den Untersuchungen von WYSS und HOCENJOS (1999) kann zwar selbst eine optimale Schlachthygiene das Vorkommen von VTEC auf Schlachtierkörpern nicht verhindern, jedoch weist die Kontaminations-

häufigkeit eine negative Korrelation zur Schlachthygiene auf. ELDER et al. (2000) belegten einen Zusammenhang zwischen der *E. coli* O157-Prävalenz in Fäzes bzw. der Haut der Schlachtrinder und der Schlachttierkörperkontamination. Der fehlende Nachweis von Enterobacteriaceae schließt nach den Untersuchungen von WYSS und HOCKENJOS (1999) das Vorkommen von VTEC auf Schlachttierkörpern nicht aus.

Da die ersten bekannt gewordenen EHEC-Ausbrüche auf den Verzehr von Hamburgern zurückzuführen waren (RILEY et al., 1983), was dieser Erkrankung die Bezeichnung „Hamburger-Disease“ durch die Boulevard-Presse einbrachte, liegt ein Untersuchungs-Schwerpunkt traditionsgemäß bei **Rinderhackfleisch** bzw. den daraus hergestellten „Hamburger-Patties“. Der US-amerikanische „Food Safety and Inspection Service“ (FSIS) beispielsweise untersucht seit Oktober 1994 jährlich mehrere Tausend Proben von Hackfleisch-herstellenden Betrieben bzw. aus dem Einzelhandel auf das Vorkommen von *E. coli* O157:H7 (FSIS/USDA, 2004b; s. Tabelle 24). Der gegenwärtig rückläufige Trend positiver Nachweise wird u. a. auf die Implementierung von HACCP-Konzepten in den Betrieben zurückgeführt (FSIS/USDA, 2003). Entsprechende Spezifikationen mit Zulieferern sind ebenfalls Bestandteil dieses Maßnahmenkatalogs. Um Kreuzkontaminationen zu verhindern, empfiehlt der FSIS in seinem „Guidance for beef grinders and suppliers of boneless beef and trim“ außerdem die getrennte Verarbeitung von Ausgangsmaterial unterschiedlicher Zulieferer (FSIS/USDA, 2002). Untersuchungen von PRUETT et al. (2002) haben gezeigt, daß die Verarbeitung einer Charge kontaminierten Ausgangsmaterials zu einer heterogenen Verteilung der *E. coli* O157:H7-Zellen in der „Patty“-Charge und selbst in den einzelnen „Patties“ führt, wobei die Keimzahl relativ gering ist. Dies impliziert nach Ansicht der Autoren die Notwendigkeit umfangreicher Probenahmepläne sowie sensitiver Screeningmethoden wie der PCR. In dieser Arbeit konnte gleichzeitig gezeigt werden, daß ein gegebenes Ausgangsmaterial mit unterschiedlichen *E. coli* O157:H7-Stämmen kontaminiert sein kann. Durch den Zerkleinerungsprozeß werden *E. coli* O157:H7-Zellen nicht nur in der Hackfleisch-Charge verteilt, der Fleischwolf fungiert nach Untersuchungsergebnissen von FLORES und TAMPLIN (2002) gleichzeitig als Kontaminations-Reservoir, da *E. coli* O157:H7-Zellen an spezifischen Stellen akkumulieren. FLORES (2004) konnte weiterhin zeigen, daß nach Verarbeitung einer kontaminierten Rindfleischcharge durch den Kutter auch die nachfolgend verarbeitete Charge kontaminiert wurde. Die Nachweisbarkeit des Fäkalindikators *E. coli* in Hackfleisch scheint weder mit dem Vorkommen von VTEC allgemein, noch mit *E. coli* O157:H7 korreliert zu sein (TEUFEL et al., 1998; PRUETT et al., 2002); für hohe aerobe mesophile Keimzahlen bzw. hohe Konzentrationen an Enterobacteriaceae konnte jedoch ein Zusammenhang mit dem Auftreten von VTEC aufgezeigt werden (TEUFEL et al., 1998).

**Tabelle 22:** Nachweis von Verotoxin-bildenden *E. coli* (VTEC) sowie *E. coli* O157 in Fleisch und Fleischerzeugnissen (Europa außer Deutschland)

Land	Lebensmittel	Anzahl untersuchter Proben	Anzahl positiver Proben (%)		Quelle
			<i>E. coli</i> O157	VTEC allgemein	
CH <sup>1)</sup>	Rinderhackfleisch	211	0 <sup>2)</sup>	5 (2,4)	FANTELLI, 2001
	Schweinehackfleisch	189	0 <sup>2)</sup>	2 (1,1)	"
CZ <sup>3)</sup>	Geflügelfleisch	113	9 (8,0)	n. u. <sup>4)</sup>	LUCÁŠOVÁ et al., 2004
	Hackfleisch	139	6 (4,3)	"	"
	Rinderschlachttierkörper	97	1 (1,0)	"	"
	Schweineschlachttierkörper	43	0	"	"
	Geflügelschlachttierkörper	216	0	"	"
F <sup>5)</sup>	Rindfleisch	411	0	16 (3,9)	PRADEL et al., 2000
GB <sup>6)</sup>	Rinderschlachttierkörper	1.500	21 (1,4)	n. u.	CHAPMAN et al., 2001
	Lammschlachttierkörper	1.500	10 (0,7)	"	"
	Hackfleisch und rohe Fleischprodukte	4.983	22 (0,4)	"	"
	frisches Fleisch	1.190	2 (0,2)	"	COIA et al., 2001

<sup>1)</sup> Schweiz  
<sup>5)</sup> Frankreich

<sup>2)</sup> *E. coli* O157 ohne Verotoxin-Gen nachweisbar

<sup>6)</sup> Großbritannien

<sup>3)</sup> Tschechische Republik

<sup>4)</sup> nicht untersucht

**Fortsetzung Tabelle 22:** Nachweis von Verotoxin-bildenden *E. coli* (VTEC) sowie *E. coli* O157 in Fleisch und Fleischerzeugnissen (Europa außer Deutschland)

Land	Lebensmittel	Anzahl untersuchter Proben	Anzahl positiver Proben (%)		Quelle
			<i>E. coli</i> O157	VTEC allgemein	
HR <sup>1)</sup>	Hackfleisch (produkte)	114	0	n. u. <sup>2)</sup>	UHITIL et al., 2001
I <sup>3)</sup>	Rinderschlachtierkörper	100	12 (12,0)	"	BONARDI et al., 2001
	Rinderhackfleisch	931	4 (0,4)	"	CONEDERA et al., 2004
NL <sup>4)</sup>	gemischtes Hackfleisch	770	2 (0,3)	"	HEUVELINK et al., 1996
	Rinderhackfleisch	1.000	0	"	"
	Schweinehackfleisch	260	0	"	"
	Geflügelprodukte	300	0	"	"

<sup>1)</sup> Kroatien

<sup>2)</sup> nicht untersucht

<sup>3)</sup> Italien

<sup>4)</sup> Niederlande

**Tabelle 23:** Nachweis von Verotoxin-bildenden *E. coli* (VTEC) sowie *E. coli* O157 in Milch und Milcherzeugnissen (Europa außer Deutschland)

Land	Lebensmittel	Anzahl untersuchter Proben	Anzahl positiver Proben (%)		Quelle
			<i>E. coli</i> O157	VTEC allgemein	
CH <sup>1)</sup>	Bestandsmilchproben	310	0	0	STEPHAN und BUEHLER, 2001
CZ <sup>2)</sup>	Rohmilch	225	4 (1,8)	n. u. <sup>3)</sup>	LUCÁŠOVÁ et al., 2004
F <sup>4)</sup>	Käse	603	0	5 (0,8)	PRADEL et al., 2000
GB <sup>5)</sup>	Rohmilch	500	0	n. u.	COIA et al., 2001
	Rohmilchkäse	739	0	"	"
I <sup>6)</sup>	Molkereiprodukte (Rind, pasteurisiert)	657	0	"	CONEDERA et al., 2004
	" (Rind, roh)	811	0	"	"
	" (Schaf, pasteurisiert)	477	0	"	"
	" (Schaf, roh)	502	0	"	"
	Mozarella	501	0	"	"

1) Schweiz

2) Tschechische Republik

5) Großbritannien

3) nicht untersucht

4) Frankreich

**Tabelle 24:** Nachweis von Verotoxin-bildenden *E. coli* (VTEC) sowie *E. coli* O157 in Lebensmitteln (außerhalb Europa)

Land	Lebensmittel	Anzahl unter- suchter Proben	Anzahl positiver Proben (%)		Quelle
			<i>E. coli</i> O157	VTEC allgemein	
CN <sup>1)</sup>	diverse <sup>2)</sup>	4.034	33 (0,8)	n. u. <sup>3)</sup>	WANG et al., 2004
CR <sup>4)</sup>	Rohmilch	100	2 (2,0)	"	REUBEN et al., 2003
	Geflügelinnereien	100	3 (3,0)	"	"
MA <sup>5)</sup>	Molkereiprodukte	44	4 (9,1)	"	BENKERROUM et al., 2004
	frisches Fleisch	36	4 (11,1)	"	"
RA <sup>6)</sup>	Rinderhackfleisch	160	6 (3,8)	"	CHINEN et al., 2001
	„fresh sausages“	83	4 (4,8)	"	"
	„dry sausages“	30	1 (3,3)	"	"
TN <sup>7)</sup>	Fleisch(erzeugnisse)	120	0	3 (2,5)	AL-GALLAS et al., 2002
USA <sup>8)</sup>	Rinderschlachtierkörper				
	- „preevisceration“	334	144 (43,1)	180 (53,9) <sup>10)</sup>	ARTHUR et al., 2002; ELDER et al., 2000
	- „postprocessing“ <sup>9)</sup>	326	6 (1,8)	27 (8,3) <sup>10)</sup>	
	Tankmilchproben	268	2 (0,8)	n. u.	MURINDA et al., 2002
	Rinderhackfleisch	296	n. u.	(16,8) <sup>11)</sup>	SAMADPOUR et al., 2002
	Rinderhackfleisch	6.584	20 (0,3)	n. u.	FSIS/USDA, 2004a

<sup>1)</sup> Volksrepublik China  
<sup>2)</sup> Fleisch(erzeugnisse), Milch(erzeugnisse), Fisch(erzeugnisse), Gemüse  
<sup>3)</sup> nicht untersucht  
<sup>4)</sup> Costa Rica  
<sup>5)</sup> Marokko  
<sup>6)</sup> Argentinien  
<sup>7)</sup> Tunesien  
<sup>8)</sup> Vereinigte Staaten von Amerika  
<sup>9)</sup> nach antimikrobieller Behandlung  
<sup>10)</sup> nur non-O157  
<sup>11)</sup> nur Nachweis des Verotoxin-Gens, keine Erregerisolierung

## 2.6.2 Charakterisierung der Isolate

In Lebensmitteln nachweisbare VTEC weisen eine starke Heterogenität auf (TEUFEL et al., 1998). So gehörten 361 von ARTHUR et al. (2002) von Rinderschlachttierkörpern isolierte VTEC-Stämme 41 verschiedenen Serogruppen an. PRADEL et al. (2000) isolierten aus Rindfleisch und Käse insgesamt 24 VTEC-Stämme, welche 19 verschiedenen Serogruppen zuzuordnen waren. Nicht selten werden mehrere serologisch unterschiedliche Isolate in einer Lebensmittelprobe nachgewiesen (PATON et al., 1996; TRUMPF et al., 2000; ARTHUR et al., 2002). Auch wenn bislang nicht sicher bekannt ist, welche Eigenschaften einen VTEC-Stamm humanpathogen werden lassen, so zeigen sich doch in Serogruppenzugehörigkeit und Virulenzausstattung Unterschiede zu humanen EHEC-Stämmen, was die Hypothese unterstützt, daß nur eine Subpopulation der VTEC-Stämme als potentiell humanpathogen anzusehen ist (PRADEL et al., 2000; BÜLTE, 2001). Insbesondere das bei Isolaten von schwer erkrankten Patienten zu über 90 % nachweisbare *eae*-Gen wird bei Lebensmittel-Isolaten deutlich seltener angetroffen (s. Tabelle 25).

Tabelle 25: Charakterisierung von Lebensmittel-Isolaten verotoxinogener *Escherichia coli*

Land	Lebensmittel	Anzahl untersuchter Isolate	Anzahl positiver Isolate (%)			Quelle
			<i>vtx 2</i> <sup>1)</sup>	<i>eae</i> <sup>2)</sup>	<i>hly</i> <sub>EHEC</sub> <sup>3)</sup> O157	
D <sup>4)</sup>	Roh-/Vorzugsmilch	33	23 (69,7)	11 (33,3)	8 (24,2)	GALLIEN et al., 1998
	Fleisch, Hackfleisch	64	56 (87,5)	3 (4,7)	1 (1,6)	"
	Rohwurst	12	8 (66,7)	1 (8,3)	0	"
	diverse	459	407 (88,7)	50 (10,9)	k. A. <sup>5)</sup>	BÜLTE, 2001
F <sup>6)</sup>	Rindfleisch	18	11 (61,1)	0	0	PRADEL et al., 2000
	Schweinefleisch, Umgebungsproben Zerlegebetriebe	30	30 (100) <sup>7)</sup>	0	0	BOUVET et al., 2002a
	Schweineschlachttierkörper, Umgebungsproben Schlachthof	48	47 (97,9) <sup>8)</sup>	0	0	BOUVET et al., 2002b
USA <sup>9)</sup>	Rinderschlachttierkörper	361 <sup>10)</sup>	191 (52,9)	15 (4,2)	98 (27,1)	ARTHUR et al., 2002

<sup>1)</sup> Gen des Verotoxin 2 bzw. seiner Varianten, allein oder in Kombination

<sup>4)</sup> Deutschland

<sup>8)</sup> davon 41 *vtx 2e*

<sup>2)</sup> *E. coli* attaching and effacing-Gen

<sup>6)</sup> Frankreich

<sup>10)</sup> nur non-O157 berücksichtigt

<sup>3)</sup> Enterohämölysin-Gen

<sup>7)</sup> davon 29 *vtx 2e*

### 2.6.3 Lebensmittelrechtliche Beurteilung

Mit der „Verordnung zur Änderung tierseuchen- und lebensmittelrechtlicher Vorschriften zur Überwachung von Zoonosen und Zoonoseerregern“ vom 9. November 2004 (ANONYMOUS, 2004c) fand die Pathogruppe der Verotoxin-bildenden *E. coli* erstmals namentlich Eingang in das Lebensmittelhygienerecht. Gemäß Artikel 5 dieser Verordnung wurden die nachfolgend dargestellten Anforderungen in Bezug auf VTEC in die Milchverordnung (ANONYMOUS, 2000b) integriert.

Demnach dürfen im Geltungsbereich der Milchverordnung in roher Kuh-, Büffel-, Schaf- und Ziegenmilch zur Herstellung von Rohmilcherzeugnissen „verotoxinbildende *Escherichia coli* [...] nicht in Mengen enthalten sein, die die Gesundheit der Verbraucher gefährden können“. In Erzeugnissen auf Milchbasis dürfen bei Stichprobenkontrollen im Be- und Verarbeitungsbetrieb „verotoxinbildende *Escherichia coli* [...] nicht in Mengen vorhanden sein, die die Gesundheit der Verbraucher beeinträchtigen können“. Ähnliches gilt auch für Vorzugsmilch, dort dürfen bei Stichprobenuntersuchungen im Erzeugerbetrieb „verotoxinbildende *Escherichia coli* [...] nicht in Mengen vorhanden sein, die die Gesundheit des Verbrauchers beeinträchtigen können“. In pasteurisierter Konsummilch dürfen VTEC bei Stichprobenkontrollen im Be- und Verarbeitungsbetrieb in 25 ml nicht nachweisbar sein.

Das SCVPH hielt es gemäß seiner Stellungnahme vom 21./22. Januar 2003 für nicht angemessen, mikrobiologische Standards für VTEC im Allgemeinen oder VTEC der Serogruppe O157 im Besonderen festzusetzen. Aufgrund des nur sporadischen Vorkommens und der geringen Prävalenz von VTEC O157 in Risikolebensmitteln würde die Etablierung von mikrobiologischen Standards für VTEC O157 seiner Meinung nach nicht zu einer bedeutenden Reduktion des damit verbundenen Risikos für den Verbraucher führen. Vielmehr könnten mikrobiologische Richtwerte und Korrekturmaßnahmen, welche auf die Reduktion fäkaler Kontamination entlang der Lebensmittelkette abzielen, zu einer Reduktion gesundheitlicher Risiken inklusive der humanpathogenen VTEC führen; als Beispiel wird hier die Untersuchung auf *Enterobacteriaceae* angeführt.

Aufgrund fehlender Rechtsvorgaben sowie der Tatsache, daß immer noch keine sicheren Kriterien zur Differenzierung potentiell humanpathogener VTEC-Stämme von fakultativ pathogenen oder apathogenen Isolaten vorliegen, gestaltet sich die lebensmittelrechtliche Beurteilung von VTEC-Nachweisen in Lebensmitteln schwierig (PICHNER et al., 2001). Als Anhaltspunkt kann der im Rahmen einer ALTS-Tagung unternommene „Versuch einer lebensmittelrechtlichen Bewertung von Verotoxinbildenden *E. coli* (VTEC) und enterohämorrhagischen *E. coli* (EHEC)“ dienen (BÜLTE, 2000; s. [Tabelle 26](#)). Grundlage dieses Beurteilungsvorschlags bildet zum einen die Abgrenzung der Begriffe „potentielle EHEC“ (= *eae*-positive VTEC) und „VTEC“ (nur Bildung von Verotoxinen); zum anderen scheint auch für diese Pathogene eine Kategorisierung der Lebensmittel analog dem BgVV-Beurteilungsschema für *Listeria monocytogenes* (BGVV/BFR, 2000) zweckmäßig.

**Tabelle 26:** ALTS-Vorschlag zur Beurteilung von VTEC in Lebensmitteln  
(BÜLTE, 2000)

Lebensmittelkategorie	Lebensmittelrechtliche Beurteilung beim Nachweis von	
	EHEC <sup>1)</sup>	VTEC <sup>2)</sup>
Lebensmittel für Risikogruppen wie Säuglinge und Kleinkinder	§ 8 LMBG <sup>3)</sup>	§ 8 LMBG <sup>4)</sup>
rohe Lebensmittel, nach vorherseh- barem und bestimmungsgemäßem Gebrauch vor Verzehr erhitzt	§ 17 (1) 1 LMBG	keine Beanstandung
verzehrsmfähige Lebensmittel aller anderen Kategorien	§ 17 (1) 1 LMBG <sup>5)</sup>	§ 17 (1) 1 LMBG <sup>5)</sup>

<sup>1)</sup> Verotoxin-bildende *Escherichia coli*-Stämme mit *E. coli* attaching and effacing (*eae*)-Gen

<sup>2)</sup> Verotoxin-bildende *E. coli*-Stämme ohne *eae*-Gen

<sup>3)</sup> Lebensmittel- und Bedarfsgegenstände-Gesetz

<sup>4)</sup> Restrisiko für Risikogruppen

<sup>5)</sup> Prüfung auf Tatbestand nach § 8 LMBG eventuell pragmatischer; § 17 (1) 1 nicht zur Beurteilung von pathogenen Mikroorganismen vorgesehen

## **2.7 Vorkommen von VTEC bei Tieren**

### **2.7.1 Hauswiederkäuer**

#### **2.7.1.1 Epidemiologische Situation**

Große und kleine Wiederkäuer gelten gemeinhin als Reservoir der VTEC (CHAPMAN et al., 1997; HANCOCK et al., 2001; BÜLTE, 2002; PADOLA et al., 2004), wenngleich solche Stämme mittlerweile bei einer Vielzahl von Tierspezies nachgewiesen werden (BEUTIN et al., 1993a). In Deutschland werden regelmäßig VTEC-Stämme bei Rindern, Schafen und Ziegen nachgewiesen. Die Varianz der angegebenen Prävalenzen wird teilweise auf methodische Unterschiede zurückgeführt (RICHTER et al., 1997). Nur selten handelt es sich um *E. coli* der Serogruppe O157 (s. Tabelle 27). In Einzelfällen stellt sich dieses Bild jedoch anders dar. So konnten beispielsweise BÜLTE et al. (2002) in einer Mutterkuhherde in Weidehaltung bei 8 von 54 untersuchten Tieren (14,8 %) *E. coli* O157 isolieren. In anderen Ländern liegen die Nachweisraten für *E. coli* O157 oftmals höher, wobei viele Arbeitsgruppen auf den Nachweis anderer Serogruppen verzichten (s. Tabellen 28 und 29). Es wurden nur solche Prävalenzangaben berücksichtigt, die auf der Isolierung von VTEC- bzw. *E. coli* O157-Stämmen beruhen; auf die Problematik der Interpretation molekularbiologischer Screening-Ergebnisse wurde bereits in Kapitel 2.6.1 eingegangen.

Da es sich um enterale Erreger handelt, beruhen VTEC-Prävalenzangaben zumeist auf der Untersuchung von Kotproben. Die Konzentration der ausgeschiedenen VTEC-Stämme variiert dabei sehr stark. FUKUSHIMA und SEKI (2004) wiesen bei einem Großteil der von ihnen untersuchten Schlachtrinder weniger als  $10^2$  KbE pro Gramm Fäzes nach; jedoch konnten sie auch „high level carriers“ identifizieren, welche  $10^5$  bis  $10^8$  KbE/g ausschieden. SHERE et al. (1998) wiesen Ausscheidungskonzentrationen von  $2,0 \times 10^2$  bis  $8,7 \times 10^4$  KbE/g nach; LAHTI et al. (2003) fanden Ausscheidungsraten von  $< 10$  bis  $10^5$  KbE/g. In Inokulationsversuchen mit Ochsen konnte in Einzelfällen eine Ausscheidungsdauer von *E. coli* O157-Stämmen von bis zu 67 Tagen aufgezeigt werden (BUCHKO et al., 2000). CORNICK et al. (2000) konnten belegen, daß *E. coli* O157:H7-Stämme im Inokulationsversuch länger in Schafen persistieren als ETEC- und EPEC-Stämme, was die postulierte Adaptation von *E. coli* O157 an den Wiederkäuer-Magen-Darm-Trakt unterstreicht.

KEEN und ELDER (2002) konnten bei der Untersuchung eines Mastkollektivs allerdings zeigen, daß die Nachweisraten von *E. coli* O157 in der Maulhöhle sowie verschiedenen Beprobungsstellen auf der Haut diejenige in den Fäzes übertraf. Überraschenderweise waren insbesondere solche Hautbezirke besonders stark mit *E. coli* O157 kontaminiert, welche generell einen relativ geringen Verschmutzungsgrad aufweisen, wie Rücken und Nacken, wohingegen von den häufiger fäkal verschmutzten Partien an Bauch und Hintergliedmaße seltener *E. coli* O157 isoliert wurden. RICE et al. (2003) legten dar, daß die Beprobung der rektoanal Schleimhaut mittels Tupfern der Untersuchung von Kotproben (10 g) auf *E. coli* O157 oftmals überlegen ist. Lediglich im Zeitraum direkt nach der Exposition stellte sich diese Situation umgekehrt dar. Zusammenfassend lassen die dargestellten Arbeiten den Schluß zu, daß die mittels herkömmlicher Kotprobenuntersuchungen ermittelten Prävalenzdaten das tatsächliche Vorkommen von VTEC O157 unterschätzen.

Die Ergebnisse von RICE et al. (2003) lassen sich anhand der Lokalisation der *E. coli* O157-Kolonisierung im bovinen Gastrointestinaltrakt erklären. Frühere Untersuchungen hierzu ergaben differierende Ergebnisse. Neuere Erkenntnisse weisen jedoch zumindest für den Serotyp O157:H7 darauf hin, daß diese Organismen bei erwachsenen Rindern und Schafen vorwiegend im Colon-Bereich persistieren, wohingegen sie nur selten aus Pansen oder Duodenum zu isolieren sind (GRAUKE et al., 2002). NAYLOR et al. (2003) identifizierten das terminale Rektum als dominierende Kolonisierungsstelle für *E. coli* O157:H7 im bovinen Magen-Darm-Trakt; in diesem Bereich findet sich eine hohe Dichte an Lymphfollikeln. Der Gewebstropismus  $\gamma$ -Intimin-tragender VTEC O157:H7-Stämme für Follikel-assoziiertes Epithel wurde bereits von anderen Autoren dargestellt (PHILLIPS und FRANKEL, 2000; PHILLIPS et al., 2000; s. Kapitel 2.4.2.1). Entsprechend diesem Kolonisierungsmuster fanden NAYLOR et al. (2003) die höchste *E. coli* O157:H7-Konzentration an der Oberfläche der Fäzes, wohingegen *E. coli* anderer Serotypen gleichmäßig im Kot verteilt waren. Neben dem LEE-codierten Intimin scheint auch Verotoxin 1 bei der Kolonisierung des Rinderdarmepithels eine Rolle zu spielen. MENGE et al. (2003) bescheinigten VT 1 eine immunmodulierende Wirkung auf bovine Lymphozyten, was die Besiedlung der bovinen Darmschleimhaut durch Interaktion mit lokalen B-Zellen vereinfachen könnte.

**Tabelle 27:** Nachweis von Verotoxin-bildenden *E. coli* (VTEC) sowie *E. coli* O157 in Kotproben von Wiederkäuern (Deutschland)

Tierkollektiv	Anzahl untersuchter Proben	Anzahl positiver Proben (%)		Quelle
		<i>E. coli</i> O157	VTEC allgemein	
Milchkühe	82	n. u. <sup>1)</sup>	10 (12,2)	BÜLTE et al., 1990
Mastrinder	212	"	20 (9,4)	"
Rinder	142	0	30 (21,1)	BEUTIN et al., 1993a
Schafe	120	0	80 (66,6)	"
Ziegen	66	0	37 (56,1)	"
Kälber <sup>2)</sup>	119	n. u.	7 (5,9)	GALLIEN et al., 1994
Schafe	15	k. A. <sup>3)</sup>	3 (20,0)	"
Schlachtrinder	204	0	97(47,6)	RICHTER et al., 1997
Milchkühe	726	0	131 (18,0)	ZSCHÖCK et al., 2000
Schafe	28	0	9 (32,1)	"
Ziegen	93	0	70 (75,3)	"
Rinder	533	15 (2,8)	82 (15,4)	BÜLTE, 2002
Schafe	131	0	53 (40,5)	"
Mastrinder und Milchkühe	2.163	6 (0,3)	810 (37,4)	GEUE et al., 2002

<sup>1)</sup> nicht untersucht

<sup>2)</sup> erkrankt, unterschiedliche Diagnosen

<sup>3)</sup> keine Angaben

**Tabelle 28:** Nachweis von Verotoxin-bildenden *E. coli* (VTEC) sowie *E. coli* O157 in Kotproben von Wiederkäuern (Europa außer Deutschland)

Land	Tierkollektiv	Anzahl unter-suchter Proben	Anzahl positiver Proben (%)		Quelle
			<i>E. coli</i> O157	VTEC allgemein	
DK <sup>1)</sup>	Kälber (2-6 Monate)	443	38 (8,6)	n. u. <sup>2)</sup>	MØLLER-NIELSEN et al., 2002
	Milchkühe	975	23 (2,4)	"	"
E <sup>3)</sup>	Kälber	101	0	8 (7,9)	ORDEN et al., 2002
	Färsen	114	0	23 (20,2)	"
	adulte Rinder	197	0	5 (2,5)	"
	Lämmer	1.300	5 (0,4)	467 (35,9)	BLANCO et al., 2003
F <sup>4)</sup>	Schlachtrinder	471	1 (0,2)	162 (34,4)	PRADEL et al., 2000
FIN <sup>5)</sup>	Mastbullen	688	110 (16,0)	n. u.	LAHTI et al., 2003
GB <sup>6)</sup>	Mastrinder	1.840	246 (13,4)	"	CHAPMAN et al., 1997
	Milchrinder	1.661	268 (16,1)	"	"
	Schafe	1.000	22 (2,2)	"	"
I <sup>7)</sup>	Schlachtrinder	100	17 (17,0)	"	BONARDI et al., 2001
N <sup>8)</sup>	Rinder	1.541	3 (0,2)	"	JOHNSEN et al., 2001
	Schafe	665	0	"	"
NL <sup>9)</sup>	adulte Rinder	540	57 (10,6)	"	HEUVELINK et al., 1998a
	Kälber	397	2 (0,5)	"	"
	Mutterschafe	52	2 (3,8)	"	"
	Lämmer	49	2 (4,1)	"	"
S <sup>10)</sup>	Rinder	3.071	37 (1,2)	"	ALBIHN et al., 2003

<sup>1)</sup> Dänemark

<sup>5)</sup> Finnland

<sup>9)</sup> Niederlande

<sup>2)</sup> nicht untersucht

<sup>6)</sup> Großbritannien

<sup>10)</sup> Schweden

<sup>3)</sup> Spanien

<sup>7)</sup> Italien

<sup>4)</sup> Frankreich

<sup>8)</sup> Norwegen

**Tabelle 29:** Nachweis von Verotoxin-bildenden *E. coli* (VTEC) sowie *E. coli* O157 in Kotproben von Wiederkäuern (außerhalb Europas)

Land	Tierkollektiv	Anzahl unter-suchter Proben	Anzahl positiver Proben (%)		Quelle
			<i>E. coli</i> O157	VTEC allgemein	
BR <sup>1)</sup>	Kälber	344	0	20 (5,8)	LEOMIL et al., 2003
EAU <sup>2)</sup>	Zebus	159	0	45 (28,3)	KADDU-MULINDWA et al., 2001
J <sup>3)</sup>	Färsen	2.744	153 (5,6)	n. u. <sup>4)</sup>	EZAWA et al., 2004
	Schlachtrinder	605	k. A. <sup>5)</sup>	97 (16,0)	FUKUSHIMA und SEKI, 2004
ROK <sup>6)</sup>	Kälber	254	7 (2,8)	n. u.	KANG et al., 2004
USA <sup>7)</sup>	Rinder	11.881	210 (1,8)	"	HANCOCK et al., 1997
	Kälber	115	k. A.	19 (16,5)	RAHN et al., 1997
	Milchkühe	291	k. A.	26 (8,9)	"
	Milchkühe (Farm)	205	7 (3,4)	n. u.	RICE et al., 1997
	Milchkühe (Schlachthof)	103	4 (3,9)	"	"
	Mastrinder	3.162	719 (22,7)	"	SMITH et al., 2001
	Mastrinder	139	84 (60,4)	"	KEEN und ELDER, 2002
	Rinder	9.122	82 (0,9)	"	RENTER et al., 2003
	Mastrinder	888	27 (3,1)	"	RILEY et al., 2003
Kälber	408	10 (2,5)	"	DUNN et al., 2004	

<sup>1)</sup> Brasilien

<sup>2)</sup> Uganda

<sup>3)</sup> Japan

<sup>4)</sup> nicht untersucht

<sup>5)</sup> keine Angaben

<sup>6)</sup> Republik Korea

<sup>7)</sup> Vereinigte Staaten von Amerika

Die meisten Untersucher konnten eine saisonale Abhängigkeit der *E. coli* O157-Prävalenz aufzeigen, wobei die höchsten Raten in den Sommermonaten festzustellen sind (CHAPMAN et al., 1997; HEUVELINK et al., 1998b; GARBER et al., 1999; HANCOCK et al., 2001; LAHTI et al., 2003). Im Gegensatz dazu wurden bei schottischen Schlachtrindern höhere *E. coli* O157-Nachweisraten in der kälteren Jahreszeit gefunden; die Konzentration solcher Stämme in den Fäzes war allerdings in den wärmeren Monaten erhöht (OGDEN et al., 2004).

Weiterhin werden bei Kälbern generell höhere *E. coli* O157- bzw. VTEC-Prävalenzen gefunden als bei adulten Rindern. Für diese Altersabhängigkeit werden verschiedene Ursachen diskutiert: Bei adulten Rindern stellt das Pansenmilieu mit niedrigem pH-

Wert und hohen Konzentrationen flüchtiger Fettsäuren ein Wachstumshemmnis für *E. coli* O157-Stämme dar, wohingegen die Pansenfunktion bei Kälbern noch nicht ausgeprägt ist. Weiterhin sind Änderungen in Fütterungsregime und Aufstallung sowie unterschiedliche immunologische Gegebenheiten bei juvenilen und adulten Tieren als Ursachen denkbar (RAHN et al., 1997; HEUVELINK et al., 1998b; HANCOCK et al., 2001; MØLLER-NIELSEN et al., 2002). *In vitro*-Studien zur Kolonisation von Darmschleimhaut mit *E. coli* O157-Stämmen erbrachte keine Unterschiede zwischen den Gewebeproben von Kälbern und von adulten Rindern; allerdings war die Kolonisation unter Bedingungen, wie sie bei entwickeltem Vormagensystem adulter Wiederkäuer zu erwarten sind (hoher Anteil flüchtiger Fettsäuren, niedriger pH-Wert) deutlich erniedrigt (COBBOLD und DESMARCHELIER, 2004).

### 2.7.1.2 Risikofaktoren und Übertragungswege

Während viele Autoren die VTEC-Ausscheidungsdauer bei Einzeltieren als relativ begrenzt ansehen, kann sich solch ein Stamm innerhalb der Herde bzw. innerhalb eines Betriebes über Monate etablieren und zu Reinfektionen der individuellen Tiere führen (SHERE et al., 1998; GEUE et al., 2002; EZAWA et al., 2004). Dabei wird der **horizontalen Übertragung** zwischen den Herdenmitgliedern von vielen Arbeitsgruppen eine große Bedeutung beigemessen (HEUVELINK et al., 1998b; COBBOLD und DESMARCHELIER, 2002). LAEGREID und KEEN (2004) schätzen, daß von einem mit VTEC O157 infizierten Mastkalb durchschnittlich vier bis fünf Sekundärinfektionen resultieren. Daneben spielt jedoch auch die **Übertragung durch abiotische und biotische Faktoren aus der Umgebung** eine große Rolle (SHERE et al., 1998; LAHTI et al., 2003). VTEC- bzw. *E. coli* O157-Stämme werden regelmäßig auf verschiedenen Oberflächen in den Stallungen (RAHN et al., 1997), in Futtermitteln (RAHN et al., 1997; SHERE et al., 1998; BUCHKO et al., 2000) und im Tränkewasser (HANCOCK et al., 1998; SHERE et al., 1998; BUCHKO et al., 2000, RENTER et al., 2003) nachgewiesen. Die Überlebensdauer von *E. coli* O157:H7-Stämmen in Wassertrögen betrug im Modellversuch über sechs Monate (LEJEUNE et al., 2001). HANCOCK et al. (2001) stellten die Hypothese auf, daß zugekauftes Futter der primäre Vektor für die regionale Ausbreitung von *E. coli* O157:H7-Stämmen darstellt. Korrekt hergestellte Silage scheint demgegenüber als Vektor für *E. coli* O157:H7-Stämme unwahrscheinlich (BYRNE et al., 2002). In Rinderfäzes sind *E. coli* O157:H7-Stämme je nach Inokulum bis zu 70 Tage nachweisbar, wobei das Verotoxinbildungsvermögen erhalten bleibt (WANG et al., 1996). In der Untersuchung von FUKUSHIMA et al. (1999) waren VTEC verschiedener Serovare sogar bis zu 14 Wochen bei 15 °C nachweisbar. In mit Rinderdung vermischter Erde überleben *E. coli* O157:H7-Stämme in Abhängigkeit von Temperatur, Mischungsverhältnis und bodeneigenen Mikroorganismen bis zu 231 Tage (JIANG et al., 2002). Ordnungsgemäße Kompostierung inaktiviert *E. coli* O157, wobei eine ausreichende Kompostierungstemperatur entscheidend ist (LUNG et al., 2001). Weiterhin wurden VTEC- bzw. *E. coli* O157-Stämme auch aus der belebten Umwelt isoliert, beispielsweise von Fliegen (RAHN et al., 1997; HANCOCK et al., 1998; HEUVELINK et al., 1998b; IWASA et al., 1999), Vögeln (HANCOCK et al., 1998; SHERE et al., 1998) sowie verschiedenen Wildtieren (SHERE et al., 1998; RENTER et al., 2003). Aufgrund dieser weiten Verbreitung stellten HANCOCK et al. (2001) die Überlegung an, daß eventuell weniger die Rinder selbst, sondern vielmehr die Rinderfarmen als Reservoir für *E. coli* O157:H7-Stämme anzusehen sein könnten.

Eine schottische Arbeitsgruppe identifizierte Stallhaltung bzw. bei Weidehaltung die Anwesenheit von Wildgänsen als primäre **Risikofaktoren** für VTEC O157-Ausscheidung bei Mutterkühen; daneben erwiesen sich auch Änderungen der Herdengröße, die Anwesenheit von Hunden sowie Trester-Fütterung als statistisch signifikant assoziiert, wohingegen im Zeitraum der Abkalbung eine geringere Ausscheidung beobachtet wurde (SYNGE et al., 2003). Eine amerikanische Arbeitsgruppe entdeckte rassebedingte Einflüsse auf die VTEC O157-Ausscheidung: Romosinuano-Kühe erwiesen sich seltener als VTEC O157-positiv als Angus- oder Brahman-Kühe. Unterschiede im Fütterungsregime oder Trächtigkeitsstatus schienen keinen Einfluß auf die *E. coli* O157-Prävalenz zu haben (RILEY et al., 2003). Weiterhin konnte ein Zusammenhang zwischen Bodenbeschaffenheit und *E. coli* O157-Ausscheidung nachgewiesen werden: Tiere aus schlammigen Pferchen erwiesen sich signifikant häufiger als *E. coli* O157-positiv. Kein Effekt konnte hingegen für die Sauberkeit, Temperatur oder pH-Wert des Tränkewassers, den pH-Wert des Futters, die Herdengröße, das Körpergewicht oder die Aufenthaltsdauer aufgezeigt werden (SMITH et al., 2001). Andere Autoren identifizierten die Düngentfernung mittels Wasser als Risikofaktor, der mit einer 8-fach höheren *E. coli* O157-Prävalenz im Vergleich zu anderen Düngentfernungstechniken einherging (GARBER et al., 1999). Eine Untersuchung in dänischen Milchviehbetrieben konnte keinen Zusammenhang zwischen Herdengröße oder Aufstellungsbedingungen und dem Vorkommen von *E. coli* O157 nachweisen (MØLLER-NIELSEN et al., 2002). BÜLTE et al. (2002) beobachteten bei einer Mutterkuhherde einen deutlichen Anstieg der VTEC-Ausscheidung bei Weidehaltung im Vergleich zur Stallhaltung. Genau entgegengerichtet waren die Beobachtungen von JONSSON et al. (2001), der bei Kälbern eine geringere *E. coli* O157:H7-Prävalenz bei Weidehaltung feststellte. Mögliche Ursachen für die Beeinflussung der VTEC-Prävalenz durch das Haltungssystem werden zum einen in der unterschiedlichen Futterzusammensetzung, zum anderen in der unterschiedlichen Exposition zu VTEC-Stämmen der belebten und unbelebten Umwelt gesehen (JONSSON et al., 2001; BÜLTE et al., 2002). Nicht auszuschließen ist bei der Untersuchung von JONSSON et al. (2001) jedoch eine Verzerrung der Ergebnisse durch das unterschiedliche Alter der beiden Kälbergruppen.

Die Auswirkungen der **Fütterung** auf die Ausscheidung von *E. coli* O157:H7-Stämmen war und ist Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. Einige Autoren konnten einen Zusammenhang zwischen Futterentzug und erhöhter Ausscheidung von *E. coli* O157 aufzeigen (MAGNUSON et al., 2000). Aktuelle *in vitro*-Studien zur Kolonisation der Darmschleimhaut mit *E. coli* O157-Stämmen stützen diese Hypothese, da die Kolonisation in einem Milieu mit hohem Anteil flüchtiger Fettsäuren und niedrigem pH-Wert, wie es bei gut gefütterten Rindern zu erwarten steht, erniedrigt ist (COBBOLD und DESMARCHELIER, 2004). Allerdings stehen diesen Ergebnissen andere Arbeiten entgegen, die bei Inokulationsversuchen mit Kälbern keine Assoziation zwischen Futterentzug und vermehrter Ausscheidung von *E. coli* O157 feststellen konnten (BROWN et al., 1997; CRAY et al., 1998; HARMON et al., 1999). Weiterhin gibt es Hinweise, daß Futterentzug die Empfänglichkeit für *E. coli* O157-Infektionen erhöht (CRAY et al., 1998). Praktische Bedeutung erlangen diese Untersuchungen im Hinblick auf den bei Schlachttieren auftretenden Futterentzug, wo eine

vermehrte VTEC-Ausscheidung ein erhöhtes Risiko der Schlachtkörperkontamination bedingen würde (HARMON et al., 1999).

Auch die Einflüsse der Futterzusammensetzung scheinen immer noch nicht klar (TKALCIC et al., 2000; BÜLTE et al., 2002). Generell konnte ein deutlicher Effekt der unterschiedlichen Kohlenhydrat-Arten auf die Struktur der bovinen intestinalen *E. coli*-Population ermittelt werden (McSWEENEY et al., 2004). Während einige Autoren eine verlängerte *E. coli* O157-Ausscheidung bei Heufütterung beobachteten (HOVDE et al., 1999), konnte in anderen Studien weder *in vivo*, noch *in vitro* ein Zusammenhang zwischen erhöhtem Rauhfutteranteil und erhöhter VTEC-Ausscheidung dargestellt werden (MAGNUSON et al., 2000; TKALCIC et al., 2000; COBBOLD und DESMARCHELIER, 2004). Nach Ergebnissen von MAGNUSON et al. (2000) ist die Ausscheidungsdauer bei Rindern mit der Epithelzellproliferation in Caecum und distalem Colon assoziiert; diese wurde in ihrer Untersuchung aber weder von typischer Getreide-, noch von üblicher Rauhfutter-basierter Fütterung beeinflusst. BUCHKO et al. (2000) berichteten von einer teilweise erhöhten *E. coli* O157:H7-Ausscheidung bei Gersten-Fütterung im Vergleich zu Mais- oder kombinierter Gersten-/Baumwollsamens-Fütterung.

### 2.7.1.3 Krankheitsbild

Verschiedene Autoren berichten über eine signifikant höhere Nachweisbarkeit von VTEC- bzw. *E. coli* O157-Stämmen bei Diarrhöe-kranken Kälbern (WIELER et al., 1992; LEOMIL et al., 2003; KANG et al., 2004). In den Untersuchungen von WIELER et al. (1992; 1996) traf dies insbesondere auf VT 1- und *eae*-positive Stämme zu; 29,5 % der *eae*-positiven Isolate Diarrhöe-kranker Kälber gehörten der Serogruppe O118 an. In der Studie von KANG et al. (2004) konnte ein Zusammenhang zwischen *E. coli* O157-Nachweis und dem Auftreten von Diarrhöe nur für neonatale Kälber aufgezeigt werden; bei über acht Wochen alten Kälbern waren keine statistisch signifikanten Unterschiede mehr nachweisbar. Von Inokulationsversuchen ist bekannt, daß nach Applikation von  $10^{10}$  KbE VTEC-Stämmen bei sechs bis acht Wochen alten Kälbern teilweise Fieber sowie milde Diarrhöe beobachtet werden kann (BROWN et al., 1997; TKALCIC et al., 2003). Bei adulten Rindern konnte kein Zusammenhang zwischen hoher VTEC-Prävalenz und Diarrhöe festgestellt werden (GEUE et al., 2002). Wie bereits erwähnt, scheinen VTEC bei *E. coli*-Mastitiden nur eine geringe Rolle zu spielen (ZSCHÖCK et al., 1998). Extraintestinale Komplikationen, wie sie beim Menschen auftreten, sind bei Wiederkäuern nicht bekannt.

### 2.7.1.4 Charakterisierung der Isolate

Bovine Isolate weisen eine starke Heterogenität auf (RICHTER et al., 1997; ZSCHÖCK et al., 2000). In der Untersuchung von PRADEL et al. (2000) waren 186 Isolate 46 verschiedenen Serogruppen zuzuordnen. RICHTER et al. (1997) identifizierten 55 verschiedene Serovare bei 97 VTEC-ausscheidenden Schlachtrindern, wobei von einigen Tieren mehrere unterschiedliche VTEC-Stämme isoliert werden konnten. Insbesondere bei Untersuchungen in Deutschland finden sich nur ausnahmsweise *E. coli*-Stämme der Serogruppe O157 darunter (s. Tabelle 30). Einige Serotypen, die bereits bei humanen EHEC-Erkrankungen in Erscheinung getreten sind, konnten bislang jedoch überhaupt nicht oder nur sehr selten von Rindern isoliert werden, so daß

für solche Stämme andere Reservoirs diskutiert werden. Zu nennen sind hier zum einen VTEC O118:H12- und VTEC O118:H30-Stämme, die bislang nur beim Menschen gefunden wurden und sich bei PFGE-Analysen separaten Clustern zuordnen lassen (WIELER et al., 2000). Ebenfalls noch unbekannt ist das Reservoir Sorbit-fermentierender VTEC O157:H<sup>-</sup>-Stämme (ALPERS et al., 2004), die bislang nur vereinzelt bei Rindern nachgewiesen werden konnten (BIELASZEWSKA et al., 2000; ORTH et al., 2004).

Der überwiegende Anteil boviner Isolate beherbergt ein Gen der *vtx* 2-Gruppe, entweder allein oder in Kombination. Im Vergleich zu humanen Stämmen wird jedoch deutlich seltener das *eae*-Gen nachgewiesen (s. Tabelle 30). Da immer noch keine eindeutigen Marker zur Abschätzung der Humanpathogenität einzelner Isolate identifiziert wurden, gestaltet sich die Interpretation der Bedeutung boviner Stämme für das Krankheitsgeschehen beim Menschen schwierig (PRADEL et al., 2000; ZSCHÖCK et al., 2000). Ähnlich wie auch im Lebensmittelbereich ist aber unter Bezugnahme auf unterschiedliche Virulenzprofile und Serogruppenverteilung vermutlich davon auszugehen, daß nur ein Teil der bovinen VTEC-Population als humanpathogen anzusehen ist (PRADEL et al., 2000; ZSCHÖCK et al., 2000; BÜLTE, 2001; ROGERIE et al., 2001).

Die **ovine VTEC-Population** unterscheidet sich in Serogruppen-Zusammensetzung und Virulenzprofil-Verteilung von den aus Rinderbeständen gewonnenen Isolaten. Obgleich auch bei Schafen eine Vielzahl unterschiedlicher VTEC-Serotypen beschrieben wurde, konnten verschiedene Untersucher weltweit die Dominanz bestimmter Serovaren, wie O5:H<sup>-</sup>, O91:H<sup>-</sup> oder O128:H2, belegen (BEUTIN et al., 1993a; DJORDJEVIC et al., 2001; URDAHL et al., 2002b; BLANCO et al., 2003; BRETT et al., 2003). Im Gegensatz zur Situation bei den bovinen Stämmen überwiegen bei ovinen Isolaten *vtx* 1-positive Stämme (s. Tabelle 30); hierbei handelt es sich zum großen Teil um die Variante *vtx* 1c, die als weniger virulent für den Menschen angesehen wird (URDAHL et al., 2002b; BRETT et al., 2003; s. Kapitel 2.4.1.2).

Tabelle 30: Charakterisierung boviner, oviner und capriner Isolate verotoxinogener *Escherichia coli*

Land	Tierkollektiv	Anzahl untersuchter Isolate	Anzahl positiver Isolate (%)				Quelle
			<i>vtx 2</i> <sup>1)</sup>	<i>eae</i> <sup>2)</sup>	<i>hly<sub>HEC</sub></i> <sup>3)</sup>	O157	
AUS <sup>4)</sup>	Rinder	128	95 (74,2)	38 (29,7)	52 (40,6)	12 (9,4)	COBBOLD und DESMARCHÉLIER, 2001
	Schafe	90	30 (33,3)	11 (12,2)	84 (93,3)	2 (2,2)	DJORDJEVIC et al., 2001
D <sup>5)</sup>	Schlachtrinder	667	k. A. <sup>6) 7)</sup>	23 (3,4)	369 (55,3) <sup>8)</sup>	0	RICHTER et al., 1997
	Rinder	131	97 (74,0)	6 (4,6)	81 (61,8)	0	ZSCHÖCK et al., 2000
	Ziegen	70	1 (1,4)	1 (1,4)	68 (97,1)	0	"
	Rinder	440	377 (85,7)	31 (7,0)	361 (82,0)	k. A.	BÜLTE, 2001
	Rinder	k. A. <sup>9)</sup>	(87,5) <sup>9)</sup>	(6,2) <sup>9)</sup>	(26,5) <sup>9)</sup>	(0,7) <sup>9)</sup>	GEUE et al., 2002
E <sup>10)</sup>	Lämmer	384	171 (44,5)	23 (6,0)	106 (27,6)	5 (1,3)	BLANCO et al., 2003
F <sup>11)</sup>	Rinder	186	168 (90,3)	9 (4,8)	90 (48,4)	1 (0,5)	PRADEL et al., 2000
	Rinder	183	141 (77,0)	6 (3,3)	31 (16,9)	0	ROGERIE et al., 2001
J <sup>12)</sup>	Rinder	92	64 (70,0)	22 (23,9)	66 (71,7)	1 (1,1)	KOBAYASHI et al., 2001

<sup>1)</sup> Gen des Verotoxin 2 bzw. seiner Varianten, allein oder in Kombination  
<sup>2)</sup> *E. coli* attaching and effacing-Gen  
<sup>3)</sup> Enterohämolysin-Gen  
<sup>4)</sup> Australien  
<sup>5)</sup> Deutschland  
<sup>6)</sup> keine Angabe  
<sup>7)</sup> Bezug der Angabe auf ausscheidende Tiere: 92,8 %  
<sup>8)</sup> bestimmt als CVD 419-positiv  
<sup>9)</sup> unterschiedliche Bezugsquellen  
<sup>10)</sup> Spanien  
<sup>11)</sup> Frankreich  
<sup>12)</sup> Japan

### 2.7.1.5 Bekämpfung

Klassische Eradikationsprogramme, wie sie für bestimmte Zoonoseerreger wie z. B. Rindertuberkulose erfolgreich durchgeführt wurden, sind für die Bekämpfung von VTEC-Vorkommen in Nutztierbeständen aufgrund der ubiquitären Verbreitung des Erregers ungeeignet (HANCOCK et al., 2001; BÜLTE, 2002). Die gegenwärtig geplante Bekämpfungsstrategie im pre-harvest-Bereich ist vielmehr quantitativ ausgerichtet: Durch Reduktion der Anzahl VTEC-ausscheidender Tiere, der Ausscheidungsdauer und -erregerkonzentration soll die Lebensmittelkontamination und somit auch die Häufigkeit menschlicher Erkrankungsfälle vermindert werden (HANCOCK et al., 2001).

Die Bedeutung von Futter und Tränkewasser als Vektor für VTEC wurde bereits in Kapitel 2.7.1.2 erläutert; vom theoretischen Standpunkt aus wären dies also geeignete Interventionspunkte. *In praxi* ist die Umsetzung einer konsequenten **Futter- und Tränkehygiene** im erforderlichen Maße jedoch nur bedingt möglich; bei Freilandhaltung ist sie unvorstellbar (BÜLTE, 2002). Eine Einflußnahme auf die VTEC-Ausscheidung über die Zusammensetzung der Futtermittelration ist gegenwärtig Gegenstand vieler Forschungsarbeiten; die Ergebnisse sind jedoch widersprüchlich (BÜLTE, 2002; s. Kapitel 2.7.1.2).

Ein weiterer Ansatz beschäftigt sich mit der Entwicklung von **Impfstoffen**, die die VTEC-Belastung der Nutztierbestände verringern soll. Aufgrund der Heterogenität der VTEC-Population ist eine breit wirksame Vakzine wohl nicht herstellbar; die Untersuchungen konzentrieren sich z. Zt. v. a. auf den Serotyp O157:H7. Ansatzpunkt hierbei ist die Verhinderung bzw. Verminderung der Adhäsion von *E. coli* O157-Stämmen an die Darmschleimhaut. Eine amerikanische Arbeitsgruppe konnte im Mausmodell eine verkürzte *E. coli* O157-Ausscheidung durch Immunisierung mit Intimin bewirken (JUDGE et al., 2004). In einem klinische Versuch konnte die *E. coli* O157-Prävalenz in einem Rinderbestand durch Vakzination mit Typ III-sezernierten Proteinen signifikant verringert werden (POTTER et al., 2004). Kommerziell sind noch keine Vakzinen verfügbar.

Ebenfalls Gegenstand verschiedener Untersuchungen ist die Verringerung der VTEC-Ausscheidung durch **kompetitive Inhibition** „probiotischer“ Bakterienstämme. Eine amerikanische Arbeitsgruppe konnte durch orale Verabreichung von „probiotischen“ *E. coli*-Stämmen, deren Hemmwirkung auf *E. coli* O157 zuvor *in vitro* ermittelt worden war, die *E. coli* O157:H7-Belastung der meisten Versuchskälber verringern, sofern die probiotische Behandlung vor Inokulation der O157-Stämme erfolgte (ZHAO et al., 1998). Auch die umgekehrte Abfolge, die Verabreichung probiotischer Stämme an bereits mit VTEC O157:H7 oder VTEC O111:H<sup>-</sup> inokulierte Kälber, führte zu einer Reduktion der VTEC-Ausscheidung. Für den VTEC O26:H11-Versuchsstamm gelang dies aber nicht (TKALCIC et al., 2003).

Nicht unerwähnt bleiben soll der Ansatz zur Abtötung von gastrointestinalen *E. coli*-Stämmen über die Verabreichung von **Chlorat**. Bakterienstämme, die wie *E. coli* das Enzym Nitratreduktase beherbergen, verstoffwechseln Chlorat zu Chlorit, welches zytotoxisch wirkt. Bei Schafen konnte eine Verringerung der *E. coli* O157-Prävalenz durch die orale Gabe von 100 mM NaClO<sub>3</sub> erzielt werden; ebenso wurde der Gehalt an coliformen Keimen sowie *E. coli* allgemein reduziert. Intestinaler pH-Wert, der Ge-

halt an flüchtigen Fettsäuren sowie das Azetat/Propionat-Verhältnis wurden nicht beeinflusst. Eine praktische Anwendungsmöglichkeit sehen die Autoren in der Verabreichung an Wiederkäuer kurz vor der Schlachtung, um das Kontaminationsrisiko für die Schlachttierkörper zu verringern. Zuvor sind jedoch weitere Untersuchungen zur Toxizität von Chlorat sowie zur Akkumulation im tierischen Gewebe notwendig (CALLAWAY et al., 2003).

Während die VTEC-Belastung der Nutztierbestände v. a. im Hinblick auf die Kontamination der daraus gewonnenen Lebensmittel Bedeutung erlangt, steht bei Wiederkäuern, die in **Streichelzoos** gehalten werden, die direkte Übertragung auf den Menschen im Vordergrund. Nachdem vermehrt Erkrankungsfälle durch Besuch von Streichelzoos bekannt wurden (CHAPMAN et al., 2000; HEUVELINK et al., 2002; PRITCHARD et al., 2003), haben Behörden und Verbände reagiert und Richtlinien erarbeitet, wodurch das von Tieren ausgehende Infektionsrisiko minimiert werden soll. Das amerikanische CDC beispielsweise setzt auf Personalschulung und Besucherinformation; weiterhin wird empfohlen, den Tierkontakt auf spezielle dafür vorgesehene Bereiche zu beschränken, in welchen keine Lebensmittel und Getränke ausgegeben oder verzehrt werden dürfen. Große Bedeutung wird auch der ausreichenden Anzahl und Ausstattung von Handwascheinrichtungen zugemessen. Die Ausgabe von Rohmilch wird nicht empfohlen (CDC, 2003). Ausführlichere Informationen stellt das „Compendium of measures to prevent disease and injury associated with animals in public settings, 2004“ der „National Association of State Public Health Veterinarians, Inc.“ bereit (NASPHV, 2004). Auch das südaustralische „Department of Human Services“ hat eine entsprechende „Petting zoo infection control guideline“ erarbeitet (DEPARTMENT OF HUMAN SERVICES, 2002).

### 2.7.2 Pferde

Pferde waren nur selten Gegenstand umfangreicher Reihenuntersuchungen zur Bestimmung der VTEC-Prävalenz bei dieser Tierart; häufiger handelt es sich um Arbeiten, die in Zusammenhang mit humanen Erkrankungsfällen oder Reihenuntersuchungen anderer Tierarten im gleichen Betrieb durchgeführt wurden (s. Tabellen 31 bis 33). In Einzelfällen wurden dabei VTEC-Stämme nachgewiesen. Die geringe Anzahl gewonnener Isolate läßt keine Tendenzen zur Dominanz bestimmter Serotypen oder Virulenzprofile erkennen. Der hohe Anteil an *E. coli* O157-Stämmen unter den aufgelisteten Isolaten liegt in der von vielen Untersuchern verwendeten selektiven Nachweismethodik für diese Serogruppe begründet. Insgesamt erscheint die VTEC-Prävalenz bei Pferden vergleichsweise niedrig, so daß sie nicht als Reservoir, sondern eher als zufällige sporadische Ausscheider angesehen werden. Trotzdem dürfen sie bei der Ursachenforschung von EHEC-Erkrankungsfällen nicht unberücksichtigt bleiben, da bereits mehrfach über derartige Zusammenhänge berichtet wurde (SANDER, 2002).

Bei einem in Bayern aufgetretenen HUS-Fall wurden Minipferde als wahrscheinliche Infektionsquelle ermittelt, mit denen das Kleinkind regelmäßig Kontakt hatte. Von den Tieren gewonnene *E. coli* O157:H<sup>-</sup>-Isolate wiesen in wesentlichen Merkmalen eine Übereinstimmung mit dem bei dem Patienten isolierten Stamm auf (RKI, 1999). Aus

Großbritannien liegen mehrere Berichte vor, die Pferde als mögliche Vektoren im Rahmen von *E. coli* O157-Erkrankungen beim Menschen identifizieren. In dem von TREVENA et al. (1996) geschilderten Fall erkrankte ein Junge drei Tage nach Besuch eines Kleinlandbesitzes, auf dem Ziegen, ein Pony, eine Färsen, ein Kalb sowie zwei Hunde gehalten wurden. Zu letzteren hatte das Kind intensiven Kontakt. Die von dem Patienten, dem Pony sowie den Hunden isolierten *E. coli* O157-Stämme erwiesen sich in der molekularbiologischen Feintypisierung als nicht unterscheidbar. Ein älterer Landwirt infizierte sich vermutlich beim Entfernen von Pferdefäzes auf seinem Betrieb mit *E. coli* O157; von Patient und Pferden konnte der gleiche Stamm isoliert werden. Nicht auszuschließen ist jedoch, daß die Infektionen von Landwirt und Pferden unabhängig voneinander auf eine gemeinsame, nicht identifizierte Infektionsquelle zurückzuführen waren. Auf dem Betrieb wurden außerdem 70 Mastriinder gehalten, zu denen der Patient aber keinen direkten Kontakt hatte; *E. coli* O157 konnten bei diesen Tieren nicht nachgewiesen werden (CHALMERS et al., 1997). Bei der Untersuchung von zwei Erkrankungsfällen bei Kindern nach Besuch eines Bauernhofes, welcher für die Öffentlichkeit zugänglich war, wurden eine ganze Reihe von Tieren als *E. coli* O157-Ausscheider identifiziert: Schweine, Schafe, Ziegen, eine Kuh sowie ein Pony; außerdem wurden solche Stämme auch im Kompost gefunden. Alle Isolate stellten sich in der Feintypisierung gleich dar (CHAPMAN et al., 2000). Ein ähnlicher Fall wurde von ENGLISH (2001) beschrieben, auch hier wurden im Rahmen einer Ausbruchsuntersuchung in einem Streichelzoo von Kühen, Schafen, Ziegen und Pferden *E. coli* O157 isoliert, die dem gleichen Phagentyp angehörten. WILLSHAW et al. (2003) berichteten von einem interessanten Fall, bei dem ebenfalls der Besuch eines für die Öffentlichkeit zugänglichen Bauernhofes mit zwei Erkrankungsfällen bei Kindern in Verbindung gebracht wurde; die beiden Episoden lagen allerdings 30 Monate auseinander. Die im Jahr 2001 gewonnenen Isolate von Patientin, Rindern und Pferden stellten sich in der PFGE-Analyse identisch dar; sie wiesen außerdem eine 92-95 %ige Ähnlichkeit zu den 1998 im Rahmen des ersten Infektionsgeschehens gewonnenen Isolaten von Patient und Rindern auf.

Bei den dargestellten VTEC-ausscheidenden Tieren handelte es sich zumeist um symptomlose Ausscheider. Für eine Beteiligung an Krankheitsgeschehen liegen noch keine eindeutigen Belege vor. HOLLAND et al. (1996) konnten bei drei der untersuchten 63 Diarrhöe-kranken Fohlen *eae*-negative VTEC isolieren, wohingegen bei der gesunden Vergleichsgruppe kein Nachweis gelang. Ob es sich dabei um Zufallsbefunde handelte, oder ob diese Stämme tatsächlich zur Pathogenese der Fohlen-Enteritis beitrugen, kann anhand der vorliegenden Daten nicht abgeleitet werden. STEINMANN und KENEL (1995) konnten bei 31 untersuchten Diarrhöe-kranken Pferden keine VTEC isolieren. Bei den beiden Diarrhöe-kranken Pferden, die im Zusammenhang mit der EHEC-Erkrankung eines Farmers untersucht wurden, konnte neben *E. coli* O157 auch *Salmonella* Typhimurium nachgewiesen werden; dieses Serovar wurde bereits vielfach im Zusammenhang mit Enteritiden beim Pferd beschrieben (BISPING, 1997).

**Tabelle 31:** Nachweis von Verotoxin-bildenden *E. coli* (VTEC) sowie *E. coli* O157 in Kotproben von Equiden (Reihenuntersuchungen)

Land	Tierkollektiv	Anzahl untersuchter Proben	Anzahl positiver Proben (%)		Charakterisierung der Isolate		Quelle
			<i>E. coli</i> O157	VTEC allgemein	Serogruppe/-typ	Virulenzprofil	
CH <sup>1)</sup>	Pferde mit Diarrhöe	31	0	0	---	---	STEINMANN und KENEL, 1995
	Pferde ohne Diarrhöe	30	0	0	---	---	"
D <sup>2)</sup>	Pferde	400	0	1 (0,3) <sup>3)</sup>	O113:H21	<i>vtx 2</i> <sup>4)</sup> , <i>hly</i> <sub>EHEC</sub> <sup>5)</sup>	SANDER, 2002
NL <sup>6)</sup>	Pferde, Ponies, Esel in Streichelzoos	334	3 (0,9)	n. u. <sup>7)</sup>	O157	k. A. <sup>8)</sup>	HEUVELINK et al., 2003
USA <sup>9)</sup>	Fohlen mit Diarrhöe	63	0	3 (4,8)	O1:H <sup>-</sup>	<i>vtx 1</i>	HOLLAND et al., 1996
	Fohlen ohne Diarrhöe	30	0	0	O156:H <sup>-</sup> X3:H <sup>-</sup>	<i>vtx 2</i> <i>vtx 1</i>	"
	Pferde auf Rinderfarmen	90	1 (1,1)	n. u.	O157	k. A.	HANCOCK et al., 1998
	Pferde auf Rinderfarmen	24	0	n. u.	---	---	GALLAND et al., 2001
	Pferde, Maultiere (Lastentiere)	81	0	n. u.	---	---	DERLET und CARLSON, 2002

<sup>1)</sup> Schweiz

<sup>2)</sup> Deutschland

<sup>3)</sup> 4 Proben (1,0 %) im Screening *vtx*-positiv

<sup>4)</sup> Verotoxin-Gen

<sup>5)</sup> EHEC-Hämolysin-Gen

<sup>6)</sup> Niederlande

<sup>7)</sup> keine Angaben

<sup>8)</sup> keine Angaben

<sup>9)</sup> Vereinigte Staaten von Amerika

**Tabelle 32:** Untersuchung von Pferdekotproben auf Verotoxin-bildende *E. coli* (VTEC) O157 im Zusammenhang mit humanen Erkrankungsfällen

Land	untersuchte Tiere	Anzahl positive / untersuchte Proben	Virulenzprofil der Isolate	Erkrankungsfall	Bemerkungen	Quelle
D <sup>1)</sup>	Minipferde (Sammelkot)	1 / k. A. <sup>2)</sup>	vtx 2 <sup>3)</sup> , eae <sup>4)</sup> , hly <sub>EHEC</sub> <sup>5)</sup>	1-jähriger Junge, inkomplettes HUS <sup>6)</sup>	SF <sup>7)</sup> O157:H <sup>-</sup>	RKI, 1999
	Pferd	0 / 2	---	k. A. <sup>8)</sup>	Untersuchung auf VTEC	LGL, 2004
GB <sup>9)</sup>	Pony	1 / 1	vtx 1, vtx 2	1-jähriger Junge, BD <sup>10)</sup>	Stamm auch von Hund isoliert	TREVENA et al., 1996
	Pferde mit Diarrhöe	1 / 2	vtx 2	84-jähriger Farmer, BD	Pferde: <i>Salmonella</i> Typhimurium DT 104 nachgewiesen	CHALMERS et al., 1997
	Pferde ohne Diarrhöe	0 / 3	---			
	Exmoor-Pony	1 / 1	vtx 2, eae	3-jähriger Junge, BD; 4-jähriges Mädchen, D <sup>11)</sup>	Besuchsbauernhof	CHAPMAN et al., 2000
	Pferde, Ponies, Fohlen	1 / 3	k. A.	k. A.	Besuchsbauernhof, VTEC O157 auch bei anderen Tierarten nachgewiesen	ENGLISH, 2001
	Pferde	0 / 3	---	10 Kinder, 2 Erwachsene	Zoo, Stamm von Kaninchen isoliert	PRITCHARD et al., 2003
	Pferde	2 / 5	vtx 1, vtx 2	4-jähriger Junge, BD; 1-jähriges Mädchen, BD	Farm, Stamm auch von Rindern isoliert	WILLSHAW et al., 2003

<sup>1)</sup> Deutschland

<sup>2)</sup> keine Angaben

<sup>3)</sup> Verotoxin-Gen

<sup>4)</sup> *E. coli* attaching and effacing-Gen

<sup>5)</sup> EHEC-Hämolysin-Gen

<sup>6)</sup> hämolytisch-urämisches Syndrom

<sup>7)</sup> Sorbit-fermentierend

<sup>8)</sup> keine Angaben

<sup>9)</sup> Großbritannien

<sup>10)</sup> blutige Diarrhöe

<sup>11)</sup> Diarrhöe

**Tabelle 33:** Untersuchung von Pferdekotproben auf Verotoxin-bildende *E. coli* (VTEC) sowie *E. coli* O157 (ohne Reihenuntersuchungen sowie Untersuchungen zur Aufklärung humaner Erkrankungsfälle)

Land	Tierkollektiv	Untersuchung auf		Anzahl positive / untersuchte Proben	Charakterisierung der Isolate		Quelle
		<i>E. coli</i> O157	VTEC allgemein		Serogruppe/-typ	Virulenzprofil	
D <sup>1)</sup>	Pferde	X	X	3 / 6	k. A. <sup>2)</sup>	k. A.	HARTUNG, 2000
	Pferde (Gehöfte)	X		0 / 2	---	---	HARTUNG, 2003
	Pferde (Einzeltiere)	X		2 / 5	O157; k. A.	k. A.	"
NL <sup>3)</sup>	Pferde	X		5 / 16 <sup>4)</sup>	O157	<i>vtx 1</i> <sup>5)</sup> , <i>vtx 2</i> , <i>eae</i> <sup>6)</sup> ; <i>vtx 2</i> , <i>eae</i>	HEUVELINK et al., 1998b
	Ponies	X		2 / 10 <sup>4)</sup>	O157	<i>vtx 1</i> , <i>vtx 2</i> , <i>eae</i> ; <i>vtx 2</i> , <i>eae</i>	"
	Pferde (Zoo)	X		1 / k. A.	O157:H7	k. A.	BAUWENS et al., 2000

<sup>1)</sup> Deutschland

<sup>2)</sup> keine Angaben

<sup>3)</sup> Niederlande

<sup>4)</sup> Wiederholungsuntersuchungen

<sup>5)</sup> Verotoxin-Gen

<sup>6)</sup> *E. coli* attaching and effacing-Gen

### 2.7.3 Schweine

*E. coli* O157:H7 werden vergleichsweise selten aus Schweinekotproben isoliert; Schweine werden nicht als Reservoir dieses Serovars, sondern eher als zufällige sporadische Ausscheider angesehen (JOHNSEN et al., 2001; siehe Tabelle 34). Mehrfach wurden von dieser Tierart atypische *E. coli* O157-Stämme isoliert, denen das Verotoxinbildungsvermögen fehlte (CHAPMAN et al., 1997; OSEK, 2004). BAUERFEIND et al. (2004) konnten in 225 porcinen *vtx* 2-positiven Isolaten nur Gene der Toxin-Variante *vtx* 2e identifizieren; andere Toxin-Varianten oder das *eae*-Gen waren nicht nachweisbar. 73,3 % der Stämme waren den Serogruppen O138, O139 und O141 zuzuordnen. Virulenzprofil und Serogruppenzugehörigkeit charakterisieren den Großteil dieser Stämme somit als „edema disease *E. coli*“ (EDEC), welche bei der Ödemkrankheit der Absatzferkel in Erscheinung treten (WEINSTEIN et al., 1988). Die Humanpathogenität solcher Stämme ist fraglich; nur vereinzelt liegen Berichte über *vtx* 2e-positive Isolate in Zusammenhang mit schweren Erkrankungsverläufen vor (THOMAS et al., 1994).

Tabelle 34: Nachweis von Verotoxin-bildenden *E. coli* (VTEC) sowie *E. coli* O157 in Kotproben von Schweinen

Land	Tierkollektiv	Anzahl unter- suchter Proben	Anzahl positiver Proben (%)		Quelle
			<i>E. coli</i> O157	VTEC allgemein	
D <sup>1)</sup>	Mastschweine	75	n. u. <sup>2)</sup>	5 (6,7)	BÜLTE et al., 1990
	Schweine	120	0	9 (7,5)	BEUTIN et al., 1993a
	Läuferschweine	125	k. A. <sup>3)</sup>	73 (58,4)	GALLIEN et al., 1994
	Ferkel (1.-6. Lebenswoche)	80	0	0	"
	Schweine	1.810	k. A.	215 (11,9) <sup>4)</sup>	BAUERFEIND et al., 2004
GB <sup>5)</sup>	Schweine	1.000	0 <sup>6)</sup>	n. u.	CHAPMAN et al., 1997
N <sup>7)</sup>	Schweine	1.976	2 (0,1)	n. u.	JOHNSEN et al., 2001
NL <sup>8)</sup>	Mastschweine	145	1 (0,7) <sup>9)</sup>	n. u.	HEUVELINK et al., 1999

<sup>1)</sup> Deutschland

<sup>2)</sup> nicht untersucht

<sup>3)</sup> keine Angaben

<sup>4)</sup> nur auf *vtx* 2-positive Isolate untersucht

<sup>5)</sup> Großbritannien

<sup>6)</sup> 4 *E. coli* O157 ohne Verotoxin-Gen nachweisbar (0,4 %)

<sup>7)</sup> Norwegen

<sup>8)</sup> Niederlande

<sup>9)</sup> 1 *E. coli* O157 ohne Verotoxin-Gen nachweisbar

#### 2.7.4 Kleine Haustiere

Bei **Hunden und Katzen** sind regelmäßig VTEC nachweisbar (s. Tabelle 35). Beide Spezies sind auch bereits als mögliche Vektoren in Zusammenhang mit EHEC-Erkrankungsfällen beim Menschen in Erscheinung getreten (TREVENA et al., 1996; LGL, 2004). Über eine mögliche Beteiligung von VTEC an der Pathogenese feliner Durchfallerkrankungen liegen widersprüchliche Ergebnisse vor (ABAAS et al., 1989; SMITH et al., 1998). Die Untersuchung von SANCAK et al. (2004) liefert Hinweise auf eine mögliche Beteiligung von *eae*- und *vtx 1*-positiven *E. coli*-Stämmen an der Pathogenese akuter und chronischer Diarrhöe-Erkrankungen bei Hunden. Ein möglicher Zusammenhang wird auch bei der „idiopathic cutaneous and renal glomerular vasculopathy of greyhounds“ (CRGV oder CRVG) gesehen. Diese Erkrankung, die zuerst Mitte der 80er Jahre in Alabama auftrat (CARPENTER et al., 1988) und aufgrund der Hautläsionen von Hundebesitzern und -trainern als „Alabama rot“ bezeichnet wird, weist klinische und pathophysiologische Gemeinsamkeiten mit dem HUS-Syndrom des Menschen auf (HERTZKE et al., 1995; FENWICK und COWAN, 1998). Offenbar besteht ein Zusammenhang zwischen der Verfütterung von nicht durcherhitztem Rinderhackfleisch und dem Auftreten von CRVG. Teilweise konnten VTEC-Stämme aus CRVG-erkrankten Greyhounds isoliert werden, ein eindeutiger Beweis für die Beteiligung von VTEC an der Pathogenese dieser Erkrankung steht allerdings noch aus. Bedeutung erhält diese Vasculopathie auch dadurch, daß sie als Tiermodell für die Erforschung von HUS verwendet werden kann (FENWICK und COWAN, 1998).

**Hauskaninchen** wurden ebenfalls als mögliche VTEC-Ausscheider identifiziert (GARCÍA und FOX, 2003). Außerdem liegen Hinweise vor, daß VTEC bei Kaninchen auch als Krankheitserreger eine Rolle spielen. GARCÍA et al. (2002) berichteten von einem Ausbruch, der klinisch durch Diarrhöe und plötzliche Todesfälle gekennzeichnet war. Bei einem der drei betroffenen Tiere konnte ein *vtx 1*- und *eae*-positiver *E. coli* O153:H<sup>-</sup>-Stamm isoliert werden; bei zwei Tieren ließen sich jedoch auch EPEC-Isolate gewinnen. Bemerkenswert waren die histopathologischen Befunde, die starke Ähnlichkeit zum HUS-Geschehen beim Menschen aufwiesen, so daß auch Kaninchen als Tiermodell zur Erforschung von systemischen EHEC-Erkrankungen dienen könnten.

**Tabelle 35:** Nachweis von Verotoxin-bildenden *E. coli* (VTEC) sowie *E. coli* O157 in Kotproben von Hunden, Katzen und Hauskaninchen

Land	Tierkollektiv	Anzahl unter-suchter Proben	Anzahl positiver Proben (%)		Quelle
			<i>E. coli</i> O157	VTEC allgemein	
CAN <sup>1)</sup>	Katzen	179	0	22 (12,3) <sup>2)</sup>	SMITH et al., 1998
D <sup>3)</sup>	Katzen	65	0	9 (13,8)	BEUTIN et al., 1993a
	Hunde	63	0	3 (4,8)	"
	Katzen	29	0	0	GALLIEN et al., 1994
	Hunde	25	0	1 (4,0)	"
GB <sup>4)</sup>	Hunde mit akuter Diarrhöe	57	0	14 (24,6)	SANCAK et al., 2004
	Hunde mit chronischer Diarrhöe	82	0	23 (28,1)	"
	Hunde ohne Diarrhöe	122	0	2 (1,6)	"
USA <sup>5)</sup>	Hunde	65	2 (3,1)	n. u. <sup>6)</sup>	HANCOCK et al., 1998
	Katzen	33	0	"	"
	Kaninchen	49	0	8 (16,3)	GARCÍA und FOX, 2003

<sup>1)</sup> Kanada

<sup>2)</sup> Angaben beruhend auf Verozelltest und Verotoxin-Gen-Nachweis

<sup>3)</sup> Deutschland

<sup>4)</sup> Großbritannien

<sup>5)</sup> Vereinigte Staaten von Amerika

<sup>6)</sup> nicht untersucht

### 2.7.5 Vögel inklusive Wirtschaftsgeflügel

In Geflügelbeständen werden nur selten VTEC nachgewiesen (s. Tabelle 36). PARREIRA und GYLES (2002) konnten bei der Untersuchung aviärer *E. coli*-Isolate bei 53,6 % *vtx*-Gensequenzen, v. a. *vtx* 1, jedoch weder das *eae*-Gen, noch das Entero-hämolyysin-Gen detektieren. Bei Tauben scheint die Verotoxin-Variante VT 2f weit verbreitet. In der Untersuchung von MORABITO et al. (2001) beherbergten alle Tauben-VTEC-Isolate dieses Toxin-Gen, oftmals in Kombination mit *eae*- und *cdt*-Genen; die Tiere waren klinisch unauffällig. Aus Finnland liegt ebenfalls ein Bericht über den Nachweis von *vtx* 2f bei Tauben vor (KOBAYASHI et al., 2002). GROSSMANN (2002) konnte zeigen, daß die Verotoxintyp-Verteilung bei Tauben rasse- bzw. haltungsabhängig ist: Während bei Stadttauben *vtx* 2f deutlich überwog, ist die Prävalenz von *vtx* 1 und *vtx* 2 bei Rasse- und Brieftauben wesentlich höher als bei Stadttauben.

**Tabelle 36:** Nachweis von Verotoxin-bildenden *E. coli* (VTEC) sowie *E. coli* O157 in Kotproben von Vögeln

Land	Tierkollektiv	Anzahl unter-suchter Proben	Anzahl positiver Proben (%)		Quelle
			<i>E. coli</i> O157	VTEC allgemein	
D <sup>1)</sup>	Hühner	144	0	0	BEUTIN et al., 1993a
	Tauben (Sammelkot)	366	n. u.	13 (3,6) <sup>2)</sup>	GROSSMANN, 2002
FIN <sup>3)</sup>	Möwen	86	0	0	KOBAYASHI et al., 2002
	Tauben	33	1 (3,0)	0	"
	Broiler	199	0	0	"
GB <sup>4)</sup>	Geflügel	1.000	0	0	CHAPMAN et al., 1997
I <sup>5)</sup>	Tauben	649	0	70 (10,8) <sup>6)</sup>	MORABITO et al., 2001
NL <sup>7)</sup>	Hühner	501	0	n. u.	HEUVELINK et al., 1999
	Puten	459	1 (0,2) <sup>8)</sup>	n. u.	HEUVELINK et al., 1999
S <sup>9)</sup>	Gänse	105	0	n. u.	WAHLSTRÖM et al., 2003
	Möwen	111	0	n. u.	"
USA <sup>10)</sup>	Vögel (Sammelproben)	200	1 (0,5)	n. u.	HANCOCK et al., 1998

<sup>1)</sup> Deutschland

<sup>4)</sup> Großbritannien

<sup>7)</sup> Niederlande

<sup>9)</sup> Schweden

<sup>2)</sup> Verotoxin-Gene in 245 (66,9 %) Proben nachgewiesen

<sup>5)</sup> Italien

<sup>8)</sup> zusätzlich 5 Verotoxin-Gen-negative *E. coli* O157-Stämme isoliert

<sup>10)</sup> Vereinigte Staaten von Amerika

<sup>3)</sup> Finnland

<sup>6)</sup> Angaben beruhen auf Screening-Ergebnissen

## 2.7.6 Wild- und Zoosäugetiere

Auch bei Wildtieren liegen Berichte über den Nachweis von VTEC O157 und VTEC non-O157 vor (s. Tabelle 37). Bei der Untersuchung eines EHEC O157-Ausbruchs unter Besuchern eines Streichelzoos machten PRITCHARD et al. (2003) eine interessante Entdeckung: Der Ausbruchsstamm war bei keinem der Zoo-Tiere nachweisbar, die Kontakt zu den Besuchern hatten, wohl aber in 20 von 30 untersuchten Sammelkotproben von Wildkaninchen sowie in zwei Gras-Proben der Kinderspielplatz- und Picknick-Areale. Außerdem fand sich dieser Stamm auch in Fäzesproben einer Mutterkuhherde, die auf einer angrenzenden Fläche weidete, zu der die Besucher jedoch keinen direkten Kontakt hatten. Die Autoren vermuteten, daß sich die Wildkaninchen bei den angrenzend gehaltenen Rindern infizierten. Sie konnten weiterhin zeigen, daß *E. coli* O157-Stämme in Kaninchen-Fäzes neun Monate persistieren können.

Tabelle 37: Nachweis von Verotoxin-bildenden *E. coli* (VTEC) sowie *E. coli* O157 in Kotproben von Wildsäugetieren

Land	Tierkollektiv	Anzahl unter-suchter Proben	Anzahl positiver Proben (%)		Quelle
			<i>E. coli</i> O157	VTEC allgemein	
D <sup>1)</sup>	Damwild	100	0	10 (10,0)	BÜLTE und WROCKLAGE, 1992
S <sup>2)</sup>	Elche	84	0	n. u. <sup>3)</sup>	WAHLSTRÖM et al., 2003
	Rehe	195	0	"	"
	Wildschweine	68	1 (1,5)	"	"
	Dam- und Rothirsche	90	0	"	"
	Hasen	125	0	"	"
USA <sup>4)</sup>	Nagetiere	300	0	"	HANCOCK et al., 1998
	Wildtiere	34	0	"	"
	Hirsche	919	3 (0,3)	"	FISCHER et al., 2001

<sup>1)</sup> Deutschland

<sup>2)</sup> Schweden

<sup>3)</sup> nicht untersucht

<sup>4)</sup> Vereinigte Staaten von Amerika

Vereinzelt liegen auch Berichte über den Nachweis von VTEC-Stämmen bei Zootieren vor. So gelang BAUWENS et al. (2000) der Nachweis von VTEC O157:H7-Stämmen bei zwei Primaten. Bei drei weiteren Affen konnten *E. coli* O157-Stämme nachgewiesen werden, die jedoch aufgrund ihres Virulenzprofils als EPEC eingestuft wurden.

## **2.8 Nachweismethoden für VTEC**

Da die ersten bekanntgewordenen EHEC-Ausbrüche auf den Serotyp O157:H7 zurückzuführen waren (RILEY et al., 1983; CARTER et al., 1987; MORGAN et al., 1988), konzentrierten sich die Arbeiten zur Etablierung geeigneter Nachweisverfahren zunächst auf dieses Serovar. Schnell wurden biochemische Besonderheiten bei diesen Stämmen entdeckt, aufgrund derer sie mittels einfacher kultureller Verfahren von anderen *E. coli* differenziert werden konnten (WELLS et al., 1983). Mittlerweile ist das Verotoxinbildungsvermögen bei mehr als 250 verschiedenen Serovaren beschrieben worden (BETTELHEIM, 2004), so daß die Fokussierung auf bestimmte Serogruppen nicht den realen Anforderungen an die Diagnostik entspricht. Daß trotzdem eine Vielzahl der in Anwendung oder sogar in Neuentwicklung befindlichen Nachweismethoden sich auf die Serogruppe O157 beschränkt, hat mehrere Ursachen. Oftmals wird auf die unterschiedliche regionale Bedeutung der einzelnen Serogruppen verwiesen, insbesondere auf die Dominanz von *E. coli* O157-Stämmen in Nordamerika (WHO, 1998). Dem ist entgegenzuhalten, daß die Bedeutung von non-O157-VTEC nur dann realistisch abgeschätzt werden kann, wenn diese auch in die Diagnostik einbezogen werden. BETTELHEIM und BEUTIN (2003) formulierten dies wie folgt: „Methods [...] which only rely on the detection of VTEC O157 and not on other VTEC, perpetuate the false myth of the uniqueness of this serotype.“ Mittlerweile mehren sich die Stimmen, welche die Einbeziehung der non-O157-VTEC sowohl in die klinische Diagnostik, als auch in die Lebensmitteluntersuchung fordern (WHO, 1998; ACHESON, 2000; EKLUND et al., 2001; BETTELHEIM und BEUTIN, 2003; SCVPH, 2003). Die zögerliche Anwendung solcher Nachweismethoden liegt jedoch auch in der Tatsache begründet, daß keine biochemische Gemeinsamkeit zwischen allen VTEC-Stämmen existiert, die sie von anderen *E. coli*-Stämmen abgrenzt und somit einen einfachen kulturellen Nachweis mittels Selektivmedien erlauben würde. Einzige Gemeinsamkeit aller VTEC ist die Fähigkeit zur Bildung von Verotoxinen; Zielstruktur der Diagnostik ist also das Toxin selbst oder das dafür codierende Gen (FRUTH et al., 2002; BETTELHEIM und BEUTIN, 2003).

Die publizierten Nachweismethoden unterscheiden sich nicht nur im Hinblick auf die zu erfassenden Zielorganismen, sondern auch in ihrer Anwendbarkeit für die einzelnen Substrate wie Stuhl- und Kotproben oder verschiedene Lebensmittel. Weiterhin ist eine Unterteilung in phänotypische und genotypische Verfahren möglich, wobei oftmals eine Kombination verschiedener Verfahren in Form einer Methodenkaskade zur Anwendung kommt, um optimale Ergebnisse zu erhalten. Im Folgenden sollen schwerpunktmäßig Nachweismethoden für den Lebensmittelbereich dargestellt werden.

### **2.8.1 Phänotypische Nachweismethoden**

#### **2.8.1.1 Zelltests**

Der VTEC-Nachweis mittels Zellkulturtest geht auf die vielzitierte Arbeit von KONOWALCHUK et al. (1977) zurück, welche gleichzeitig namensgebend für dieses neuartige *E. coli*-Zytotoxin war. Verozellen werden mit Kulturüberständen überschichtet und anschließend auf die Ausbildung der charakteristischen zytopathischen

Effekte untersucht. Dafür kann eine Inkubationszeit von bis zu vier Tagen erforderlich sein. Die Spezifität des Testes sollte durch Neutralisationstests mit entsprechenden VT 1- bzw. VT 2-Antikörpern erhöht werden (CERMELLI et al., 2002). Für die Anwendung in der Routinediagnostik wird der Zytotoxizitätstest vielfach als zu arbeits- und zeitaufwendig empfunden. Aufgrund seiner Sensitivität und der Möglichkeit, auch bislang unbekannte Toxinvarianten zu detektieren, wird er jedoch als „gold standard“ der VTEC-Diagnostik angesehen (PATON und PATON, 1998; BETTELHEIM und BEUTIN, 2003).

### 2.8.1.2 Kultivierung

#### Flüssige Nährmedien

Vor dem Hintergrund der sehr geringen *dosis infectiosa minima* bei EHEC-Erkrankungen erfordert die oftmals nur geringgradige VTEC-Kontamination von Lebensmitteln die Anwendung von Nachweisverfahren mit niedriger Nachweisgrenze, wie dies meist nur durch Vorschaltung einer selektiven Anreicherung erreicht werden kann. Eine Auflistung verschiedener Nährmedien, die zur selektiven Anreicherung von VTEC, insbesondere von *E. coli* O157, in der Literatur beschrieben wurden, findet sich in Tabelle 38.

Tabelle 38: Anreicherungsmedien zum Nachweis von Verotoxin-bildenden *E. coli* (VTEC) bzw. *E. coli* O157

Nährmedium	Akronym	Quelle
Brillantgrün-Galle-Lactose-Bouillon	BRILA	MACKENZIE et al., 1948
gram negative broth nach HAJNA	GN	HAJNA et al., 1955
modifizierte Trypton-Soja-Bouillon mit Novobiocin	mTSB+N	DOYLE und SCHOENI, 1987
modifizierte <i>Escherichia coli</i> -Bouillon mit Novobiocin	mEC+N	OKREND et al., 1990
doppelt modifizierte Trypton-Soja-Bouillon mit Casamino Acids und Acriflavin	dmTSB-CA	PADHYE und DOYLE, 1991
EHEC <sup>1)</sup> enrichment broth	EEB	WEAGANT et al., 1995

<sup>1)</sup> enterohämorrhagische *Escherichia coli*

Um das Wachstum der grampositiven Begleitflora zu unterdrücken, werden oftmals Gallensalze oder Antibiotika-Zusätze verwendet (PADHYE und DOYLE, 1991; WEAGANT et al., 1995; GRANT, 2004). Selektive Agentien können jedoch auch das Wachstum der Zielorganismen hemmen, wie beispielsweise für gepuffertes Peptonwasser mit Vancomycin-, Cefixim- und Cefsulodin-Zusatz (BPW-VCC) demonstriert werden konnte. OGDEN et al. (2001) erzielten bei der Untersuchung verschiedener Lebensmittel auf *E. coli* O157 bessere Ergebnisse durch Reduktion der selektiven antimikrobiellen Zusätze (BPW-V pH 7,0; BPW-V+¼C+C); diese beiden Anreicherungen zeigten sich der weit verbreiteten mTSB+N überlegen. Ähnlich stellt sich die Situation

für *E. coli* der Serogruppen O26 und O111 dar, auch hier waren durch Anreicherung in BPW-V bessere Ergebnisse zu erzielen als mit mTSB+N (DRYSDALE et al., 2004). Auch für andere Serotypen konnten MÜLLER und BÜLTE (1997) belegen, daß die Antibiotika-haltigen Anreicherungsmedien mTSB+N, mEC+N und EEB das Wachstum der untersuchten VTEC-Reinkulturen, inklusive des Serotyps O157:H7, verzögern oder sogar vollständig hemmen; lediglich BRILA und GN erwiesen sich in dieser Untersuchung als uneingeschränkt geeignet. Die praktische Einsatzfähigkeit eines Nährmediums muß allerdings immer Substrat-bezogen überprüft werden. In der Untersuchung von TIMM et al. (1998) hat sich mTSB für den Nachweis von VTEC in Lebensmitteln und Fäzes bewährt. Nach Untersuchungen von HECKÖTTER (1999) ist für den Nachweis von *E. coli* O157:H7 aus Rinderhackfleisch die BRILA-Bouillon besonders zu empfehlen.

Zur Verbesserung der Spezifität erwiesen sich erhöhte Inkubationstemperaturen im Bereich von 41-42 °C als vorteilhaft (BOLTON et al., 1996; BLAIS et al., 1997; OGDEN et al., 2001; DRYSDALE et al., 2004). Zu beachten ist aber, daß *E. coli* O157:H7-Stämme, deren Temperaturoptimum wie bei vielen pathogenen Mikroorganismen bei 37 °C liegt, im Bereich ab 44 °C im Gegensatz zu den meisten anderen Serovaren nur noch eingeschränkt wachsen (DOYLE und SCHOENI, 1984). Weiterhin kann die vergleichsweise hohe Säureresistenz von *E. coli* O157:H7 ausgenutzt werden, um die Begleitflora zu unterdrücken; nach Untersuchungen von GRANT (2004) hat es sich bewährt, Proben für zwei Stunden einem pH-Wert von 2,0 auszusetzen, bevor sie in ein Antibiotika-freies Anreicherungsmedium verbracht werden. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, daß die Schüttelinkubation der statischen Inkubation überlegen ist (BENNETT et al., 1995; BOLTON et al., 1996; BLAIS et al., 1997; TIMM et al., 1998).

Problematisch erscheint die Rekultivierung von gefrier-geschädigten *E. coli* O157-Zellen. Während HECKÖTTER (1999) keine Unterschiede in der Untersuchung von frischem und tiefgefrorenem Rinderhackfleisch mittels mTSB und BRILA feststellen konnte, belegten NAKAGAWA et al. (2000) die Notwendigkeit, zur Isolierung gefrier-geschädigter Zellen die Proben vor Verbringung in mEC+N-Bouillon drei Stunden bei Raumtemperatur zu belassen; bei stark sauren Produkten war sogar eine ebenso lange Resuszitiation in einer nicht-selektiven Nährbouillon erforderlich.

Wird eine Methodik angewandt, welche auf dem phänotypischen Nachweis von Verotoxin beruht, so ist eine Steigerung der Toxinexpression zur Erhöhung der Sensitivität unerlässlich, da unter den VTEC-Stämmen „low-“, „moderate-“ und „high-level-producers“ existieren (MARQUES et al., 1986). Seit langem bekannt und in Anwendung ist die Phageninduktion über das Zellgift Mitomycin C (HULL et al., 1993; TIMM et al., 1996; DOLL et al., 2001). In den Untersuchungen von TIMM et al. (1998) konnte durch kombinierte Anwendung von Schüttelinkubation und Mitomycin C-Zusatz die Toxinexpression um den Faktor 10-100 gesteigert werden. Aufgrund der Toxizität von Mitomycin C wurde aus Gründen des Arbeitsschutzes nach alternativen „enhancer“-Substanzen gesucht. Eine geeignete Alternative wurde in Carbadox gefunden; hingegen kann der Einsatz von Norepinephrin nicht empfohlen werden (KÖHLER et al., 2000; STAHL und BÜLTE, 2000a). Für Trimethoprim liegen unterschiedliche Ergebnisse vor (KARCH et al., 1986; STAHL und BÜLTE, 2000a).

### Feste Nährmedien

Bereits kurz nach Aufklärung der ersten bekanntgewordenen EHEC O157:H7-Ausbrüche fiel bei diesem Serovar eine biochemische Besonderheit auf, die es vom Großteil der *E. coli*-Stämme unterschied und somit als Screeningreaktion empfohlen wurde: Im Gegensatz zu 6-25 % der *E. coli* (FARMER et al., 1985; RATNAM et al., 1988) fermentierten die untersuchten O157:H7-Stämme kein Sorbitol (WELLS et al., 1983), was später bei einer größeren Anzahl von Stämmen bestätigt werden konnte (RATNAM et al., 1988). Diese Eigenschaft trifft auch auf ca. 50 % der O157:H<sup>-</sup>-Stämme zu (ALEKSIC et al., 1992). Zur Untersuchung von Stuhlkulturen wurde deswegen der altbekannte **MacConkey-Agar** modifiziert, indem Laktose durch Sorbit ersetzt wurde, woraus ein Differentialmedium für *E. coli* O157:H7 resultierte (SMAC, MARCH und RATNAM, 1986). Problematisch erscheint der hohe Anteil falsch-positiver Isolate, insbesondere bei der Untersuchung von Lebensmitteln (MANAFI und KREMSMAIER, 2001). Eine deutliche Unterdrückung der Begleitflora kann durch den Zusatz von Cefixim und Tellurit erreicht werden (CT-SMAC, ZADIK et al., 1993); in Einmischversuchen mit Rinderhackfleisch konnte HECKÖTTER (1999) beispielsweise in ca. 30 % der Fälle Reinkulturen des inokulierten Stammes erhalten. Jedoch existieren auch unter den *E. coli* O157-Stämmen Tellurit-sensitive Varianten, die auf CT-SMAC nicht wachsen; hier sind insbesondere die Sorbit-fermentierenden *E. coli* O157:H<sup>-</sup>-Stämme zu nennen (KARCH und BIELASZEWSKA, 2001). CT-SMAC gilt mittlerweile als das gebräuchlichste Isolationsmedium für *E. coli* O157:H7, sollte jedoch zur Kompensation der genannten Nachteile mit einem zweiten Selektivmedium kombiniert werden (HECKÖTTER, 1999; DE BOER und HEUVELINK, 2000).

Weniger selektiv ist der **Hemorrhagic Colitis-Agar** nach SZABO (1986), welcher neben der Sorbit-Verwertung noch eine zweite Schlüsselreaktion verwendet: die fehlende  $\beta$ -D-Glucuronidase-Aktivität bei O157:H7-Stämmen (RATNAM et al., 1988), die bei *E. coli* zu 94-96 % vorhanden ist (FENG und HARTMANN, 1982; KILIAN und BÜLOW, 1979; BÜLTE und REUTER, 1989) und über das fluorogene Substrat 4-Methylumbelliferyl- $\beta$ -D-Glucuronid (MUG) nachgewiesen wird. Eine eventuell überwiegende Begleitflora kann allerdings die Auswertung erschweren, da bei dichtem Koloniewachstum die unterschiedlichen Phänotypen nicht mehr charakteristisch ausgebildet werden und fluoreszierende Stämme die Nachbarkolonien überstrahlen (BEUTIN et al., 1994; HECKÖTTER, 1999). Die Bewertung eines Nährmediums muß jedoch immer kontextbezogen erfolgen, da abgesehen von den bereits erwähnten Matrix-spezifischen Einflüssen auch Wechselwirkungen zwischen Anreicherungsmedium, Anreicherungsdauer, Kontaminationsgrad und dem jeweiligen Selektivmedium bestehen. So konnte HECKÖTTER (1999) in Inokulationsversuchen mit Rinderhackfleisch beispielsweise belegen, daß bei niedrigen Einmischkonzentrationen der HC-Agar dem CT-SMAC-Agar überlegen war. Auch bei 6-stündiger Anreicherung erwies sich der HC-Agar als geeigneter, wohingegen nach 24-stündiger Anreicherung die Auswertbarkeit durch überwiegende Begleitflora stark eingeschränkt war.

Eine Weiterentwicklung stellen **chromogene Nährmedien** dar, die neben Sorbit als Marker auch chromogene Substrate für  $\beta$ -D-Glucuronidase und/oder  $\beta$ -D-Galactosidase anbieten: hier sind beispielsweise Rainbow<sup>®</sup>-Agar O157 (Biolog, Hayward, Kalifornien, USA), BCM<sup>®</sup> O157:H7-Agar (Biosynth AG, Staad, Schweiz) oder CHROMagar<sup>™</sup> O157 (CHROMagar, Paris, Frankreich) zu nennen (REISSBRODT et

al., 1988; OGDEN et al., 2001). Dem Vorteil der besseren Differenzierbarkeit steht jedoch der Nachteil des höheren Preises entgegen. In der Untersuchung von OGDEN et al. (2001), in die verschiedene Lebensmittelmatrizes einbezogen wurden, zeigte sich der Rainbow<sup>®</sup>-Agar O157 dem CT-SMAC-Agar und dem CHROMagar<sup>®</sup> O157 überlegen; die letzten beiden erzielten gleichwertige Ergebnisse. Zu anderen Ergebnissen kamen SCOTTER et al. (2000); sie bescheinigten bei der Untersuchung von Rinderhackfleisch und Milch dem CT-SMAC-Agar eine bessere Wiederfindungsrate im Vergleich zum Rainbow<sup>®</sup>-Agar O157. Bei der Untersuchung von Rohmilchkäse erwies sich der CT-SMAC-Agar gegenüber dem CHROMagar<sup>®</sup> O157 als selektiver (VOITOUX et al., 2002).

Alle o. g. Nährmedien eignen sich lediglich zur Erfassung von *E. coli* O157-Stämmen. Zur vielfach geforderten Serovar-unabhängigen Untersuchung empfehlen BEUTIN et al. (1988; 1989) den **Enterohämolyisin-Agar**, um VTEC über das in ihren Studien zu 89 % assoziierte Merkmal der Enterohämolyisin-Bildung zu erfassen (s. Kapitel 2.4.3.1). Während in vielen Studien bei EHEC-Isolaten aus schwerwiegenden Krankheitsverläufen tatsächlich zu > 90 % das *hly*<sub>EHEC</sub>-Gen nachgewiesen werden konnte (s. Tabelle 19) ist eine derartige Assoziation im Lebensmittelbereich, je nach Untersuchung, oftmals nur bei einem Drittel bis der Hälfte der Isolate gegeben (s. Tabelle 25). Der Prozentsatz der mittels Enterohämolyisin-Agar erfaßbaren VTEC-Stämme reduziert sich weiterhin aufgrund des Auftretens von Isolaten mit sogenannten „stillen“ *hly*<sub>EHEC</sub>-Genen, welche keinen enterohämolytischen Phänotyp ausprägen und sich somit der Detektion mittels Blutagar entziehen (SCHMIDT und KARCH, 1996; BOCKEMÜHL et al., 1997). Zur Steigerung der Selektivität sind verschiedene Antibiotika-Supplementierungen beschrieben worden. Nach PEITZ et al. (2000) kann die Begleitflora durch Zusatz von 8 mg/l Vancomycin reduziert werden; bei höheren Konzentrationen wurde Pseudohämolyse beobachtet. LEHMACHER et al. (1998) empfehlen für Lebensmittel- und Stuhluntersuchungen die Anwendung eines Vancomycin-, Cefixim- und Cefsulodin-supplementierten Blutagars (BVCC). Schlußendlich bleibt jedoch das Problem bestehen, daß kein Nährmedium existiert, welches die Identifizierung aller VTEC-Stämme ermöglichen würde (BETTELHEIM und BEUTIN, 2003).

### 2.8.1.3 Immunologische Verfahren

#### Immunomagnetische Separation (IMS)

Grundprinzip der IMS ist die Bindung von (Bakterien-) Zellen mittels spezifischer Antikörper an magnetische Partikel, wonach sie durch Anlegen eines magnetischen Feldes aus einer heterogenen Suspension isoliert werden können. Die IMS ist somit nicht als Detektionssystem, sondern vielmehr als selektiver Anreicherungsschritt zu verstehen. Anwendung findet dieses Verfahren in Zytologie und Mikrobiologie. Verschiedene immunomagnetische Partikel sind kommerziell erhältlich. Um Autoagglutination zu vermeiden, empfiehlt sich die Verwendung von superparamagnetischen Polymer-Partikeln standardisierter Größe; diese zeigen nur durch Anlegen eines magnetischen Feldes magnetische Eigenschaften (CUDJOE et al., 1993).

In der VTEC-Diagnostik wird die IMS v. a. zum Nachweis von *E. coli* O157 eingesetzt; prinzipiell sind jedoch durch Wahl entsprechender Antikörper auch andere

Anwendungsgebiete möglich. So finden sich in der Literatur beispielsweise Berichte über den Einsatz der IMS zum Nachweis von *E. coli* der Serogruppen O26, O103 oder O111 (URDAHL et al., 2002a; DRYSDALE et al., 2004). In zahlreichen Untersuchungen hat sich die IMS als schnelles, routinetaugliches Verfahren zur Isolation von *E. coli* O157 aus Lebensmitteln, insbesondere Rinderhackfleisch, sowie Stuhl- und Kotproben erwiesen (FRATAMICO et al., 1992; WRIGHT et al., 1994; KARCH et al., 1996; HEUVELINK et al., 1998a; HECKÖTTER, 1999; VOITOUX et al., 2002; BOPP et al., 2003); für das Lebensmittel Milch liegen widersprüchliche Ergebnisse vor (SCOTTER et al., 2000; VOITOUX et al., 2002). Die Selektivität des *E. coli* O157-Nachweises in Rinderhackfleisch konnte in Untersuchungen von WRIGHT et al. (1994) um den Faktor 100 gesteigert werden. Die durch dieses Verfahren erreichbaren Nachweisgrenzen sind immer im Kontext zur verwendeten Anreicherungs- und Isolierungsmethodik zu bewerten; in der Literatur finden sich Angaben von 2 KbE/g für Rinderhackfleisch (WRIGHT et al., 1994), 1 KbE/g für Fleischprodukte, 1 KbE/10 ml für Milch (REINDERS et al., 2002) oder 1-2 KbE/25 g für Milchprodukte (VOITOUX et al., 2002). Als weiterer Vorteil ist die Entfernung von möglicherweise in der Probe vorhandenen inhibitorischen Stoffen zu sehen, welche den weiteren Nachweis stören könnten (CUDJOE et al., 1993).

Im Anschluß an die IMS erfolgt meist die Subkultivierung der an die Magnet-Partikel gebundenen Bakterienzellen auf Selektivmedien. Denkbar sind jedoch auch Kombinationen mit anderen Verfahren, etwa einem ELISA (URDAHL et al., 2002a), wodurch TSAI et al. (2000) eine Nachweisgrenze von 0,1 KbE/g Rinderhackfleisch erreichen konnten.

### **Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)/Enzymimmunoassay (EIA)**

Der immunologische Nachweis von Verotoxin mittels EIA bzw. ELISA eignet sich als Screening-Verfahren zur Serovar-unabhängigen Erfassung von VTEC. Da diese EIAs kommerziell erhältlich und einfach in der Durchführung sind, haben sie nicht nur in Deutschland in der Routinediagnostik von Stuhl- und Lebensmittelproben weite Verbreitung gefunden (HESS et al., 1999; BETTELHEIM und BEUTIN, 2003). Die meisten kommerziell erhältlichen EIAs unterscheiden nicht zwischen VT 1 und VT 2. Problematisch erscheint die Anwendbarkeit für Toxin-Varianten; hier besteht noch Forschungsbedarf (BETTELHEIM und BEUTIN, 2003). Auf die Notwendigkeit der Verwendung von „enhancer“-Substanzen zur Steigerung der Toxinexpression wurde bereits hingewiesen.

Bereits seit längerem auf dem Markt ist der „Premier EHEC“ (Meridian Bioscience, Inc., Cincinnati, Ohio, USA), welcher sich bei der Untersuchung von Stuhl- (KEHL et al., 1997; MACKENZIE et al., 1998), Kot- (TIMM et al., 1998) und Lebensmittelproben bewährt hat (ACHESON et al., 1996; TIMM et al., 1998). Reinkulturen von *vtx 2c*-, *vtx 2e*- und *vtx 1c*-Stämmen werden erfaßt, wohingegen die Detektion *vtx 2f*-tragender Stämme Schwierigkeiten bereitet (SCHMIDT et al., 2000; BÜRK et al., 2003). ACHESON et al. (1996) konnten eine Nachweisgrenze von ca. 1 KbE/g für Rinderhackfleisch bzw. 1 KbE/ml für Milch erreichen. TIMM et al. (1998) geben für die vorgestellte Methodenkaskade eine Nachweisgrenze von ca. 10 KbE/25 ml oder 25 g an. Für Lebensmittel pflanzlichen Ursprungs war eine Modifikation des Anreicherungs-procedures erforderlich; die Nachweisgrenze für Apfelsaft und Salat lag nach ein-

stufiger Anreicherung in mTSB mit Mitomycin C-Zusatz bei 50 KbE/25 ml bzw. 25 g. Für Sprossen ist diese Methodenkaskade in der vorgestellten Form jedoch nicht anwendbar, da aufgrund des hohen Anteils an Hefen und Schimmelpilzen in der Begleitflora die erreichbare Nachweisgrenze von  $10^4$ - $10^5$  KbE/25 g als nicht ausreichend anzusehen ist (GALLIEN et al., 2004). Zu ähnlichen Ergebnissen kommen auch DOLL et al. (2001) bei der Evaluierung des RIDASCREEN® Verotoxin (R-Biopharm AG, Darmstadt). Während für Lebensmittel allgemein eine Nachweisgrenze von  $< 10$  KbE/25 g dargestellt werden konnte, lag dieser Wert für Sprossen bei 10-100 KbE/25 g.

Neben dem Screening auf Verotoxine findet das EIA-Format beispielsweise auch bei der Untersuchung auf *E. coli* O157 Anwendung. MACKENZIE et al. (1998) bescheinigten dem „Premier *E. coli* O157“ (Meridian Bioscience, Inc., Cincinnati, Ohio, USA) für die Stuhlproben-Diagnostik eine Sensitivität von 86 % und eine Spezifität von 98 %. Zur Bewältigung großer Probenzahlen stehen automatisierte ELISA-Systeme zur Verfügung, wie das EiaFoss-System (Foss Electric, Hillerod, Dänemark) zur Untersuchung auf *E. coli* O157. Nach der Studie von SCHALCH und STOLLE (2000) mit artifiziell kontaminierten Hackfleischproben lag die Sensitivität des Verfahrens niedriger als bei der kulturellen IMS-Referenzmethode. Voraussetzung für den Erhalt zuverlässiger Ergebnisse mit dem EiaFoss-System war das Vorliegen ausreichender *E. coli* O157-Keimzahlen in der Anreicherung von mindestens  $10^5$  KbE/ml.

GE et al. (2002) stellten ein kombiniertes PCR-ELISA-Verfahren vor, bei dem der ELISA die konventionelle Gelelektrophorese ersetzt. Das Verfahren beruht auf dem Einbau von Digoxigenin-markierten dUTP und Biotin-markierten Primern, welche Verotoxin-Gene detektieren. Die so markierten PCR-Produkte wurden mittels ELISA-Technik in Streptavidin-beschichteten Mikrotiter-Platten nachgewiesen. Im Vergleich zur konventionellen Gelelektrophorese konnten die Autoren die Sensitivität des Verfahrens um den Faktor 100 steigern.

### **Immunoblot**

Während der EIA/ELISA als Screening-Methode anzusehen ist, dessen Ergebnis einer Bestätigung bedarf, dient der Immunoblot der gezielten, Serovar-unabhängigen Isolierung von VTEC-Stämmen. Die Erreger-Isolierung dient nicht nur der Absicherung des Screening-Ergebnisses, sondern ermöglicht auch die weitergehende Charakterisierung des Isolats, welche zur lebensmittelrechtlichen Beurteilung und/oder epidemiologischen Aufklärung notwendig ist. TIMM et al. (1996) stellten eine Weiterentwicklung des von HULL et al. (1993) beschriebenen Immunoblot-Verfahrens vor, das sowohl für die Untersuchung von Lebensmittel-, als auch Fäzes-Proben geeignet ist. Dazu wird das Untersuchungsmaterial (Kotsuspension oder Lebensmittel-Anreicherungskultur) auf ein Nährmedium mit Mitomycin C-Zusatz (25 µg/l) aufgetragen, welches zuvor mit zwei Membranen abgedeckt wurde. Während der 18-stündigen Inkubation wachsen auf der oberen Membran Kolonien. Befinden sich darunter auch VTEC-Stämme, setzen diese durch den Einfluß des Mitomycin C verstärkt Verotoxin frei, welches in die unten liegende Membran diffundiert. Diese wird herausgenommen und mit monoklonalen VT 1- und VT 2-Antikörpern inkubiert. Die gebundenen Antikörper werden über eine Farbreaktion sichtbar gemacht. Durch Vergleich der Lokalisation können die VT-Farbpunkte der unteren Membran den

entsprechenden VTEC-Kolonien der oberen Membran zugeordnet werden. Auf diese Weise können VTEC auch aus einer um den Faktor 1.000 überwiegenden Begleitflora gezielt isoliert werden. Mittlerweile ist der Immunoblot auch in kommerzieller Form erhältlich (SIFN GmbH, Berlin).

### **Immunchromatographische Lateral flow-Tests**

Eine weitere Möglichkeit der Serovar-unabhängigen Erfassung von VTEC in Lebensmitteln ist mit dem Duopath<sup>®</sup> Verotoxins-Test (Merck KGaA, Darmstadt) gegeben. Dabei handelt es sich um einen immunochromatographischen Schnelltest, der VT 1 und VT 2 über Gold-markierte Antikörper nachweist (gold labelled immunosorbent assay, GLISA). Nach Auftrag der Proben auf eine Membran binden die darin ggf. vorhandenen Verotoxine beim Durchlaufen der Reaktionszone an immobilisierte VT 1- und VT 2-Antikörper, was in der Bildung von mit bloßem Auge sichtbaren Banden resultiert. Dabei ist eine differenzierte Erfassung von VT 1 und VT 2 möglich. Die Anwendbarkeit des Duopath<sup>®</sup> Verotoxins wurde sowohl für Lebensmittel tierischen und pflanzlichen Ursprungs, als auch für klinische Stuhlproben bestätigt (PARK et al., 2003; BÜLTE et al., 2004). Problematisch erscheint die Detektion der Verotoxin-Varianten VT 2e und VT 2f; diese spielen jedoch im Rahmen des EHEC-Geschehens beim Menschen nur eine untergeordnete Rolle (BÜLTE et al., 2003). Der Duopath<sup>®</sup> Verotoxins-Test kann sowohl als Screening-Verfahren zur Untersuchung von Anreicherungskulturen, als auch als Bestätigungstest zur Untersuchung von Isolaten in Reinkultur verwendet werden.

Lateral flow-Tests wurden auch zur Detektion von *E. coli* O157-Stämmen entwickelt. Der Singlepath<sup>®</sup> *E. coli* O157 (Merck KGaA, Darmstadt) wurde mittels artifiziell und natürlich kontaminierter Rinderhackfleisch- und Rohmilchproben evaluiert. Im Vergleich zur IMS-Referenzmethode zeigte Singlepath<sup>®</sup> *E. coli* O157 eine Sensitivität von 100 % und eine Spezifität von 97,4 %. Die entsprechenden Ergebnisse für den ebenfalls in die Studie miteinbezogenen Reveal<sup>®</sup> *E. coli* O157:H7 (Neogen, Lansing, USA) lagen 3 %-Punkte bzw. 12 %-Punkte darunter (BÜLTE et al., 2003).

## **2.8.2 Genotypische Nachweismethoden**

### **2.8.2.1 Koloniehybridisierung**

Ähnlich wie beim Immunoblot werden bei der Koloniehybridisierung die gesuchten Kolonien über ein Membranverfahren detektiert, wobei anstelle von Antikörpern DNA-Sonden zum Einsatz kommen. Vom bebrüteten Nährboden wird mit Membranen ein Kolonie-Abklatschpräparat der gewachsenen Kolonien angefertigt. Nach Aufarbeitungsschritten werden die Membranen mit spezifischen DNA-Sonden inkubiert, und die Hybridisierung mittels Farbreaktion (früher: Radioaktivität) sichtbar gemacht. Durch Vergleich mit der zugehörigen Nährmedienplatte können die Farbpunkte den entsprechenden Kolonien zugeordnet werden. Davon abzugrenzen ist das sogenannte „dot blot“-Verfahren, bei dem die DNA einer Reinkultur zunächst aufgereinigt und anschließend auf die Membran aufgebracht wird.

Die Hybridisierungstechnik wird seit den 80er Jahren in der VTEC-Diagnostik genutzt. Weit verbreitet war der VTEC-Nachweis über die CVD419-Sonde, nachdem

LEVINE et al. (1987) berichteten, daß diese Sonde mit 99 % der *E. coli* O157:H7-Stämme sowie 77-81 % der VTEC anderer Serotypen hybridisierte (NATARO und KAPER, 1998). Später erst wurde festgestellt, daß diese Sonde einen Teil des *hly*<sub>EHEC</sub>-Gens detektiert (SCHMIDT et al., 1995). Als weitere Zielsequenz dienten die Verotoxin-Gene, wobei unter stringenten Bedingungen zwischen *vtx* 1 und *vtx* 2 unterschieden werden konnte (WILLSHAW et al., 1985; WILLSHAW et al., 1987). Während anfangs die Nutzung der Hybridisierungstechnik durch die Notwendigkeit des Einsatzes radioaktiv-markierter Gensonden eingeschränkt wurde, fand dieses Verfahren mit Einführung Digoxigenin- und Biotin-markierter Sonden breite Anwendung (PATON und PATON, 1998).

Die DNA-DNA-Hybridisierung kann vielfältig eingesetzt werden: mit ihrer Hilfe können *E. coli*-Isolate als VTEC identifiziert sowie präsumtive VTEC-Isolate als solche bestätigt werden (BÜLTE et al., 1990; BÜLTE, 1991). Weiterhin ermöglicht sie die gezielte, Serovar-unabhängige Isolierung von VTEC-Stämmen aus Screening-positiven Proben (GALLIEN et al., 2002a). Im Gegensatz zu den bislang vorgestellten Methoden erlaubt sie außerdem neben dem qualitativen Nachweis auch eine quantitative Erfassung der VTEC (STAHL und BÜLTE, 2000b). Letzteres könnte theoretisch auch der Immunoblot leisten; für die Untersuchung von Hackfleischproben erwies er sich jedoch in der Überprüfung von STAHL und BÜLTE (2000b) als ungeeignet. Für die quantitative Koloniehybridisierung lag die Nachweisgrenze für Rinderhackfleisch bei  $2,0 \times 10^1$  KbE/g, könnte jedoch auf  $1,0 \times 10^1$  KbE/g gesenkt werden. Im Vergleich zur Referenzmethode wurden die eingemischten Prüfstämme zu 69-94 % wiedergefunden. Anwendung findet das quantitative Verfahren u. a. im Rahmen von Verlaufsstudien bei VTEC-kontaminierten Lebensmitteln, wie beispielsweise Untersuchungen zum Einfluß der Rohwurst-Reifung auf VTEC-Keimzahlen (MÜLLER et al., 1998). Die Möglichkeit zur quantitativen Bestimmung schafft außerdem die Voraussetzung zur Festlegung von mikrobiologischen Grenzwerten (STAHL und BÜLTE, 2000b).

### 2.8.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Möglichkeit der schnellen und gezielten Amplifikation von DNA-Sequenzen mittels PCR-Technik hat - nicht nur in der VTEC-Diagnostik - zahlreiche Anwendungsgebiete eröffnet. Wurde sie früher v. a. als Bestätigungsreaktion im Anschluß an die kulturelle Isolierung sowie zur Charakterisierung und Typisierung der erhaltenen Isolate eingesetzt, rückt nun immer mehr die Anwendung als direktes Detektionssystem in den Vordergrund. Problematisch erscheint hierbei die mögliche Miterfassung nicht-lebensfähiger Zellen, die Anwesenheit inhibierender Substanzen in der Probenmatrix sowie die fehlende Isolierung der detektierten Organismen (OLSEN et al., 1995; BÜLTE et al., 1998; LÜCKE und TEN BOSCH, 1998).

Ähnlich wie der Verotoxin-EIA kann auch die PCR als Screening-Methode zum Serovar-unabhängigen Nachweis von VTEC aus Lebensmittel-Anreicherungskulturen angewandt werden. Wenngleich die PCR als sehr sensitives Verfahren gilt, ist auch hierfür eine vorgeschaltete Anreicherung unabdingbar, da nur so eine ausreichende Sensitivität gewährleistet werden kann (BÜLTE et al., 1998). TIMM et al. (1998) empfehlen den Einsatz der degenerierten Primer MK1/MK2 nach KARCH und MEYER (1989). Mit diesen gelingt eine breite Erfassung verschiedener *vtx*-Genvarianten

(*vtx 1*, *vtx 2*, *vtx 2c*, *vtx 2d*, *vtx 2e*, *vtx 2g*; SCHMIDT et al., 2000; LEUNG et al., 2003). *vtx 2f* wird nicht, *vtx 1c* nur unzuverlässig detektiert; beide spielen jedoch nach bisherigen Erkenntnissen nur eine untergeordnete Rolle im Rahmen des EHEC-Erkrankungsgeschehens beim Menschen (SCHMIDT et al., 2000; BÜRK et al., 2003).

Der selektive Nachweis von *E. coli* der Serogruppe O157 erfolgt über die Sequenzen des für das O-Antigen codierenden *rfbE* O157-Gens. Für den Nachweis aus Lebensmitteln wurde kürzlich ein PCR-Protokoll mit den Primern Gi O157I/II veröffentlicht, dessen Routinetauglichkeit in internationalen Ringversuchen an Reinkulturen sowie Tupferproben von Rinderschlachttierkörpern geprüft wurde. Die Nachweisgrenze für Reinkulturen lag bei  $1,125 \times 10^3$  Zellen pro Reaktionsansatz (100 %ige Erfassung; ABDULMAWJOOD et al., 2003). Die Sensitivität lag für Reinkulturen bei 96,8 %, für Tupferproben bei 92,2 %; die Spezifität betrug in beiden Fällen 100 % (ABDULMAWJOOD et al., 2003; ABDULMAWJOOD et al., 2004). Das Protokoll beinhaltet auch die Verwendung einer internen Amplifikationskontrolle, mit deren Hilfe falsch-negative Ergebnisse als solche erkannt werden können. Gemäß dem Vorschlag eines internationalen Autorenkollektivs sollten von führenden wissenschaftlichen Zeitschriften nur solche Publikationen über diagnostische PCRs akzeptiert werden, welche eine interne Amplifikationskontrolle beinhalten (HOORFAR et al., 2003).

Um falsch-positive Ergebnisse durch unspezifische Amplifikationen zu vermeiden, kann die Identität des amplifizierten Fragments durch Durchführung einer „nested-PCR“, Hybridisierung mit spezifischen DNA-Sonden, Restriktionsverdau oder DNA-Sequenzierung bestätigt werden (OLSEN et al., 1995; BÜLTE et al., 1998). Generell sollte ein positives PCR-Screening-Ergebnis durch ein zweites Verfahren ergänzt werden (BETTELHEIM und BEUTIN, 2003), wobei zur weiteren Charakterisierung die Erregerisolierung anzustreben ist (BÜLTE et al., 1998).

In neuerer Zeit wurden sogenannte **Real-time PCR**-Verfahren entwickelt, welche die Amplifikate über DNA-bindende Fluoreszenz-Farbstoffe detektieren. Durch den Wegfall der post-PCR-Schritte werden „carry over“-Kontaminationen verhindert, das Ergebnis liegt zeitnah vor. Diese neue PCR-Anwendung ermöglicht außerdem die Quantifizierung der PCR-Produkte. Die Identität der gebildeten Amplifikate kann durch Schmelzkurvenanalyse bestätigt werden. Ein von JOTHIKUMAR und GRIFFITHS (2002) publiziertes Verfahren etwa erlaubt den parallelen Nachweis von *vtx 1* und *vtx 2*, welche anschließend durch Schmelzkurvenanalyse differenziert werden können.

Um den immer wieder in der Literatur zitierten Nachteil des Nachweises nicht-lebensfähiger Zellen zu eliminieren, werden sogenannte reverse Transkriptase-PCRs (**RT-PCR**) entwickelt (MCINGVALE et al., 2002). Anstelle der vergleichsweise stabilen DNA, die auch nach dem Zelltod noch lange nachweisbar sein kann, wird messenger RNA (mRNA) detektiert. Diese ist weit weniger stabil und wird deshalb als Indikator für das Vorhandensein lebensfähiger Zellen angesehen (SHERIDAN et al., 1998).

Die weiteren Anwendungsmöglichkeiten zur Charakterisierung von Isolaten werden in Kapitel 2.9 besprochen.

### 2.8.3 Normen

Wie bereits erläutert, müssen die vorgestellten Untersuchungsmethoden zu Methodenkaskaden kombiniert werden, um einen zuverlässigen Nachweis von VTEC bzw. *E. coli* O157 zu ermöglichen. In Tabelle 39 sind normierte Verfahren für die Untersuchung von Lebensmitteln zusammengestellt.

Tabelle 39: Standardisierte Verfahren zum Nachweis von Verotoxin-bildenden *E. coli* (VTEC) bzw. *E. coli* O157 in Lebensmitteln

Norm (Stand)	Parameter	Substrat	Kurzbeschreibung
L 00.00-68, § 35 LMBG <sup>1)</sup> (Mai 2002) = DIN EN ISO <sup>2)</sup> 16654 (November 2001)	<i>E. coli</i> O157	Lebensmittel (DIN: + Futtermittel)	Anreicherung: mTSB <sup>3)</sup> +N <sup>4)</sup> IMS <sup>5)</sup> Isolierung: CT-SMAC <sup>6)</sup> + 2. Selektivmedium nach Wahl Bestätigung
L 06.00-44, § 35 LMBG (Dezember 2004) = DIN 10167 (März 2004) = L 07.00.54, § 35 LMBG (Dezember 2004) = L 08.00-47, § 35 LMBG (Dezember 2004)	"	Fleisch und Fleischerzeugnisse, Wurstwaren	Ergänzung zu DIN 16654: Anreicherung: BRILA <sup>7)</sup> Isolierung: 2. Selektivmedium: HC <sup>8)</sup>
L 07.18-1, § 35 LMBG (Mai 2002)	VTEC	Hackfleisch	Anreicherung: mTSB+N, mTSB PCR: MK1/MK2 (+ ggf. KS7/KS8, LP43/LP44) <sup>9)</sup> Koloniehybridisierung Isolierung
DIN 10118 (Juni 2004)	"	Lebensmittel tierischer Herkunft	Anreicherung: mTSB(+N) <sup>10)</sup> , TSB+Enhancer Verotoxin-EIA/ELISA <sup>11)</sup> Immunoblot Bestätigung

1) Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 des Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetzes

2) Deutsches Institut für Normung e. V., Berlin; Europäisches Komitee für Normung, Brüssel, Belgien; International Organization for Standardization, Genf, Schweiz

3) modifizierte Trypton-Soja-Bouillon

4) Novobiocin

5) Immunomagnetische Separation

6) Sorbit-McConkey-Agar mit Cefixim und Tellurit

7) Brillantgrün-Galle-Laktose-Bouillon

8) Hemorrhagic Colitis-Agar

9) Primer nach KARCH und MEYER (1989); SCHMIDT et al., (1994b); CEBULA et al. (1995)

10) bei Fleisch und Fleischerzeugnissen: auch BRILA

11) Enzyme linked immunosorbent assay/Enzymimmunoassay

## **2.9 Typisierung von VTEC**

Im Rahmen epidemiologischer Untersuchungen ist eine Charakterisierung von Isolaten unterhalb der Speziesebene erforderlich, beispielsweise bei der Aufklärung von Infektketten. Nach STROCKBINE et al. (1998) ist dabei eine Unterscheidung zwischen den Begriffen „Subtypisierung“ und „DNA-Fingerprinting“ nützlich. Der Begriff „Subtypisierung“ sollte nach Meinung der Autoren standardisierten Methoden vorbehalten bleiben, die auch bei unterschiedlichen Anwendern vergleichbare, universell verständliche Ergebnisse liefern. Als Beispiel kann die Phagentypisierung gelten. Beim DNA-Fingerprinting hingegen können die Ergebnisse zwischen verschiedenen Untersuchern variieren, es existieren keine universell gültigen Einteilungskriterien.

Aufgrund der nachfolgend erläuterten Vor- und Nachteile der verschiedenen zur Verfügung stehenden Typisierungsmethoden empfehlen viele Autoren, verschiedene Verfahren miteinander zu kombinieren, um optimale Ergebnisse zu erhalten (GRIF et al., 1998a; STROCKBINE et al., 1998; HAHM et al., 2003).

### **2.9.1 Methoden zur Phänotypisierung**

#### **2.9.1.1 Serotypisierung**

Die Serotypisierung stellt eine der frühesten Typisierungsmethoden für *E. coli*-Stämme dar. Die Bestimmung der O- und H-Antigene nach ØRSKOV und ØRSKOV (1984) durch Agglutination mit Kaninchen-Antiseren im Mikrotiterplattenverfahren wird immer noch als „gold standard“ angesehen. Jedoch bereitet insbesondere die Typisierung des H-Antigens Schwierigkeiten, da dessen Expression verschiedenen Einflüssen unterliegt, häufig Kreuzreaktionen beobachtet werden und keine kommerziell erhältlichen und somit standardisierten Antiseren zur Verfügung stehen. Aus den genannten Gründen ist die klassische Serotypisierung Aufgabe der Referenzlaboratorien (PRAGER et al., 2003). Die in Routinelabors häufig durchgeführte Bestimmung des O-Antigens (beispielsweise im Rahmen der kulturellen Untersuchung auf *E. coli* O157) mittels kommerziell erhältlichen Latex-Agglutinationstests sind eher als Screeningmethode anzusehen und von der klassischen Serotypisierung abzugrenzen. Soll auch das H-Antigen in der Routine-Diagnostik untersucht werden, so eignen sich molekularbiologische Verfahren zur Bestimmung von *fliC*-Polymorphismen, wie sie beispielsweise von FIELDS et al. (1997) entwickelt wurden. PRAGER et al. (2003) bescheinigten diesen Methoden eine für die Routinediagnostik ausreichende Übereinstimmung mit der klassischen Serotypisierung. Die genotypische Herangehensweise erlaubt außerdem eine Klassifizierung unbeweglicher (H<sup>-</sup>) sowie nicht-typisierbarer (H<sup>nt</sup>) Stämme.

Aufgrund des Auftretens von Kreuzreaktionen ist auch bei der Anwendung kommerziell erhältlicher O157-Antiseren Vorsicht geboten: Die in den meisten normierten Untersuchungsvorschriften enthaltene parallele Bestätigung mittels serologischer und biochemischer Methoden sollte unbedingt beachtet werden, um bekannte falsch-positive Reaktionen, wie beispielsweise durch andere *Escherichia* spp.,

*Citrobacter sedlakii*, *Alcaligenes faecalis* oder *Morganella morganii* verursacht, auszuschließen bzw. als solche zu erkennen (SORDILLO et al., 1998).

Unter widrigen Umgebungsbedingungen kann die O157-Antigenität verloren gehen, so daß solche Stämme sich der immunologischen Detektion entziehen. Nach 21-monatiger Lagerung in Wasser konnten HARA-KUDO et al. (2000) bei einigen Versuchsstämmen kein O-Antigen mehr detektieren, obwohl die Zellen noch kultivierbar waren und sogar Verotoxine bildeten.

Die Bestimmung des Serovars kann zur Abschätzung des Pathogenitätspotentials eines Isolats beitragen, da insbesondere bei schweren Krankheitsverläufen immer wieder bestimmte Serogruppen, wie O157, O26, O103, O111 oder O145, gehäuft auftreten (s. Kapitel 2.5.6.1). Aufgrund der regionalen Dominanz bestimmter Serotypen, wie beispielsweise O157:H7 im nordamerikanischen Raum, ermöglicht die Serotypisierung jedoch nur eine vorsichtige Aussage über epidemiologische Zusammenhänge und sollte durch weitere Verfahren ergänzt werden.

### 2.9.1.2 Phagentypisierung

Diese Typisierung beruht auf der Wirtsspezifität von Bakteriophagen, die charakteristische Lysis-Muster hervorrufen, wenn ein Isolat einem definierten Phagen-Panel unterworfen wird. Das in Kanada entwickelte und später erweiterte Schema zur Phagentypisierung von *E. coli* O157:H7-Stämmen (AHMED et al., 1987; KHAKHRIA et al., 1990) kommt aufgrund seiner einfachen Durchführbarkeit und guten Standardisierbarkeit mittlerweile in einer Vielzahl von Ländern zur Anwendung (TREVENA et al., 1996; HEUVELINK et al., 1998b; STROCKBINE et al., 1998; LIESEGANG et al., 2000; SAARI et al., 2001). Besonders wertvoll war es in den Jahren vor der Etablierung molekularbiologischer Typisierungsverfahren. Doch auch heute noch wird es aufgrund der genannten Vorteile oftmals zur initialen Typisierung angewendet und bei Bedarf durch Methoden mit höherer „discriminatory power“ ergänzt (BARRETT et al., 1994; STROCKBINE et al., 1998; LIESEGANG et al., 2000). STROCKBINE et al. (1998) empfehlen beispielsweise eine Kombination aus Phagentypisierung, *vtx*-Typisierung und PFGE. Limitierend wirkt jedoch das oftmals regional gehäufte Auftreten bestimmter Phagentypen; so konnten 56 % der zwischen 1990 und 1999 in Finnland isolierten humanen *E. coli* O157-Stämme dem Phagentyp PT2 zugeordnet werden. Weiterhin werden immer wieder Stämme entdeckt, die keinem bestehenden Phagentyp zuzuordnen sind; das Schema sollte entsprechend erweitert werden (SAARI et al., 2001).

### 2.9.1.3 Biotypisierung

Über den Abbau verschiedener Kohlenhydrate sowie weitere enzymatische Reaktionen läßt sich das biochemische Profil eines Isolats erstellen. Für *E. coli* O157-Stämme schlugen ALEKSIC et al. (1992) ein Biotypisierungs-Schema vor, welches auf der Verwertung von Sorbitol, Dulcitol, Rhamnose, Raffinose und Sucrose sowie auf der  $\beta$ -D-Glucuronidase-Reaktion beruhte und die Einteilung in 11 Biotypen erlaubte. Im Gegensatz zu den Beobachtungen von ALEKSIC et al. (1992) konnten jedoch RATNAM et al. (1988) bei der Untersuchung von 174 *E. coli* O157:H7-Stämmen keine Unterschiede in der Verwertung von Dulcitol, Rhamnose und Raffinose feststellen. Im

Vergleich zu anderen Typisierungsmethoden tritt die Biotypisierung in der Bedeutung zurück.

#### **2.9.1.4 Verotoxin-Typisierung**

Die Typisierung von Verotoxinen ist mittels immunologischer Methoden möglich, wird jedoch mittlerweile hauptsächlich auf genotypischer Ebene durchgeführt. Die epidemiologische Aussagefähigkeit ist eher begrenzt, die VT-Typisierung kann aber andere Typisierungsverfahren sinnvoll ergänzen (STROCKBINE et al., 1998). Wichtig ist sie aber im Hinblick auf die Abschätzung des Pathogenitätspotentials eines Isolats, da bevorzugt bestimmte Toxinvarianten wie VT 2 und/oder VT 2c mit schweren Krankheitsverläufen assoziiert sind (s. Kapitel 2.5.6.2).

#### **2.9.1.5 Antibiotikaresistenztestung**

Die Bedeutung der Antibiotikaresistenztestung ist darin zu sehen, daß sie vergleichsweise einfach durchzuführen und die entsprechende Ausstattung in vielen Labors vorhanden ist (STROCKBINE et al., 1998). Im Vergleich zur Gesamtpopulation der *E. coli* zeigen sich VTEC-Stämme zu einem geringeren Prozentsatz resistent (BETTELHEIM et al., 2003; KLEIN und BÜLTE, 2003; MILCH et al., 2003).

#### **2.9.1.6 Multilocus enzyme electrophoresis (MEE)**

Die elektrophoretische Auftrennung von „housekeeping“-Enzymen gilt als Standardmethode für phylogenetische Untersuchungen. Auch für die Etablierung des Klon-Konzeptes von *E. coli* O157:H7 wurde dieses Verfahren angewendet (WHITTAM et al., 1993).

### **2.9.2 Methoden zur Genotypisierung**

#### **2.9.2.1 Plasmidtypisierung**

Durch gelelektrophoretische Auftrennung lassen sich Anzahl und Größe der in der Zelle enthaltenen Plasmide darstellen. Bereits bei der Untersuchung der ersten bekannt gewordenen EHEC-Ausbrüche wurde die Plasmidtypisierung bei humanen und Lebensmittel-Isolaten durchgeführt (WELLS et al., 1983). Mittlerweile hat sich gezeigt, daß diese Methode vielen anderen Typisierungsverfahren (Phagentypisierung, PFGE, RAPD) unterlegen ist (RADU et al., 2001; MILCH et al., 2003). Sie kann jedoch eine sinnvolle Ergänzung zu anderen Subtypisierungsmethoden darstellen. So erwies sich in der Untersuchung von PRADEL et al. (2001) die Kombination aus *vtx 2*-RFLP, Bestimmung der *vtx 2*-Varianten und Plasmidprofilanalyse genauso wertvoll wie die PFGE.

#### **2.9.2.2 Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)**

Bei der PFGE wird das gesamte bakterielle Genom einem Restriktionsverdau unterworfen. Dazu ist der Einsatz selten-schneidender Restriktionsenzyme, sogenannter „rare cutters“, erforderlich, da ansonsten die Anzahl der entstehenden DNA-Fragmente zu hoch wäre, um gelelektrophoretisch ein klar erkennbares Bandenmuster zu erhalten. Aus der geringen Anzahl von Schnittstellen resultieren jedoch vergleichsweise große Fragmente, die mittels herkömmlicher Elektrophorese nicht

mehr auftrennbar sind, da ab ca. 50 kb die Wanderung im elektrischen Feld nicht mehr proportional zur Fragmentlänge erfolgt. Die Auftrennung gelingt jedoch bei Anlegen eines alternierenden elektrischen Feldes, da sich die Reorientierungsgeschwindigkeit von DNA-Fragmenten bis zu 2.000 kb proportional zu ihrer Größe verhält. Das Verfahren wurde erstmals von SCHWARTZ und CANTOR (1984) bei Hefen beschrieben, wurde seitdem jedoch bei vielen Bakterien-Spezies erfolgreich angewandt (STROCKBINE et al., 1998).

BÖHM und KARCH (1992) berichteten als erste über den Einsatz der PFGE bei *E. coli* O157:H7-Stämmen. Die erhaltenen Restriktionsmuster der 36 untersuchten Stämme differierten nur um wenige Banden, oftmals wiesen epidemiologisch nicht assoziierte Isolate das gleiche Muster auf. Die Autoren schlußfolgerten, daß es sich bei *E. coli* O157:H7 um einen hochkonservierten Klon handelt, so daß DNA-Fingerprinting im Rahmen von epidemiologischen Studien durch weitere Methoden ergänzt werden müßte. Mittlerweile hat sich die PFGE jedoch in vielen Untersuchungen als sehr wertvoll erwiesen. Sie wurde erfolgreich im Rahmen von Ausbruchsuntersuchungen (BARRETT et al., 1994) oder bei epidemiologischen Studien zur Ermittlung von Übertragungswegen (BARKOCY-GALLAGHER et al., 2001; AVERY et al., 2004; DUFFY et al., 2005) eingesetzt. Im direkten Vergleich zu andern Typisierungsmethoden hat sie eine sehr große „discriminatory power“ bewiesen, so daß sie heute als „gold standard“ angesehen wird (RADU et al., 2001; GIAMMANCO et al., 2002; HAHM et al., 2003; MILCH et al., 2003; FOLEY et al., 2004). Aus diesem Grund wurde sie auch für das molekulare Subtypisierungs-Netzwerk „PulseNet“ herangezogen, welches 1996 vom CDC in Zusammenarbeit mit anderen US-amerikanischen Untersuchungseinrichtungen ins Leben gerufen wurde, um die Typisierung von „food borne pathogens“ zu standardisieren und so durch Vergleichbarkeit der Ergebnisse verschiedener Labors die Aufklärung überregionaler Ausbrüche zu erleichtern. *E. coli* O157:H7 war der erste Lebensmittelinfektionserreger, welcher in das Programm aufgenommen wurde (SWAMINATHAN et al., 2001).

Als nachteilig wird der große Zeit-, Material- und Arbeitsaufwand gesehen, der mit der PFGE verbunden ist. Um Schäden an der hochmolekularen DNA zu vermeiden, ist eine besonders vorsichtige Probenaufbereitung notwendig, was zusammen mit den langen Elektrophorese-Laufzeiten in einem großen Zeitbedarf resultiert (HAHM et al., 2003). Aus diese Grund empfehlen einige Autoren, die PFGE nur in zweifelhaften Fällen durchzuführen, und vorab einfachere und schnellere Verfahren anzuwenden (HAHM et al., 2003; MILCH et al., 2003). Generell wird trotz der hohen „discriminatory power“ auch für die PFGE die Kombination mit anderen Verfahren empfohlen, da auch epidemiologisch nicht assoziierte Stämme das gleiche PFGE-Muster aufweisen können und zudem die Interpretation sehr ähnlicher, aber nicht identischer Profile Schwierigkeiten bereiten kann (BARRETT et al., 1994; STROCKBINE et al., 1998; LIESEGANG et al., 2000). Als geeignetstes Restriktionsenzym für *E. coli* O157:H7 hat sich *Xba* I erwiesen (BÖHM und KARCH, 1992). Um eine zuverlässige Aussage zu ermöglichen, sollte die PFGE jedoch parallel mit mehreren Restriktionsenzymen durchgeführt werden (DAVIS et al., 2003; GUPTA et al., 2004).

### 2.9.2.3 Ribotypisierung

Auch das „ribotyping“ beruht auf dem Restriktionsverdau des Genoms, wobei hier häufig-schneidende Enzyme zum Einsatz kommen. Nach elektrophoretischer Auftrennung werden die Fragmente im „Southern blot“-Verfahren mit rRNA-Sonden hybridisiert. Während die Ribotypisierung in der ersten Hälfte der 90er Jahre bei einer Vielzahl unterschiedlicher Organismen breite Anwendung fand, erwies sie sich in mehreren Untersuchungen zur Typisierung von *E. coli* O157-Stämmen als ungeeignet (MARTIN et al., 1996; GRIF et al., 1998a; STROCKBINE et al., 1998). Im Gegensatz dazu bescheinigen HAHM et al. (2003) dieser Methode eine gute „discriminatory power“ und empfehlen sie aufgrund der einfachen und schnellen Durchführbarkeit insbesondere für den Einsatz bei umfangreichen Screening-Untersuchungen, die im Bedarfsfall durch die genauere, jedoch viel aufwendigere PFGE ergänzt werden kann. AVERY et al. (2002) bescheinigten diesen beiden Verfahren eine vergleichbare Eignung zur Differenzierung, die jedoch durch Kombination der beiden Methoden signifikant verbessert werden konnte.

### 2.9.2.4 Weitere Modifikationen des Restriktions-Fragment-Längen-Poly-morphismus-Tests (RFLP)

Neben dem bekannten „ribotyping“ wurden weitere Typisierungsverfahren publiziert, welche auf dem Restriktionsverdau des Genoms in Kombination mit einer anschließenden Hybridisierung der Fragmente im „Southern blot“-Verfahren beruhen. Als Sonden wurden u. a.  $\lambda$ -Bakteriophagen- oder Verotoxin-Gensequenzen eingesetzt (PAROS et al., 1993; SAMADPOUR, 1995); beide Verfahren fanden jedoch keine weite Verbreitung (STROCKBINE et al., 1998). DATZ et al. (1996) beschrieben eine Hybridisierung mit Sonden des  $\lambda$ -Bakteriophagen-Gens *p*, welches eine Rolle bei der Phagen-Replikation spielt und teilweise in Nachbarschaft zu Verotoxin-Genen gefunden werden kann. Die Erstellung des *p*-Gen-Profiles wurde von LIESEGANG et al. (2000) in Kombination mit der PFGE empfohlen.

### 2.9.2.5 Genotypische Bestimmung des Virulenzprofils

Auf die Bedeutung der Verotoxin-Typisierung wurde bereits in Abschnitt 2.9.1.4 eingegangen. Um die einzelnen VT 1- und VT 2-Varianten differenzieren zu können, ist jedoch meist der Einsatz genotypischer Verfahren erforderlich. Teilweise muß im Anschluß an die PCR ein Restriktionsverdau vorgenommen werden, um bestimmte Varianten unterscheiden zu können. In Tabelle 40 ist eine Auswahl an publizierten Primern zur *vtx*-Typisierung aufgelistet.

Neben der Verotoxin-Typisierung wird auch auf das Vorhandensein weiterer Virulenzgene untersucht, so z. B. auf das *hly*<sub>EHEC</sub>- und *eae*-Gen. Letzteres kann ebenfalls gemäß den verschiedenen Intimin-Varianten typisiert werden (REID et al., 1999; GALLIEN et al., 2000).

Tabelle 40: Primer zur Verotoxin-Typisierung bei *E. coli*-Stämmen

Ziel-Gen	Primer-Akronym	Quelle
<i>vtx 1</i> <sup>1)</sup>	LP30 / LP31	CEBULA et al., 1995
<i>vtx 1</i>	KS7 / KS8	SCHMIDT et al., 1994b
<i>vtx 1c</i>	Stx1c-1 / Stx1c-2	ZHANG et al., 2002c
<i>vtx 1d</i>	VT1AvarF / VT1AvarR	BÜRK et al., 2003
<i>vtx 2</i>	LP43 / LP44	CEBULA et al., 1995
<i>vtx 2 / vtx 2c</i> <sup>2)</sup>	GK3 / GK4	RÜSSMANN et al., 1994
<i>vtx 2d</i>	VT2d-AM-I / VT2d-AM-II	ABDULMAWJOOD und BÜLTE, 2000
<i>vtx 2e</i>	VTe-a / VTe-b	JOHNSON et al., 1990
<i>vtx 2e</i>	FK1 / FK2	FRANKE et al., 1995
<i>vtx 2f</i>	128-1 / 128-2	SCHMIDT et al., 2000
<i>vtx 2g</i>	209F / 781R	LEUNG et al., 2003

<sup>1)</sup> Verotoxin-Gen

<sup>2)</sup> anschließend Restriktionsverdau mit *Hae* III zur Differenzierung von *vtx 2* und *vtx 2c*

### 2.9.2.6 Random amplification of polymorphic DNA (RAPD)

Bei der auch als „arbitrarily primed PCR“ bezeichneten RAPD wird eine PCR mit willkürlich gewählten, nur ca. zehn Nukleotide umfassenden Primern unter wenig stringenten Annealing-Bedingungen durchgeführt, woraus ein Bandenmuster unterschiedlich langer Amplifikate mit unbekannter Sequenz resultiert (LÜCKE und TEN BOSCH, 1998). Wenngleich es sich hierbei um eine schnelle und verhältnismäßig einfach durchzuführende Typisierungsmethode handelt, wird immer wieder über Probleme mit der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse berichtet (HOPKINS und HILTON, 2001). Im Vergleich zur PFGE wird der RAPD eine geringere „discriminatory power“ bescheinigt (GRIF et al., 1998a; RADU et al., 2001), trotzdem wird sie aufgrund der einfacheren Durchführbarkeit als initiale Typisierungsmethode vorgeschlagen (MILCH et al., 2003).

### 2.9.2.7 Repetitive element-PCR (rep-PCR)

Einem ähnlichen Ansatz wie die RAPD folgt auch die rep-PCR. Im Unterschied zur erstgenannten Methode werden hier jedoch keine zufällig ausgewählten Primer verwendet, sondern Oligonukleotid-Homologe definierter Sequenzen, die in zahlreichen Kopien im Genom vorliegen. Da die Zielsequenzen bekannt sind, kann die PCR unter stringenteren Bedingungen ablaufen, was die von der RAPD bekannten Probleme bezüglich der Reproduzierbarkeit reduzieren sollte (JOHNSON und O'BRIEN, 2000). *In praxi* wurden jedoch auch bei dieser modifizierten Methode ähnliche Schwierigkeiten wie bei der RAPD beobachtet (JOHNSON und O'BRIEN, 2000; FOLEY et al., 2004). Als Primer kommen beispielsweise „**enterobacterial repetitive intergenic consensus**“ (**ERIC**)- oder „**repetitive extragenic palindromic**“ (**REP**)-Sequenzen zur Anwendung. Als Vorteil ist die einfache und schnelle Durchführbarkeit zu nennen; jedoch

erreicht auch diese Methode nicht die hohe „discriminatory power“ der PFGE (HAHM et al., 2003; FOLEY et al., 2004).

### **2.9.2.8 Amplified fragment length polymorphism (AFLP)**

Die AFLP basiert auf einer selektiven PCR-Amplifikation von Restriktionsfragmenten, die aus einem vollständigen Verdau des kompletten bakteriellen Genoms resultierten. Werden die Amplifikate über Fluoreszenzsignale detektiert, spricht man auch von FAFLP. Von einigen Autoren wird dieses Verfahren als gleichwertige Alternative zur PFGE angesehen (IYODA et al., 1999; SMITH et al., 2000), andere bescheinigen der PFGE eine bessere Eignung (WEIR et al., 2000; HAHM et al., 2003). Im Vergleich zu dieser ist die AFLP weniger zeitaufwendig (HAHM et al., 2003) und ermöglicht eine genauere Bestimmung der Bandengröße (SMITH et al., 2000). Ein weiterer Vorteil liegt in der Möglichkeit der partiellen Automatisierung (HAHM et al., 2003).

### **2.9.2.9 Polymorphic amplified typing sequences (PATS)**

Da der „gold standard“ der *E. coli* O157-Subtypisierung, die *Xba* I-PFGE, zeitaufwendig ist und Schwierigkeiten in der Auswertung bereiten kann, wurde versucht, die zugrunde liegenden molekularen Gegebenheiten durch eine einfachere und schnellere Technik zu detektieren. Ursache für Unterschiede im PFGE-Restriktionsmuster sind u. a. Insertionen oder Deletionen von *Xba* I-Schnittstellen. Diese Insertionen bzw. Deletionen können auch mit Hilfe mehrerer PCRs, deren Primer mit Nachbarregionen von *Xba* I-Schnittstellen hybridisieren, nachgewiesen werden. Das PATS-Profil beruht also auf der An- oder Abwesenheit von PCR-Amplifikaten. Erste Versuche ergaben, daß die *Xba* I-PATS eine geringere „discriminatory power“ aufweist als die *Xba* I-PFGE (KUDVA et al., 2002). Dieser Nachteil konnte jedoch durch Erweiterung des Primer-Panels, das zusätzlich auch *Avr* II-Schnittstellen-tragende Genomabschnitte detektiert, behoben werden. Nach Ansicht der Autoren liegt nun ein Subtypisierungsverfahren vor, dessen Differenzierungsvermögen dem der PFGE gleicht, jedoch einfacher in der Durchführung und Ergebnisauswertung ist (KUDVA et al., 2004).

### **2.9.2.10 Multi-locus variable-number tandem-repeats analysis (MLVA)**

Unter der Bezeichnung „variable number of tandem repeats“ (VNTR) versteht man Wiederholungen von Sequenzmotiven, bei denen die Anzahl der Wiederholungseinheiten an einem gegebenen Locus variiert. LINDSTEDT et al. (2003) identifizierten solche VNTRs im *E. coli* O157-Genom und entwickelten spezifische Primer für sieben der VNTR-Regionen. Abhängig von der Anzahl der Wiederholungseinheiten an einem gegebenen Locus resultiert in der entsprechenden PCR ein Amplifikat variabler Größe. Aus der Kombination dieser sieben Amplifikatgrößen resultiert das MLVA-Profil. Die Autoren bescheinigten dem Verfahren eine geringfügig höhere „discriminatory power“ als der PFGE, bei geringerem Arbeits- und Zeitaufwand. Eine andere Arbeitsgruppe kam zu ähnlich guten Ergebnissen (NOLLER et al., 2003a). Kürzlich wurde eine modifizierte Vorgehensweise vorgestellt, bei der die PCRs zu zwei Multiplex-Reaktionen zusammengefaßt wurden, was zu einer Reduktion der Durchführungszeit führte (LINDSTEDT et al., 2004).

### **2.9.2.11 Multilocus sequence typing (MLST)**

Diese Methode basiert auf der DNA-Sequenzierung von „housekeeping“-Gensegmenten, welche nicht unter Selektionsdruck stehen. Sie gilt als „gold standard“ für phylogenetische Untersuchungen und wird zu diesem Zweck auch bei VTEC angewendet (WIELER, 2004). Im Rahmen von epidemiologischen Untersuchungen scheint sie jedoch für *E. coli* O157:H7 nicht geeignet (NOLLER et al., 2003b; FOLEY et al., 2004).

### 3 MATERIAL UND METHODEN

#### 3.1 Referenz- und Kontrollstämme

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Stämme als Kontrollen bei den angewandten Nachweisverfahren eingesetzt:

Tabelle 41: Verwendete *Escherichia (E.) coli*-Referenz- und Kontrollstämme

Stamm-bezeichnung	Serovar	Virulenz-gene <sup>1)</sup>	biochemische Eigenschaften <sup>2)</sup>	Herkunft	Quelle/Bezug <sup>3)</sup>
EDL 933	O157:H7	<i>vtx 1</i> <i>vtx 2</i> <i>eae</i> <i>hly</i> <sub>EHEC</sub>	S <sup>-</sup> β-D-Gluc <sup>-</sup>	„Hamburger“	O'BRIEN et al. (1983)
NCTC 12079	O157:H7	<i>vtx 1</i> <i>vtx 2</i> <i>eae</i> <i>hly</i> <sub>EHEC</sub>	S <sup>-</sup> β-D-Gluc <sup>-</sup>	Mensch, Stuhl	NCTC
ATCC 25922	O6	---	S <sup>+</sup> β-D-Gluc <sup>+</sup> α-Hämolyisin <sup>+</sup>	Mensch	ATCC
C 600	K12	---	S <sup>+</sup> β-D-Gluc <sup>+</sup>	Labor	Prof. KARCH, Münster
3547/99	O157:H <sup>-</sup>	<i>vtx 2</i> , <i>eae</i>	S <sup>+</sup> β-D-Gluc <sup>+</sup>	Minipferd	Prof. KARCH, Münster

<sup>1)</sup> *vtx*: Verotoxin-Gen; *eae*: *E. coli* attaching and effacing-Gen; *hly*<sub>EHEC</sub>: EHEC-Hämolyisin-Gen

<sup>2)</sup> S<sup>+</sup>/S<sup>-</sup>: Sorbit-positiv/-negativ; β-D-Gluc<sup>+</sup>/β-D-Gluc<sup>-</sup>: β-D-Glucuronidase-positiv/-negativ

<sup>3)</sup> NCTC: National Collection of Type Cultures, Central Public Health Laboratories, Colindale, London, Vereinigtes Königreich; ATCC: American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, USA

Darüber hinaus wurde auch ein *Klebsiella (K.) pneumoniae*-Stamm (Herkunft: Dr. Pietsch, ehem. Bundesgesundheitsamt) aufgrund seiner biochemischen Eigenschaften (Indol-negativ, β-D-Glucuronidase-negativ) als Kontrollstamm eingesetzt.

Nach Anzucht in 1 ml BHI-Bouillon (Fa. Merck, 1.10493.) bei 37 °C für 18 ± 2 h wurden die Referenz- und Kontrollstämme nach Zusatz von 200 µl Glycerin (Fa. Merck, 1.04094.2500) für 3-5 h bei 4-7 °C abgekühlt und anschließend bei -18 °C in Kryoröhrchen (Qualilab-Cryoröhrchen, 2 ml, PP, Fa. VWR International, 4794503) gelagert. Die erneute Anzucht erfolgte auf Plate Count (PC)-Agar (Fa. Merck, 1.05463) bei 37 °C für 18-24 h.

## **3.2 Untersuchungsmaterial**

In der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt 100 Pferdekotproben untersucht. 30 Proben stammten aus der Chirurgischen Veterinärklinik sowie 17 aus der Medizinischen und Gerichtlichen Veterinärklinik der Justus-Liebig-Universität Gießen. 32 Proben wurden am Schlachthof Gießen gezogen; 11 Proben stammten aus einem Reitstall in Mittelhessen und 10 Proben aus einem Reitstall in Rheinland-Pfalz.

Im Hinblick auf die Pferdebesitzer mußte in den Stallungen von einer rektalen Probenentnahme abgesehen werden; stattdessen wurde frisch abgesetzter Kot verwendet. Am Schlachthof konnten teilweise auch Proben direkt nach der Schlachtung aus dem Rektum entnommen werden. Die mindestens 30 g umfassenden Proben wurden in Einmal-Handschuhen (Manuplast<sup>®</sup> PE-Handschuhe, Fa. Braun, 6075010; Peha-foI, Fa. Hartmann, 999522/2) verpackt und bis Untersuchungsbeginn bei 4-7 °C gelagert. Die vom Schlachthof stammenden Proben konnten teilweise erst nach drei bis vier Stunden kühlgelagert werden. Der Untersuchungsbeginn erfolgte innerhalb von fünf Stunden nach Probenahme.

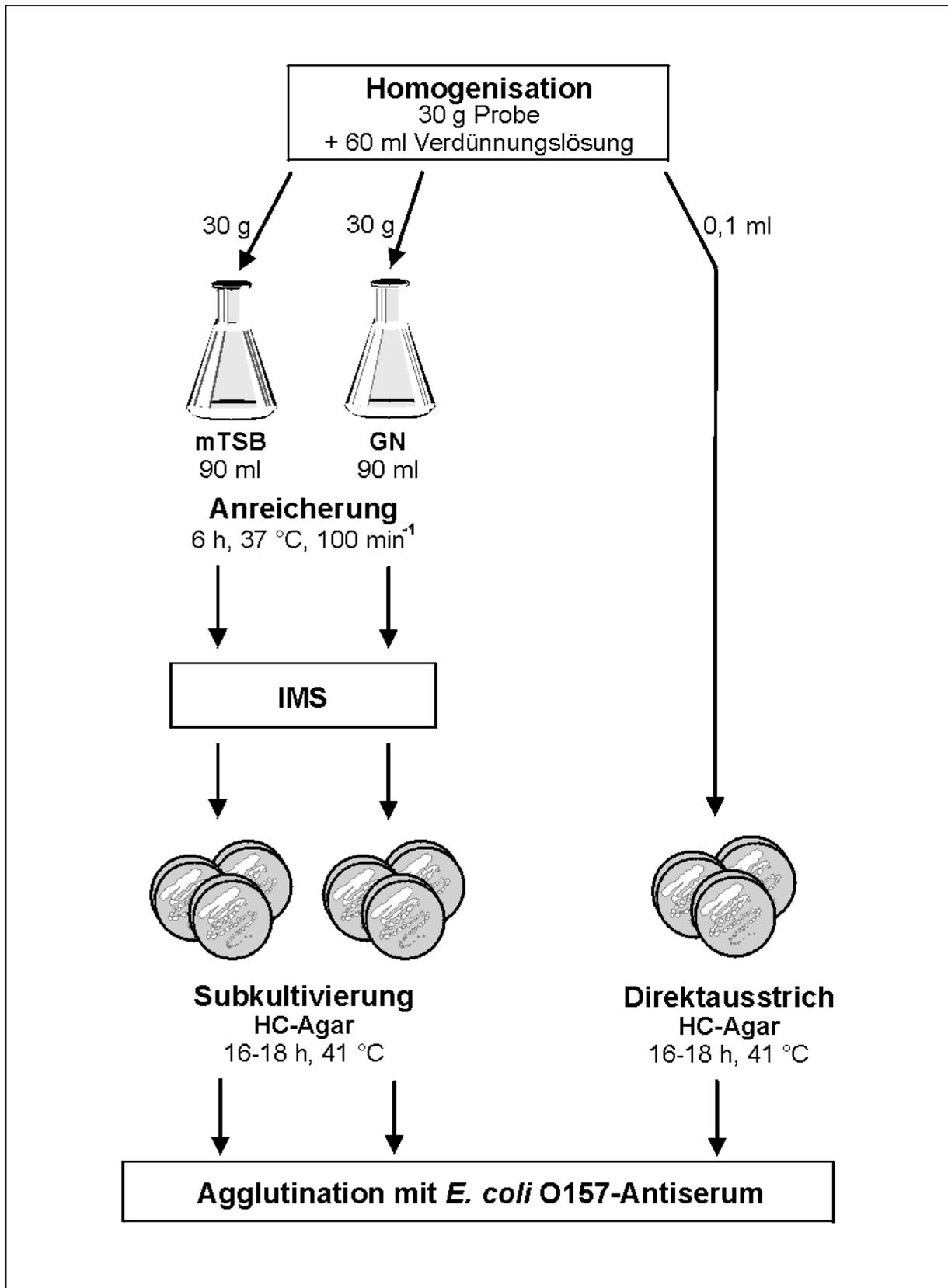
## **3.3 Kultureller Nachweis von *Escherichia coli* O157**

### **3.3.1 Übersicht über den Versuchsaufbau**

Im ersten Versuchsabschnitt wurden insgesamt 51 Proben untersucht, wobei jede Probe sowohl mit zwei unterschiedlichen Anreicherungsmedien und nachfolgender immunomagnetischer Separation (IMS), als auch im Direktausstrichverfahren ohne IMS vergleichend untersucht wurde. Die Subkultivierung erfolgte auf Hemorrhagic Colitis (HC)-Agar nach SZABO et al. (1986). Von diesem wurden verdächtige Kolonien mittels *E. coli* O157-Antiserum untersucht.

Da durch kombinierte Anwendung von modifizierter Trypton-Soja-Bouillon (mTSB) und IMS die höchsten *E. coli* O157-Isolationsraten erzielt werden konnten, wurde für die weiteren 49 Proben auf den Direktausstrich verzichtet und nur noch dieses Anreicherungsmedium eingesetzt. Der weitere Untersuchungsgang mit IMS, Subkultivierung auf HC-Agar und Untersuchung mittels *E. coli* O157-Antiserum blieb unverändert.

Der Versuchsaufbau ist in Abbildung 5 wiedergegeben.



**Abbildung 5:** Versuchsaufbau für den Nachweis von *E. coli* O157  
(mTSB: modifizierte Trypton-Soja-Bouillon; GN: gram negative broth nach HAJNA; IMS: immunomagnetische Separation; HC-Agar: Hemorrhagic Colitis-Agar nach SZABO et al. [1986])

### 3.3.2 Anreicherungsverfahren und Direktausstrich

#### 3.3.2.1 Erste Versuchsphase

30 g jeder Probe wurden in einen sterilen Stomacherbeutel (Baglight<sup>®</sup>, Fa. Inter-science) eingewogen (PM 4600 Delta Range, Fa. Mettler, F 66772) und mit 60 ml Verdünnungslösung (1,0 g Pepton [Pepton aus Casein, pankreatisch verdaut, Fa. Merck, 1.07213.], 8,5 g NaCl [Fa. Merck, 1.06404.5000] ad 1000 ml Aqua dest.) manuell geknetet, bis eine homogene Suspension entstand. Auf eine Homogenisation im Beutelwalkmischgerät wurde verzichtet, da dies zu einer Anheftung der Faserbestandteile des Pferdekotes an der gesamten Beuteloberfläche führte.

0,1 ml dieser Kotsuspension wurden im Verdünnungsausstrich auf drei HC-Agarplatten (Fa. Sifin, TN 1223) ausgespatelt; d. h. nach Beimpfung der ersten HC-Agarplatte wurden mit demselben Drigalski-Spatel noch zwei weitere HC-Agarplatten beimpft, so daß ein Verdünnungseffekt eintrat. Die Agarplatten waren zuvor für ca. 15 min bei 40 °C im Brutschrank vorgetrocknet worden. Die Inkubation der Nährmedien erfolgte aerob bei 41 °C für 16-18 h.

Parallel dazu wurden jeweils 30 g der Kotsuspension, das entsprach 10 g reinem Kot, in 90 ml der beiden Anreicherungsmedien modifizierte Trypton-Soja-Bouillon (mTSB; Fa. Merck, 1.05459, unter Zusatz von 1,5 g/l Dikaliumhydrogenphosphat [Fa. Merck, 1.05101.5000] sowie 1,5 g/l Gallesalz Nr. 3 [Fa. Oxoid, L 56]) sowie gram negative broth nach HAJNA (GN; Fa. Difco, 248610) gegeben. Diese wurden für 6 h aerob bei 37 °C im Schüttelinkubator (Typ 3033, Fa. GFL, 10127199 C) bei einer Schüttelfrequenz von 100 min<sup>-1</sup> bebrütet.

#### 3.3.2.2 Zweite Versuchsphase

In der zweiten Versuchsphase wurde auf den Direktausstrich und die Anreicherung in GN-Bouillon verzichtet und nur noch die Anreicherung in mTSB-Bouillon, wie unter Punkt 3.3.2.1 erläutert, durchgeführt.

### 3.3.3 Immunomagnetische Separation (IMS)

Die IMS wurde mit Dynabeads<sup>®</sup> anti-*E. coli* O157 (Fa. Dynal, 701.04) nach Herstellerangaben durchgeführt. Diese superparamagnetischen Polystyrolpartikel sind mit Antikörpern gegen das O-Antigen 157 von *E. coli* beschichtet. Durch Anlegen eines magnetischen Feldes können die superparamagnetischen Partikel mit den an den Antikörpern gebundenen *E. coli* O157 aus dem Anreicherungsmedium selektiv gebunden werden. Durch Abpipettieren des Überstandes wird somit eine Aufkonzentration der gesuchten Mikroorganismen erreicht. Unspezifische Bindungen werden durch mehrmalige Waschschriffe minimiert. Der exakte Ablauf gestaltete sich wie folgt:

1 ml der vorangereicherten Probe wurden zusammen mit 20 µl Dynabeads<sup>®</sup> anti-*E. coli* O157 in ein Probengefäß (Multi Safe Seal Tubes, 1,7 ml tubes, Fa. peqlab Biotechnologie GmbH, 81-11510) pipettiert, dieses in eine Magnethalterung ver-

bracht (DynaL MPC<sup>®</sup>-M, Fa. Dynal, 120.09) und auf einem Sample-Mixer mit Rotor (DynaL Sample Mixer, Fa. Dynal, 159.02, Rotor: 159.05) für 10 min zur gründlichen Durchmischung bei Raumtemperatur inkubiert.

Im Anschluß an die initiale Inkubationsphase wurde die Magnethalterung mit den Probengefäßen vom Sample-Mixer abgenommen und die dazugehörige Magnetschiene eingeschoben. Die Halterung wurde vorsichtig in der Vertikalen um 180° und zurück gedreht, so daß die Probengefäße für einige Sekunden auf dem Kopf standen. Dieser Vorgang wurde nach einer und nach zwei Minuten wiederholt. Nach Ablauf von insgesamt drei Minuten wurde der Überstand in den Probengefäßen mit Hilfe einer Einmal-Pasteurpipette (Fa. Volac, Länge 230 mm, D 812) bis auf einen Rest von ca. 100 µl vorsichtig abpipettiert, wobei darauf zu achten war, daß die an der Gefäßwand magnetisch fixierten Dynabeads-Bakterien-Komplexe nicht abgeschwemmt wurden. Anschließend wurde der Magnetstreifen entfernt und die nun nicht mehr fixierten Beads-Bakterien-Komplexe mit jeweils 1 ml Waschpuffer (Phosphat Buffered Saline with Tween 20, pH 7,4, Fa. Sigma, P-3563) aufgeschwemmt. Nach gründlicher manueller Durchmischung wurde der Magnetstreifen erneut angebracht und die oben beschriebene dreiminütige Inkubationsphase mit dreimaligem Kippen der Halterung, Abpipettieren des Überstandes und Waschen mit Waschpuffer zweimal wiederholt, wobei jedoch beim Abpipettieren der gesamte Überstand entfernt wurde. Zum Schluß wurden die Beads-Bakterien-Komplexe in jeweils 100 µl Waschpuffer suspendiert und diese Suspension im Verdünnungsausstrich auf drei vorgetrocknete HC-Agarplatten, wie beim Direktausstrich unter Punkt 3.3.2 beschrieben, im Spatelverfahren ausgebracht.

### 3.3.4 Agglutination mit *E. coli* O157-Antiserum

HC-Agar enthält das Substrat Sorbit, welches typischerweise von *E. coli*-Stämmen fermentiert werden kann. Die dabei gebildete Säure führt zu einem Farbumschlag des enthaltenen pH-Indikators Bromkresolpurpur, so daß sich Sorbit-positive Mikroorganismen als gelbe Kolonien darstellen; Sorbit-negative Kolonien erscheinen nährbodenfarben durchscheinend lila. Das ebenfalls im Agar enthaltene Substrat 4-Methylumbelliferyl-β-D-Glucuronid (MUG) kann von den meisten *E. coli*-Stämmen mit Hilfe des Enzyms β-D-Glucuronidase zu dem fluorogenen Spaltprodukt 4-Methylumbelliferon umgesetzt werden. Kolonien von β-D-Glucuronidase-positiven Mikroorganismen zeigen also unter UV-Licht (366 nm) Fluoreszenz. Im Gegensatz zu der Mehrheit der *E. coli*-Stämme stellt sich der Serotyp O157:H7 auf diesem Nährmedium aber typischerweise Sorbit- und Glucuronidase-negativ dar, wohingegen Stämme des Serotyps O157:H<sup>-</sup> zu ca. 60 % Sorbit verwerten können. Um beide Serotypen zu erfassen, wurden bei der vorliegenden Arbeit pro Verdünnungsausstrich sowohl zehn Sorbit-positive, als auch (sofern vorhanden) zehn Sorbit-negative Kolonien ausgewählt und mittels *E. coli* O157 Latex-Test (Fa. Oxoid, DR 620) untersucht. Die Darstellung der Fluoreszenz erfolgte unter UV-Licht bei 366 nm (MinUVIS Analyselampe, Fa. DESAGA GmbH, 13 12 00).

Das Koloniematerial wurde in einen Tropfen des Latexreagenz eingerieben und eine mögliche Agglutination nach einer Minute beurteilt. Agglutinierende Kolonien wurden

auf PC-Agar (Fa. Merck, 1.05463) subkultiviert und für 24 h bei 37 °C aerob inkubiert. Zum Ausschluß von Autoagglutinationen wurden von dieser Subkultur drei bis vier Kolonien abgenommen, in 150 µl Aqua bidest. eingerieben und für zehn Minuten bei 100 °C im Wasserbad (Typ 3041, Fa. Köttermann KG) gekocht. Anschließend wurde mit dieser Suspension der *E. coli* O157 Latex-Test wiederholt.

### **3.4 Untersuchung der *Escherichia coli* O157-Isolate**

Bei allen Isolaten wurde die Spezieszugehörigkeit biochemisch bestätigt sowie Sorbit-Fermentation und  $\beta$ -D-Glucuronidase-Aktivität auf HC-Agar überprüft. Desweiteren wurden alle Isolate auf Verotoxin-Gen(e) und das „*E. coli* attaching and effacing“ (*eae*)-Gen untersucht.

Von jeder Fäzesprobe wurde mindestens ein Isolat willkürlich ausgewählt, bei dem die Serogruppenzugehörigkeit mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) bestätigt, das Hämolyse-Verhalten auf Blutagar überprüft, das H-Antigen mittels Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP) untersucht, sowie der Grad der genetischen Verwandtschaft über die Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) bestimmt wurde. Zeigten die Isolate einer Probe Unterschiede in der Koloniemorphologie, so wurde von jedem einzelnen Phänotyp ein Isolat für die erwähnten Untersuchungen herangezogen.

#### **3.4.1 Spezies-Bestätigung**

Die Zugehörigkeit der Isolate zur Spezies *E. coli* wurde über Wachstum und Fluoreszenzausprägung auf *Escherichia coli*-Direkt (ECD)-Agar und daran anschließenden Indol-Test bestätigt. Kolonien von *E. coli* zeigen unter UV-Licht bei 366 nm bläuliche Fluoreszenz und zeigen eine positive Indolreaktion (Nachweis der Tryptophanase). Da ca. 3 % der aus Lebensmitteln isolierbaren *E. coli*-Stämme jedoch Indol-negativ sind (BÜLTE und REUTER, 1989), wurden fluoreszierende, aber Indol-negative Kolonien weiter biochemisch über eine sogenannte „bunte Reihe“ in Form des kommerziell erhältlichen api 20E-Systems (Fa. bioMérieux, 20 100) untersucht.

##### **3.4.1.1 Koloniemorphologie auf *Escherichia coli*-Direkt-Agar und Indol-Test**

Von den auf PC-Agar vorliegenden Reinkulturen der gewonnenen Isolate wurde eine Kolonie auf ECD-Agar (Fa. Sifin, TN 1235) überimpft und der Nährboden aerob bei 37 °C für 24 h inkubiert.

Das Nährmedium enthält das Substrat 4-Methylumbelliferyl- $\beta$ -D-Glucuronid (MUG), das von dem durch *E. coli* produzierten Enzym  $\beta$ -D-Glucuronidase zu 4-Methylumbelliferon gespalten wird, welches bei 366 nm fluoresziert. Die gewachsenen Kolonien wurden also unter UV-Licht bei 366 nm (MinUVIS Analyselampe, DESAGA GmbH, 13 12 00) auf Fluoreszenz geprüft.

Im Anschluß daran wurden die Kolonien mit KovÁCS-Indolreagenz (Fa. Merck, 1.09293.0100) überschichtet und eine eventuelle Rotfärbung nach 10 Sekunden beurteilt. Das im Nährboden enthaltene Substrat Tryptophan wird von *E. coli* zu Brenztraubensäure, Ammoniak und Indol verstoffwechselt; letzteres bildet mit dem im KovÁCS-Reagenz enthaltenen 4-Dimethylaminobenzaldehyd einen roten Farbstoff.

Zur Überprüfung von Nährboden und KovÁCS-Indolreagenz wurden bei jedem Versuch *E. coli* ATCC 25922 als Positivkontrolle sowie *K. pneumoniae* als Negativkontrolle mitgeführt.

### 3.4.1.2 „Bunte Reihe“

Indol-negative Isolate wurden über das api 20E-System (Fa. bioMérieux, 20 100) weiter untersucht. Diese vorgefertigte „bunte Reihe“ enthält 21 Reaktionen, anhand derer Isolate der Familie Enterobacteriaceae biochemisch identifiziert werden können. Eine Einzelkolonie von PC-Agar wurde in 5 ml Aqua dest. suspendiert (MS 1 Minishaker, Fa. IKA, L 001500) und der Teststreifen gemäß Herstellerangaben beimpft. Inkubation (37 °C für 18-24 h) und Auswertung erfolgten ebenfalls gemäß Herstellerangaben. Anhand der aufgetretenen Farbumschläge läßt sich ein biochemisches Profil erstellen, das über die Datenbank des Herstellers einer oder mehrerer Spezies zugeordnet werden kann.

### 3.4.2 Bestätigung der Serogruppenzugehörigkeit

Zur Bestätigung der Serogruppenzugehörigkeit wurde aus jeder Probe mindestens ein Isolat ausgewählt (siehe Punkt 3.4) und mittels der von ABDULMAWJOOD und BÜLTE (2001) entwickelten PCR mit den Primern Gi O157 I/II untersucht; diese detektieren das *rffE*-Gen und weisen folgende Basensequenz auf:

Gi O157 I: 5`-ATT GCG CTG AAG CCT TTG-3`

Gi O157 II: 5`-CGA GTA CAT TGG CAT CGT G-3`

Das erhaltene DNA-Fragment umfaßt 500 Basenpaare (bp).

Bei jedem PCR-Gesamtansatz wurden zwei Positiv-Kontrollen (*E. coli* NCTC 12079 sowie *E. coli* EDL 933), eine Negativ-Kontrolle (*E. coli* C 600), sowie jeweils ein Leerwert für die Probenaufbereitung und den Mastermix mitgeführt.

### Aufbereitung der Template-DNA

Die Aufbereitung der Template-DNA erfolgte über die sogenannte Hitze-Lyse: Von PC-Agar wurden drei bis vier Einzelkolonien abgenommen, in 500 µl Aqua bidest. eingerieben und im Wasserbad (Typ 3041, Fa. Köttermann KG) zehn Minuten lang bei 100 °C gekocht. Sofort im Anschluß wurden die Probengefäße (1,6 ml mit Sicherheitsverschluß, Biozym Diagnostic GmbH, 710200) auf einem Reagenzglasschüttler durchmischt (MS 1 Minishaker, Fa. IKA, L 001500), auf Eis abgekühlt und erneut durchmischt. Anschließend erfolgte die Zentrifugation für zwei Minuten bei 14.000 rpm (Modell 5415 C, Fa. Eppendorf, 100.002).

### PCR-Ansatz

Der PCR-Ansatz wurde in einem PCR-Kabinett (UV-Chamber Typ 825-UCV/22, PlasLabs) vorgenommen. Nach dem vollständigen Auftauen der bei mindestens -18 °C gelagerten Reagenzien wurde der sogenannte „Mastermix“ hergestellt, für den pro Einzelansatz die nachfolgend aufgeführten Mengen an Reagenzien unter Auslassung der Template-DNA in der angegebenen Reihenfolge in ein Reaktionsgefäß (Multi Safe Seal Tubes, 1,7 ml tubes, Fa. peqlab Biotechnologie GmbH, 81-11510) pipettiert wurden:

Reagenz	Menge/Einzelansatz
Aqua bidest.	17,4 µl
Puffer (10 x PCR-Puffer mit 15 mM MgCl <sub>2</sub> , Fa. Applied Biosystems, N 808-0129)	2,5 µl
dNTP-Mix (each 10 mM) (siehe <a href="#">Anhang 10.1.1.1</a> )	0,5 µl
Primer Gi O157 I/II (10 µM) (GIBCO BRL)	je 1,0 µl
Polymerase (5 U/µl) (AmpliTaq <sup>®</sup> DNA Polymerase, Fa. Applied Biosystems, N 808-0152)	0,1 µl
Template-DNA	2,5 µl
Gesamtmenge/Einzelansatz	25,0 µl

Der so hergestellte Mastermix wurde anschließend in Portionen von 22,5 µl in PCR-Gefäße (Multiply<sup>®</sup>-Pro Gefäß, 0,2 ml, PP, Fa. Sarstedt, 72.737.002) überführt und die jeweilige Template-DNA dazupipettiert. Anschließend wurden die PCR-Ansätze unverzüglich in den Thermocycler (Gene Amp PCR-System 9600, Fa. Perkin Elmer, N 801-0002) verbracht.

### Thermocycler-Programm

Die Amplifikation der Ziel-DNA erfolgte nach folgendem Programm:

initiale Denaturierung	94 °C	5 min	
Denaturierung	94 °C	15 s	} 30 Zyklen
Annealing	60 °C	15 s	
Extension	72 °C	30 s	
finale Extension	72 °C	5 min	

Nach Beendigung des Programms wurden die Ansätze im Thermocycler bei einer Temperatur von 4 °C gehalten.

### Darstellung der Amplifikate

Die erhaltenen Amplifikate wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese und Ethidiumbromidfärbung dargestellt.

Zur Herstellung des Gels wurden 1,5 % Agarose (Q-Biogene, AGAH 0500 [AGAH 03-130022]) in 1 x TBE-Puffer (siehe [Anhang 10.1.1.2](#)) aufgeköcht (Mikrowelle Dimension 4, Fa. Panasonic), im Wasserbad (Typ 3041, Fa. Köttermann KG) auf 50 °C abgekühlt und auf einem Gelträger (Blue Marine 200 BM 200/2, Fa. Serva Feinbiochemica GmbH & Co. KG) bei Raumtemperatur erstarren lassen. Die Amplifikate wurden mit 6,25 µl Gel-Loading-Buffer (siehe [Anhang 10.1.1.3](#)) vermischt; 8 µl davon wurden in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte bei 5 V/cm für 1,5 h in einer Horizontalgelkammer (Blue Marine 200 BM 200/2, Fa. Serva Feinbiochemica GmbH & Co. KG; Power Supply: PS 250, Fa. Hoefer Scientific Instruments), die mit 1 x TBE-Puffer als Laufpuffer gefüllt war. Als Molekulargewichtstandard dienten Marker XIII (Fa. Roche Diagnostic GmbH, 1721925) und Marker XIV (Fa. Roche Diagnostic GmbH, 1721933).

Die Färbung des Gels erfolgte für 20 min in Ethidiumbromid-Lösung (siehe [Anhang 10.1.1.4](#)) auf einem Horizontalschüttler (HS 500, Fa. IKA-Werk, Janke & Kunkel GmbH & Co. KG). Nicht gebundenes Ethidiumbromid wurde anschließend 10 min lang in destilliertem Wasser auf dem Horizontalschüttler ausgewaschen. Die Darstellung der Amplifikate erfolgte unter UV-Licht bei 302 nm auf einem Transilluminator (Mighty Bright UVTM 25 230 V, Fa. Hoefer Scientific Instruments) und wurde photographisch dokumentiert (Gerät: Polaroid Instant Camera System, Polaroid MP4<sup>+</sup>, Modell 44-16; Film: Schwarzweiß-Sofort-Packfilm, Typ 667; beides Fa. Polaroid).

### 3.4.3 Untersuchung auf Virulenzgene

#### 3.4.3.1 Verotoxin-Gen(e)

Der Nachweis von Verotoxin-Genen (*vtx*) erfolgte mithilfe der Primer MK1/MK2 nach KARCH und MEYER (1989). Diese degenerierten Primer erlauben den Nachweis sowohl des Verotoxin 1-Gens (*vtx 1*), als auch des Verotoxin 2-Gens (*vtx 2*) sowie dessen Varianten *vtx 2c*, *vtx 2d*, *vtx 2e* und *vtx 2g* (SCHMIDT et al., 2000; LEUNG et al., 2003). Die Amplifikatlänge beträgt 227 bp bzw. 224 bp. Die Basensequenz der Primer lautet wie folgt:

MK1: 5`-TTT ACG ATA GAC TTC TCG AC-3`

MK2: 5`-CAC ATA TAA ATT ATT TCG CTC-3`

Bei jedem PCR-Ansatz wurden *E. coli* NCTC 12079 und/oder *E. coli* EDL 933 als Positivkontrolle, *E. coli* C 600 oder *E. coli* ATCC 25922 als Negativkontrolle, sowie ein Leerwert des Mastermixes mitgeführt.

#### Aufbereitung der Template-DNA

Die Aufbereitung der DNA erfolgte wie unter Punkt 3.4.2 beschrieben.

#### PCR-Ansatz

Der Mastermix wurde im PCR-Kabinett nach folgendem Pipettierprotokoll (ohne Template-DNA) in der angegebenen Reihenfolge hergestellt:

Reagenz	Menge/Einzelansatz
Aqua bidest.	17,4 µl
Puffer (10 x PCR-Puffer mit 15 mM MgCl <sub>2</sub> , Fa. Applied Biosystems, N 808-0129)	2,5 µl
dNTP-Mix (each 10 mM) (siehe <a href="#">Anhang 10.1.1.1</a> )	0,5 µl
Primer MK 1/2 (25 µM) (TIB MOLBIOL Syntheselabor)	je 1,0 µl
Polymerase (5 U/µl) (AmpliTaq <sup>®</sup> DNA Polymerase, Fa. Applied Biosystems, N 808-0152)	0,1 µl
Template-DNA	2,5 µl
Gesamtmenge/Einzelansatz	25,0 µl

Der so hergestellte Mastermix wurde anschließend in Portionen von 22,5 µl in PCR-Gefäße (Multiply<sup>®</sup>-Pro Gefäß, 0,2 ml, PP, Fa. Sarstedt, 72.737.002) überführt und die jeweilige Template-DNA dazupipettiert. Anschließend wurden die PCR-Ansätze unverzüglich in den Thermocycler (Touch Down<sup>™</sup> Temperature Cycling System, Fa. Hybaid Limited, mit Touch Down Subambient Control Module with 0,2 ml Block, HB-TD-CMO2S-220/110) verbracht.

### Thermocycler-Programm

Die Amplifikation der Ziel-DNA erfolgte zu Beginn der Versuche nach folgendem Programm:

initiale Denaturierung	94 °C	5 min	
Denaturierung	94 °C	30 s	} 30 Zyklen
Annealing	43 °C	30 s	
Extension	72 °C	30 s	
finale Extension	72 °C	5 min	

Während der hier beschriebenen Arbeit wurde diese PCR von der Laborleitung optimiert (ABDULMAWJOOD, 2000, persönliche Mitteilung); die daraus resultierende modifizierte Annealing-Temperatur wurde daraufhin auch für die hier dargestellten Versuche übernommen:

initiale Denaturierung	94 °C	5 min	
Denaturierung	94 °C	30 s	} 30 Zyklen
Annealing	55 °C	30 s	
Extension	72 °C	30 s	
finale Extension	72 °C	5 min	

Nach Beendigung des Programms wurden die Ansätze im Thermocycler bei einer Temperatur von 4 °C gehalten.

### Darstellung der Amplifikate

Agarose-Gelelektrophorese und Ethidiumbromidfärbung erfolgten gemäß der Beschreibung unter Punkt 3.4.2, allerdings wurden hier pro Probe 10 µl Amplifikat-Gel-Loading-Buffer-Gemisch auf das Gel aufgetragen.

### 3.4.3.2 *E. coli* attaching and effacing-Gen

Der Nachweis des *E. coli* attaching and effacing (*eae*)-Gens erfolgte mithilfe der Primer SK1/SK2 nach SCHMIDT et al. (1994b). Die Amplifikatlänge beträgt 863 bp, die Basensequenz der Primer lautet wie folgt:

SK1: 5`-CCC GAA TTC GGC ACA AGC ATA AGC-3`

SK2: 5`-CCC GGA TCC GTC TCG CCA GTA TTC G-3`

Auch hier wurden die bereits genannten Positiv- (*E. coli* NCTC 12079 und/oder *E. coli* EDL 933) und Negativkontrollen (*E. coli* C 600 oder *E. coli* ATCC 25922) sowie der Mastermix-Leerwert mitgeführt.

#### Aufbereitung der Template-DNA

Die Aufbereitung der DNA erfolgte wie unter Punkt 3.4.2 beschrieben.

#### PCR-Ansatz

Der Mastermix wurde im PCR-Kabinett nach folgendem Pipettierprotokoll (ohne Template-DNA) in der angegebenen Reihenfolge hergestellt:

Reagenz	Menge/Einzelansatz
Aqua bidest.	17,1 µl
Puffer (GeneAmp 10 x PCR-Buffer I mit 15 mM MgCl <sub>2</sub> , Fa. Applied Biosystems, N 808-0242)	2,5 µl
dNTP-Mix (each 10 mM) (siehe <a href="#">Anhang 10.1.1.1</a> )	0,5 µl
Primer SK1/2 (30 µM) (TIB MOLBIOL Syntheselabor)	je 1,0 µl
Polymerase (5 U/µl) (AmpliTaq Gold™, Fa. Applied Biosystems, N 808-0242)	0,4 µl
Template-DNA	2,5 µl
Gesamtmenge/Einzelansatz	25,0 µl

Jeweils 22,5 µl des Mastermixes wurden in PCR-Gefäße überführt und die entsprechende Template-DNA dazugegeben. Anschließend wurden die PCR-Ansätze unverzüglich in den Thermocycler (TRIO-Thermoblock, Fa. Biometra biomedizinische Analytik GmbH, 050-000; mit Heizdeckel-Set, Trio HD-Netzteil, 050-005) verbracht.

### Thermocycler-Programm

Die Amplifikation der Ziel-DNA erfolgte nach folgendem Programm:

initiale Denaturierung	95 °C	7 min	
Denaturierung	95 °C	30 s	} 30 Zyklen
Annealing	52 °C	60 s	
Extension	72 °C	40 s	
finale Extension	72 °C	5 min	

### Darstellung der Amplifikate

Agarose-Gelelektrophorese und Ethidiumbromidfärbung erfolgten gemäß der Beschreibung unter Punkt 3.4.3.1.

#### 3.4.4 Nachweis des Enterohämolyins

Zur Beurteilung des Hämolyse-Verhaltens wurden ausgewählte Isolate mittels Stichkultur auf Enterohämolysin-Agar (BEUTIN et al., 1988) überimpft und bei 37 °C aerob bebrütet. Eine durch das klassische  $\alpha$ -Hämolysin hervorgerufene Lyse kann nach dreistündiger Inkubationszeit abgelesen werden. Die durch Enterohämolysin verursachte Hämolysezone, die sich schmaler und trüber darstellt, erscheint erst nach 24-stündiger Inkubation. Der Nährboden ist wie folgt zusammengesetzt:

Tryptose-Blutagar-Basis (Fa. Difco, 223220)	33 g
gewaschene Schafbluterythrozyten (Fa. Oxoid, SR0051C)	5 %
CaCl <sub>2</sub> (Fa. Merck, 2382)	10 mM
Aqua dest.	ad 1000 ml

Als Positivkontrolle für die  $\alpha$ -Hämolysinbildung wurde *E. coli* ATCC 25922, als Kontrollstamm für die Enterohämolyse wurde *E. coli* NCTC 12079 verwendet.

#### 3.4.5 Untersuchung des H-Antigens

Zur Feststellung, ob es sich bei den *E. coli* O157-Isolaten um den besonders in Zusammenhang mit humanen Erkrankungsfällen in Erscheinung getretenen Serotyp *E. coli* O157:H7 handelt, wurde ein von FIELDS et al. (1997) entwickelter Restriktions-

Fragment-Längen-Polymorphismus-Test (RFLP) eingesetzt. Mittels PCR wird ein Teil des Flagellin-Gens *fliC*, welches für das H-Antigen codiert, amplifiziert und dieses Amplifikat einem Restriktionsverdau mit dem Restriktionsenzym *Rsa I* unterzogen. *E. coli* O157:H7-Stämme zeigen dabei ein typisches Muster, welches sich von allen anderen Serotypen unterscheidet.

Zur Amplifikation der Ziel-DNA wurden die folgenden Primer eingesetzt:

F-FLIC1: 5`-ATG GCA CAA GTC ATT AAT ACC CAA C-3`

R-FLIC2: 5`-CTA ACC CTG CAG CAG AGA CA-3`

Je nach Typ des H-Antigens umfaßt das entstehende Amplifikat 1.300-2.600 bp; bei *E. coli* O157:H7 beträgt seine Länge 1.800 bp.

Bei jedem PCR-Gesamtansatz wurden zwei Positiv-Kontrollen (*E. coli* NCTC 12079 sowie *E. coli* EDL 933), sowie jeweils ein Leerwert für die Probenaufbereitung und den Mastermix mitgeführt.

### **Aufbereitung der Template-DNA**

Von PC-Agar wurden drei bis vier Einzelkolonien abgenommen, in 110 µl Aqua bidest. eingerieben und im Wasserbad (Typ 3041, Fa. Köttermann KG) zehn Minuten lang bei 100 °C gekocht. Sofort im Anschluß wurden die Probengefäße (1,6 ml, mit Sicherheitsverschluß, Fa. Biozym Diagnostic GmbH, 710200) auf einem Reagenzglasschüttler durchmischt (MS 1 Minishaker, Fa. IKA, L 001500), auf Eis abgekühlt, und erneut durchmischt. Anschließend erfolgte die Zentrifugation für 15 s bei 14.000 rpm (Centrifuge 5415 C, Fa. Eppendorf). 90 µl des Überstandes wurden in einem neuen Probengefäß mit 10 µl NaClO<sub>4</sub> (5 M, Fa. Fluka, 13455) sowie 50 µl Isoopropanol (Fa. Merck, 963.4) vermischt und für 5-10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 20 min bei 14.000 rpm. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und verworfen. Zum Pellet wurden 375 µl Ethanol (70 %, Fa. Quambusch) zugegeben, erneut bei 14.000 rpm für 5 min zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgesaugt und verworfen. Das Pellet wurde für 5-10 min im Exsikkator (Chemie-Hybrid-Pumpe, Typ RC-4, sowie Membran-Pumpe, Typ MZ 2C, beides Fa. Vacuubrand GmbH & Co.) getrocknet und anschließend in 30-50 µl Aqua bidest. resuspendiert.

### **PCR-Ansatz**

Die Rahmenbedingungen für den PCR-Ansatz wurden bereits unter Punkt 3.4.2 beschrieben. Das Pipettierprotokoll lautete wie folgt:

Reagenz	Menge/Einzelansatz
Aqua bidest.	36,1 µl
Puffer (GeneAmp 10 x PCR Gold Buffer, Fa. Applied Biosystems, 4311806)	5,0 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM) (Fa. Applied Biosystems, 4311806)	3,0 µl
dNTP-Mix (each 10 mM) (siehe <u>Anhang 10.1.1.1</u> )	1,0 µl
Primer F-FLIC1/R-FLIC2 (10 µM) (MWG-Biotech AG)	je 1,0 µl
Polymerase (5 U/µl) (AmpliTaq Gold <sup>®</sup> DNA Polymerase, Fa. Applied Biosystems, 4311806)	0,4 µl
Template-DNA	2,5 µl
Gesamtmenge/Einzelansatz	50,0 µl

Der so hergestellte Mastermix wurde anschließend in Portionen von 47,5 µl in PCR-Gefäße (MultiPLY<sup>®</sup>-Pro Gefäß, 0,2 ml, PP, Fa. Sarstedt, 72.737.002) überführt und 2,5 µl der jeweiligen Template-DNA dazupipettiert. Anschließend wurden die PCR-Ansätze unverzüglich in den Thermocycler (Touch Down<sup>™</sup> Temperature Cycling System, Fa. Hybaid Limited, mit Touch Down Subambient Control Module with 0,2 ml Block, HB-TD-CMO2S-220/110) verbracht.

### Thermocycler-Programm

Die Amplifikation der Ziel-DNA erfolgte nach folgendem Programm:

initiale Denaturierung	95 °C	6 min	
Denaturierung	95 °C	30 s	} 35 Zyklen
Annealing	60 °C	60 s	
Extension	72 °C	120 s	
finale Extension	72 °C	5 min	

Nach Beendigung des Programms wurden die Ansätze im Thermocycler bei einer Temperatur von 4 °C gehalten. Bis zur Darstellung der Amplifikate im Elektrophorese-Gel wurden sie für maximal 24 Stunden bei 4-8 °C gelagert.

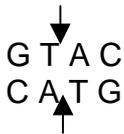
### Darstellung der Amplifikate

Die Herstellung des Agarose-Gels sowie die Elektrophorese erfolgten wie unter Punkt 3.4.2 beschrieben. 8 µl des Amplifikats wurden mit 2 µl Gel-Loading-Buffer auf Parafilm® M (Fa. Merck, 291F1213) vermischt und in die Geltaschen pipettiert. Als Molekulargewichtsstandard diente Marker XIV.

Ethidiumbromidfärbung und fotografische Dokumentation des Gels erfolgten wie unter Punkt 3.4.2 beschrieben. Die Amplifikate wurden bis zum Restriktionsverdau bei 4-8 °C gelagert.

### Restriktionsverdau

Der Restriktionsverdau erfolgte mit dem Restriktionsenzym *Rsa* I (Fa. Roche Diagnostic GmbH, 729 132), welches folgende Basensequenz erkennt und schneidet:



Der Ansatz des sogenannten Mastermixes (ohne Amplifikat) erfolgte in einem PCR-Kabinett in der angegebenen Reihenfolge nach folgendem Pipettierprotokoll:

Reagenz	Menge/Einzelansatz
Aqua bidest.	7,5 µl
Puffer (SuRE/Cut Buffer L for Restriction Enzymes (10 x), Fa. Roche Diagnostic GmbH, 1 417 975)	2,0 µl
Enzym <i>Rsa</i> I (10 U/µl) (Fa. Roche Diagnostic GmbH, 729 132)	0,5 µl
Amplifikat	10,0 µl
Gesamtmenge/Einzelansatz	20,0 µl

Der Mastermix wurde in Portionen von jeweils 10 µl zu 10 µl des entsprechenden Amplifikats pipettiert und für eine Stunde bei 37 °C (Wasserbad Typ 3041, Fa. Köttermann KG) inkubiert.

### Darstellung der Restriktionsmuster

Die erhaltenen Restriktionsmuster wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese und Ethidiumbromidfärbung dargestellt.

Zur Herstellung des Gels wurden 2,0 % Agarose (Q-Biogene, AGAH 0500) in 1 x TBE-Puffer (siehe [Anhang 10.1.1.2](#)) aufgeköcht, im Wasserbad (Typ 3041, Fa. Köttermann KG) auf 50 °C abgekühlt und auf einem Gelträger bei Raumtemperatur erstarren gelassen. Die Amplifikate wurden mit 5 µl Gel-Loading-Buffer vermischt

und 13 µl davon auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 3-4 V/cm für ca. 2 h in einer Horizontalgelkammer, die mit 1 x TBE-Puffer als Laufpuffer gefüllt war. Als Molekulargewichtstandard diente Marker XIII.

Färbung und photographische Dokumentation des Gels erfolgten nach der Beschreibung unter Punkt 3.4.2.

### **3.4.6 Untersuchung der genetischen Verwandtschaft mittels Pulsfeldgelelektrophorese (DNA-Fingerprinting)**

Um den Grad der genetischen Verwandtschaft und eventuelle klonale Beziehungen innerhalb der isolierten *E. coli* O157-Stämme zu ermitteln, wurden von den nach Punkt 3.4 ausgewählten Isolaten mittels Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) ein DNA-„Fingerprint“ erstellt. Dabei wird die gesamte bakterielle DNA mithilfe eines Restriktionsenzym verdaut und das entstehende Bandenmuster elektrophoretisch dargestellt.

Um Präparationsschäden an dieser hochmolekularen DNA zu verhindern, ist ein besonders vorsichtiges Vorgehen und eine vorherige Einbettung in Agarose notwendig. Außerdem erfordert diese umfangreiche DNA-Menge den Einsatz von seltenschneidenden Restriktionsenzymen, sogenannten „rare cutters“, da ansonsten zu viele DNA-Fragmente entstünden und kein klar erkennbares Bandenmuster resultieren könnte. Die entstehenden DNA-Fragmente lassen sich jedoch aufgrund ihrer Größe nicht durch eine herkömmliche Elektrophorese auftrennen. Dies wird erst durch das Anlegen eines alternierenden elektrischen Feldes, also durch die Pulsfeldgelelektrophorese möglich, denn die Reorientierungsgeschwindigkeit der DNA beim Wechsel der Feldrichtung ist abhängig von ihrer Fragmentlänge.

Die nachstehend beschriebene Vorgehensweise erfolgte in Anlehnung an MIRANDA et al. (1991).

#### **Anzucht und Waschschrte**

Von PC-Agar wurde eine Einzelkolonie abgenommen und eine Übernachtskultur in 5 ml Trypton-Soja-Bouillon (TSB) bei 37 °C angelegt.

Jeweils 2 x 2 ml der Übernachtskultur wurden nach Durchmischung auf einem Reagenzglasschüttler (MS 1 Minishaker, Fa. IKA, L 001500) in Reaktionsgefäße (Fa. Sarstedt, 2,0 ml, 72.695) abgefüllt und für 30 min auf 4-8 °C abkühlen gelassen. Anschließend wurden die Reaktionsgefäße in einer Kühlzentrifuge (Centrifuge 5403, Fa. Eppendorf) bei 4 °C für 6 min bei 10.000 rpm zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Sediment in jeweils 1,9 ml des auf 4-8 °C gekühlten TE-Puffers (siehe [Anhang 10.1.2.1](#)) mithilfe eines Reagenzglasschüttlers (MS 1 Minishaker, Fa. IKA, L 001500) aufgelöst. Dieser Waschschrte mit Zentrifugation, Verwerfen des Überstandes und Resuspension des Pellets in TE-Puffer wurde zweimal wiederholt; wobei jedoch beim letzten Mal auf die Zugabe von TE-Puffer verzichtet wurde. Während der gesamten Prozedur wurden die gerade nicht bearbeiteten Reaktionsgefäße in einem Kühlblock (Fa. Eppendorf, 3880 001.166) belassen.

### **Einstellung der Zelldichte**

Die Standardisierung der Zelldichte erfolgte photometrisch bei 620 nm (Hitachi U-2000 Spectrophometer, Fa. Hitachi, 121-0005 und 121-0120) auf eine Transmission von  $5,0 \pm 0,2$  %. Die standardisierte Suspension wurde entweder sofort weiter verarbeitet oder bei mind.  $-18$  °C tiefgefroren.

### **Einbettung in Agaroseblöckchen**

Zur Herstellung der Agaroseblöckchen wurde 1,5 % InCert-Agarose (Fa. Bio-Whittaker Molecular Applications, 850121) in TE-Puffer aufgekocht und danach im Wasserbad (Thermomixer 5436, Fa. Eppendorf) auf 56 °C abgekühlt. Anschließend wurde sie im Verhältnis 1:1 mit der auf Raumtemperatur gebrachten Bakterien-suspension unter Vermeidung von Blasenbildung vermischt, zügig in den Gießblock (Disposable Plug Mold, Inhalt 100 µl, Fa. Bio-Rad, 170-3713) pipettiert und zum Erstarren für 10 min im Kühlschrank bei 4-8 °C gelagert.

### **Lyse**

Zum Aufschluß der Bakterienzellen wurden die auspolymerisierten Agaroseblöckchen in jeweils 200 µl Lysispuffer (siehe [Anhang 10.1.2.2](#)) unter Zusatz von 1,15 mg Lysozym (130.000 U/mg, Fa. Boehringer Mannheim, 1243004) überführt und über Nacht bei 37 °C im Wasserbad (GFL 1002, Fa. Gesellschaft für Labor-technik) inkubiert.

### **Deproteinisierung und Waschschrte**

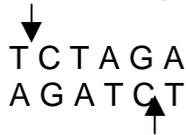
Pro Agaroseblöckchen wurden 10 µl Proteinase-K-Lösung (15,6 mg/ml, Fa. Roche Diagnostic GmbH, 1373 196) auf den Lysisansatz pipettiert und für 24 h bei 56 °C im Wasserbad (GFL 1002, Fa. Gesellschaft für Labortechnik) inkubiert.

Vor Zugabe des Restriktionsenzym muß die Proteinase K inaktiviert werden, um einen Abbau der Restriktionsendonuklease zu verhindern. Zu diesem Zweck werden nach Entfernung der Deproteinisierungslösung zwei Waschschrte mit TE-Puffer durchgeführt. Dazu werden die Agarose-Blöckchen mit jeweils 200 µl TE-Puffer versetzt; nach 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wird dieser entfernt und die Prozedur wiederholt. Im Anschluß erfolgen zwei Waschschrte mit Phenylmethylsulfonylfluorid-Lösung (PMSF) (siehe [Anhang 10.1.2.3](#)) zur Inaktivierung der Proteinase K. Pro Blöckchen werden 200 µl TE-Puffer mit 2 µl PMSF-Lösung zugegeben und nach einstündiger Inkubation bei 56 °C im Wasserbad (GFL 1002, Fa. Gesellschaft für Labortechnik) wieder entfernt. Nach Wiederholung des Vorgangs erfolgen erneut zwei Waschschrte mit reinem TE-Puffer wie bereits beschrieben.

Erfolgte die Weiterverarbeitung nicht direkt im Anschluß, wurden die Agarose-Blöckchen in je 1 ml TE-Puffer bei 4-8 °C bis zu 2 Wochen gelagert.

### Restriktionsverdau

Zur Anwendung kam das Restriktionsenzym *Xba* I (Fa. Roche Diagnostic GmbH, 674 265), welches folgende Basensequenz erkennt und schneidet:



Der Ansatz des sogenannten Mastermixes erfolgte in einem PCR-Kabinett in der angegebenen Reihenfolge nach folgendem Pipettierprotokoll:

Reagenz	Menge/Einzelansatz
Aqua bidest.	176,5 µl
Puffer (SuRE/Cut Buffer H for Restriction Enzymes (10 x) Fa. Roche Diagnostic GmbH, 1 417 991)	20,0 µl
Enzym <i>Xba</i> I (10 U/µl) (Fa. Roche Diagnostic GmbH, 674 265)	3,5 µl
Gesamtmenge/Einzelansatz	200,0 µl

Die Agarose-Blöckchen wurden über Nacht bei 37 °C im Wasserbad (GFL 1002, Fa. Gesellschaft für Labortechnik) in jeweils 200 µl Restriktionsansatz inkubiert.

### Vorbereitung des Gels für die Pulsfeldgelelektrophorese

Zur Herstellung des Gels wurden 1,1 % Agarose (Pulsed Field Certified Agarose, Fa. Bio-Rad Laboratories, 162-0137) in 120 ml 0,5 x TBE-Puffer (siehe [Anhang 10.1.2.4](#)) aufgekocht (Mikrowelle Dimension 4, Fa. Panasonic) und auf einem Magnetrührer (Magnetrührer RCT B, Fa. Jahnke & Kunkel, IKA Labortechnik, 823484) unter Vermeidung von Blasenbildung auf 56 °C abgekühlt. 2 ml des flüssigen Gels wurden abgenommen und bis zur Weiterverwendung bei 56 °C (Thermomixer 5436, Fa. Eppendorf) aufbewahrt. Die verbleibende Gelmasse wurde in den mit 70 %igem Ethanol gereinigten und streng waagrecht ausgerichteten Gelträger gegossen und zur Auspolymerisation für 20 Minuten bei Raumtemperatur sowie für weitere 10 Minuten bei 4-8 °C stehen gelassen.

Nach Beschickung der Geltaschen mit den Agarose-Blöckchen sowie zwei DNA-Größenmarkern (Lambda Ladder PFG-Marker, N0340S, 50-1.000 kb, sowie Low Range PFG-Marker, N0350S, 0,1-200 kb, beide New England Biolabs) wurden die Geltaschen mit der restlichen, bei 56 °C gelagerten Agarose verschlossen. Nach Erstarrung wurde das Agarose-Gel in die streng waagrecht ausgerichtete Elektrophorese-Kammer (CHEF-DR-TM II-System, Bio-Rad Labs, 170-3612-3729) gebracht; als Laufpuffer diente 0,5 x TBE-Puffer.

### Parameter der Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)

Die PFGE wurde nach folgenden Bedingungen durchgeführt, wobei zwei verschiedene Programme nacheinander zum Einsatz kamen:

	<u>Block I</u>	<u>Block II</u>
Temperatur:	14 °C	14 °C
Spannung:	6 V/cm	6 V/cm
Pulszeiten:	5-20 s	20-50 s
Dauer:	10 h	13 h

### Darstellung der Restriktionsmuster

Nach einer Ethidiumbromidfärbung gemäß der Beschreibung unter Punkt 3.4.2 erfolgte die zweifache fotografische Dokumentation nach 30-minütiger sowie nach einstündiger Auswaschphase, ebenfalls wie unter Punkt 3.4.2 dargestellt.

### Auswertung

Die Auswertung erfolgte mithilfe des Computerprogramms GelCompar 4.0 (Fa. Applied Maths, Kortrijk, Belgien). Die Ähnlichkeit der erhaltenen Restriktionsmuster wurde mittels DICE-Koeffizient berechnet. Dieser „band matching“-Koeffizient beruht auf der Erfassung übereinstimmender Banden, d. h. Fragmente gleicher Größe, der zu vergleichenden Muster. Lediglich das Vorhandensein bzw. Nicht-Vorhandensein korrespondierender Banden wird zur Auswertung herangezogen; die Breite der Banden bleibt dabei unberücksichtigt. Der DICE-Koeffizient berechnet sich nach folgender Formel:

$$s_D = \frac{2 n_{XY}}{n_X + n_Y}$$

$s_D$ : DICE-Koeffizient

$n_{XY}$ : Anzahl der gemeinsamen Banden zweier zu vergleichender Restriktionsmuster X und Y

$n_X$ : Anzahl der Banden des Restriktionsmusters X

$n_Y$ : Anzahl der Banden des Restriktionsmusters Y

Zur Berechnung herangezogen wurden alle Banden ab einer Fragmentgröße von mindestens 48,5 kb.

Zur Veranschaulichung der Verwandtschaftsgrade der untersuchten Isolate wurden die Ähnlichkeitsgrade der jeweiligen Makrorestriktionsmuster in Form eines Dendrogramms dargestellt. Dabei erfolgte die Clusterbildung über den „unweighted-pair-group matching by arithmetic averages“-Algorithmus (UPGMA).

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 Kultureller Nachweis von *E. coli* O157

#### 4.1.1 Vergleich der eingesetzten Untersuchungsmethoden der ersten Versuchsphase

Von den 51 untersuchten Proben konnten aus 34 Proben (66,7 %) *E. coli* O157-Stämme isoliert werden; insgesamt handelte es sich um 228 Isolate.

In Abbildung 6 sind die Nachweishäufigkeiten nach den eingesetzten Untersuchungsmethoden aufgeschlüsselt.

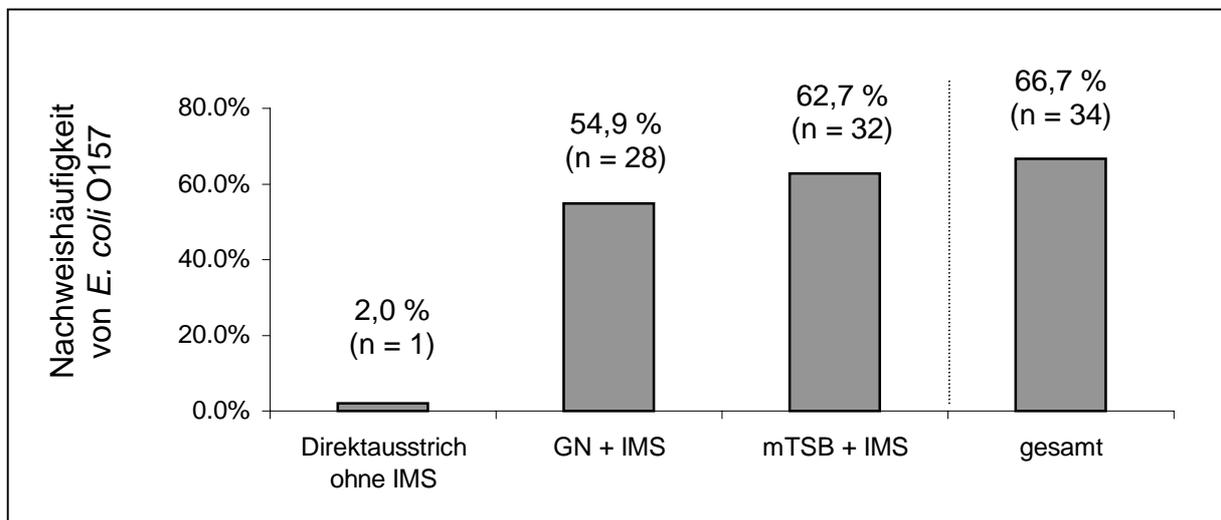


Abbildung 6: Nachweis von *E. coli* O157-Stämmen in Pferdekotproben (n = 51) durch Direktausstrich ohne immunomagnetische Separation (IMS) sowie nach Anreicherung in gram negative broth (GN) bzw. modifizierter Trypton-Soja-Bouillon (mTSB), jeweils mit anschließender IMS, im Vergleich zur Gesamtnachweishäufigkeit; n = absolute Zahlen

Da mit der Anreicherung in mTSB-Bouillon und anschließender IMS die höchste Nachweisrate erzielt werden konnte, wurde diese Untersuchungsvariante in der nachfolgenden zweiten Versuchsphase ausschließlich eingesetzt.

#### 4.1.2 Ergebnisse der zweiten Versuchsphase

In der zweiten Versuchsphase wurden 49 Pferdekotproben untersucht. Aus 27 Proben (55,1 %) konnten *E. coli* O157-Stämme isoliert werden; insgesamt handelte es sich um 101 Isolate.

Faßt man die Ergebnisse der beiden Versuchsabschnitte zusammen, so konnten aus 61 der 100 untersuchten Pferdekotproben insgesamt 329 *E. coli* O157-Stämme gewonnen werden (siehe Tabelle 42).

Tabelle 42: Ergebnisse der Untersuchung von Pferdekotproben (n = 100) auf *E. coli* O157

Versuchsphase	Anzahl untersuchter Proben	Anzahl positiver Proben (%)	Anzahl gewonnener <i>E. coli</i> O157-Isolate
1. Versuchsphase	51	34 (66,7)	228
2. Versuchsphase	49	27 (55,1)	101
<b>gesamt</b>	<b>100</b>	<b>61 (61,0)</b>	<b>329</b>

## 4.2 Untersuchung der *E. coli* O157-Isolate

### 4.2.1 Spezies-Bestätigung und biochemische Charakterisierung

Alle Isolate zeigten auf ECD-Agar ein typisches Wachstum (erhabene, runde, cremig-weiße, feucht-glänzende Kolonien) und unter UV-Licht bei 366 nm bläuliche Fluoreszenz. Nach Überschichtung mit Kovács-Reagenz färbte sich dieses bei 305 der 329 Isolate (92,7 %) innerhalb von 10 Sekunden kirschrot. Die restlichen 24 Isolate (7,3 %) erwiesen sich als Indol-negativ. Mindestens eines dieser Isolate jeder Probe wurde über das api 20E-System weiter untersucht (n = 13); fanden sich in einer Probe mehrere Indol-negative Stämme mit unterschiedlicher Koloniemorphologie, so wurde je ein Isolat jeder Phänotyp-Gruppe mittels api 20E-System untersucht. Auch über diese „bunte Reihe“ biochemischer Reaktionen konnte keine eindeutige Speziesbestimmung vorgenommen werden. Die erhaltenen biochemischen Profile führten zu folgenden taxonomischen Zuordnungen:

#### Profil 1 (5 Isolate)

<i>E. coli</i> 1	56,2 %
<i>K. pneumoniae</i> ssp. <i>ozaenae</i>	24,4 %
<i>E. coli</i> 2	13,7 %

#### Profil 2 (7 Isolate)

<i>K. pneumoniae</i> ssp. <i>ozaenae</i>	49,2 %
<i>E. coli</i> 2	32,8 %

Profil 3 (1 Isolat)

<i>Ent. intermedius</i>	42,8 %
<i>E. coli</i> 1	27,2 %
<i>Kluyvera</i> spp.	14,8 %
<i>Citrobacter freundii</i>	13,1 %

Auf HC-Agar zeigten alle 329 isolierten Stämme  $\beta$ -D-Glucuronidase-Aktivität; 205 Isolate (62,3 %) fermentierten Sorbit. Eine ausführliche Darstellung der aus den einzelnen Proben gewonnenen Isolate findet sich in Anhang 10.2, Tabellen 45 und 46.

#### 4.2.2 Bestätigung der Serogruppenzugehörigkeit

Mindestens ein Isolat aus jeder Probe (s. Kapitel 3.4), das im *E. coli* O157-Latextest positiv reagierte, wurde zusätzlich über PCR auf die Zugehörigkeit zur Serogruppe O157 untersucht. Bei allen 92 untersuchten Stämmen konnte so die phänotypisch ermittelte Serogruppenzugehörigkeit auch genotypisch bestätigt werden. In Abbildung 7 ist beispielhaft das gelelektrophoretische Ergebnis eines solchen PCR-Ansatzes dargestellt.

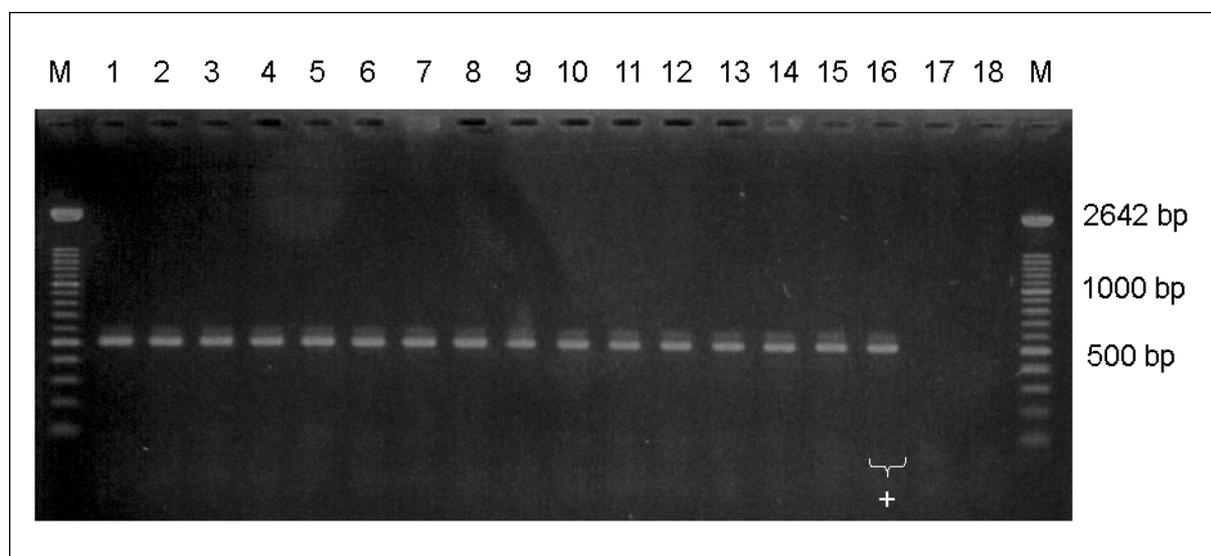


Abbildung 7: Nachweis des *rfbE*-Gens bei 15 *E. coli*-Isolaten aus Pferdekot mittels PCR mit Gi O157 I/II-Primern  
 (M): Marker; (1)-(15): *E. coli*-Isolate aus Pferdekot; (16): Positiv-Kontrolle (+) *E. coli* O157:H7 NCTC 12079; (17): Negativ-Kontrolle *E. coli* C 600; (18): Leerwert

### 4.2.3 Untersuchung auf Virulenzgene bzw. -faktoren

Alle 329 aus den Pferdekotproben isolierten *E. coli* O157-Stämme wurden mittels PCR auf das Vorhandensein von Verotoxin- und *eae*-Genen untersucht. Diese EHEC-typischen Virulenzgene konnten jedoch bei keinem Isolat detektiert werden.

Bei Auswertung des Enterohämolysin-Agars konnte weder nach dreistündiger, noch nach 24-stündiger Inkubation eine Hämolyse festgestellt werden. Somit handelt es sich bei den untersuchten Isolaten weder um  $\alpha$ -Hämolysin-Bildner, noch um Enterohämolysinbildner.

Die Untersuchungsergebnisse der 329 Pferdekot-Isolate sind in der nachstehenden Tabelle 43 zusammengefaßt.

Tabelle 43: Charakterisierung aller aus Pferdekotproben gewonnenen *E. coli* O157-Isolate

Gesamtzahl der Isolate	Sorbit-positiv <sup>1)</sup>	$\beta$ -D-Gluc-positiv <sup>2)</sup>	Indol-positiv <sup>3)</sup>	<i>vtx</i> -positiv <sup>4)</sup>	<i>eae</i> -positiv <sup>5)</sup>
329	205 (62,3 %)	329 (100 %)	305 (92,7 %)	0	0

<sup>1)</sup> Sorbitfermentation auf HC-Agar nach SZABO et al. (1986)

<sup>2)</sup>  $\beta$ -D-Glucuronidase-Aktivität auf ECD- und HC-Agar nach SZABO et al. (1986)

<sup>3)</sup> Indolnachweis mittels KOVÁCS-Indolreagenz

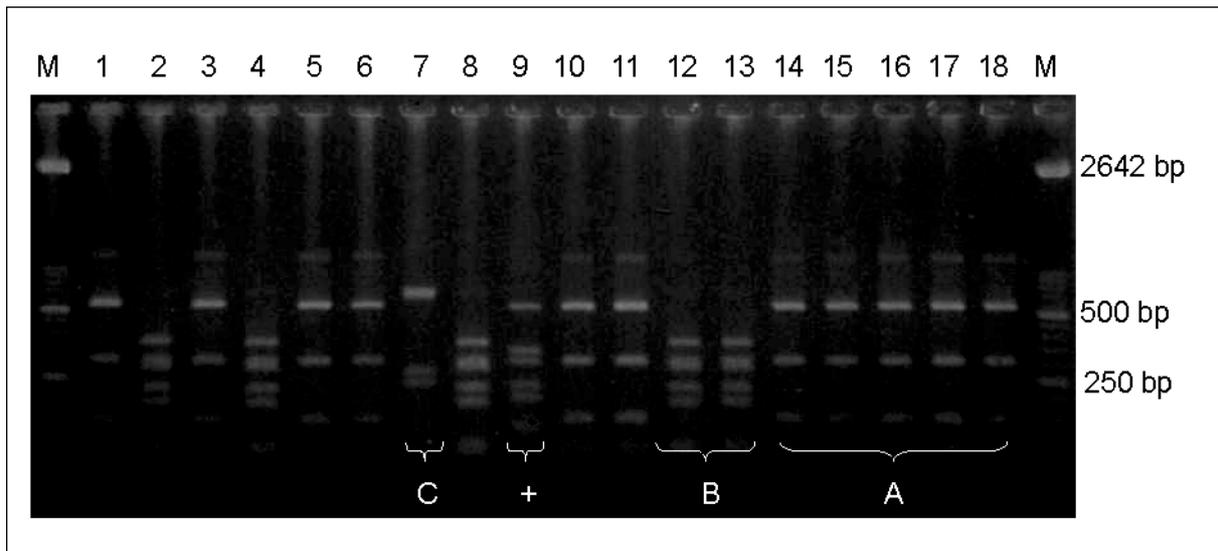
<sup>4)</sup> Nachweis eines Verotoxin-Gens mittels MK-PCR nach KARCH und MEYER (1989)

<sup>5)</sup> Nachweis des *eae*-Gens mittels SK-PCR nach SCHMIDT et al. (1994b)

### 4.2.4 Untersuchung des H-Antigens

Bei 92 ausgewählten Isolaten (siehe Punkt 4.2.2) wurde das für das H-Antigen codierende *fliC*-Gen mittels Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus-Test (RFLP) untersucht. Bei sieben der 92 Isolate (7,6 %) konnte nach der dabei durchgeführten PCR keine Bande dargestellt werden. Bei den übrigen Isolaten lag die Amplifikatgröße bei ca. 1.800 bp und damit im Bereich der Amplifikatgröße der als Positivkontrollen eingesetzten *E. coli* O157:H7-Stämme EDL 933 und NCTC 12079.

Nach Verdau der PCR-Amplifikate zeigten sich in der anschließenden Elektrophorese drei verschiedene Restriktionsmuster, dargestellt in Abbildung 8. Restriktionsmuster A wurde bei 54 Stämmen gefunden, Restriktionsmuster B zeigte sich bei 30 Isolaten. Restriktionsmuster C konnte nur bei einem Stamm nachgewiesen werden; dies war gleichzeitig der einzige Stamm, bei dessen biochemischer Bestätigung im api 20E-System das Profil Nr. 3 (*Ent. intermedius* 42,8 %, *E. coli* 27,2 %, *Kluyvera* spp. 14,8 %, *Citrobacter freundii* 13,1 %) gefunden werden konnte.



**Abbildung 8:** Charakterisierung des *fliC*-Gens von 17 *E. coli* O157-Isolaten aus Pferdekot nach PCR mit den Primern F-FLIC1/R-FLIC2 und anschließendem *Rsa* I-Restriktionsverdau (M): Marker; (1)-(8) und (10)-(18): *E. coli* O157-Isolate aus Pferdekot; (9): Positiv-Kontrolle (+) *E. coli* O157:H7 EDL 933; (A), (B), (C): gefundene Restriktionsmuster

Die Verteilung der Restriktionsmuster A und B entsprach der Verteilung der Sorbit-fermentierung, d. h. Restriktionsmuster A konnte nur bei Sorbit-fermentierenden Stämmen gefunden werden, wohingegen Restriktionsmuster B ausnahmslos bei Sorbit-negativen Isolaten auftrat.

Bei den oben erwähnten sieben Stämmen, bei denen mit der *fliC*-PCR kein Amplifikat erhalten werden konnte, handelte es sich um diejenigen Isolate, bei denen in der biochemischen Bestätigung im api 20E-System das Profil Nr. 2 (*K. pneumoniae* ssp. *ozaenae* 49,2 %; *E. coli* 32,8 %) auftrat.

Die Untersuchungsergebnisse der gemäß Punkt 4.2.2 ausgewählten und nachfolgend näher charakterisierten *E. coli* O157-Stämme sind in Tabelle 44 zusammengefaßt.

Tabelle 44: Charakterisierung ausgewählter *E. coli* O157-Isolate (n = 92) aus Pferdekot

<i>fliC</i> -RFLP-Profil <sup>1)</sup>	Sorbit <sup>2)</sup>	biochemisches Profil <sup>3)</sup>	Hämolyse <sup>4)</sup>	Anzahl Isolate (%)
A	+ <sup>5)</sup>	(Indol+)	∅ <sup>6)</sup>	49 (53,3 %)
	+	Profil 1	∅	5 (5,4 %)
B	∅	(Indol+)	∅	30 (32,6 %)
C	+	Profil 3	∅	1 (1,1 %)
kein PCR <sup>7)</sup> -Produkt	+	Profil 2	∅	7 (7,6 %)

<sup>1)</sup> Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus-Test nach FIELDS et al. (1997)

<sup>2)</sup> Sorbit-Fermentation auf HC-Agar nach SZABO et al. (1986)

<sup>3)</sup> biochemisches Profil im api 20E-System; nur durchgeführt, wenn Indolnachweis mittels KOVÁCS-Indolreagenz negativ

<sup>4)</sup> Hämolyse auf Enterohämolysin-Agar nach BEUTIN et al. (1988)

<sup>5)</sup> positiv

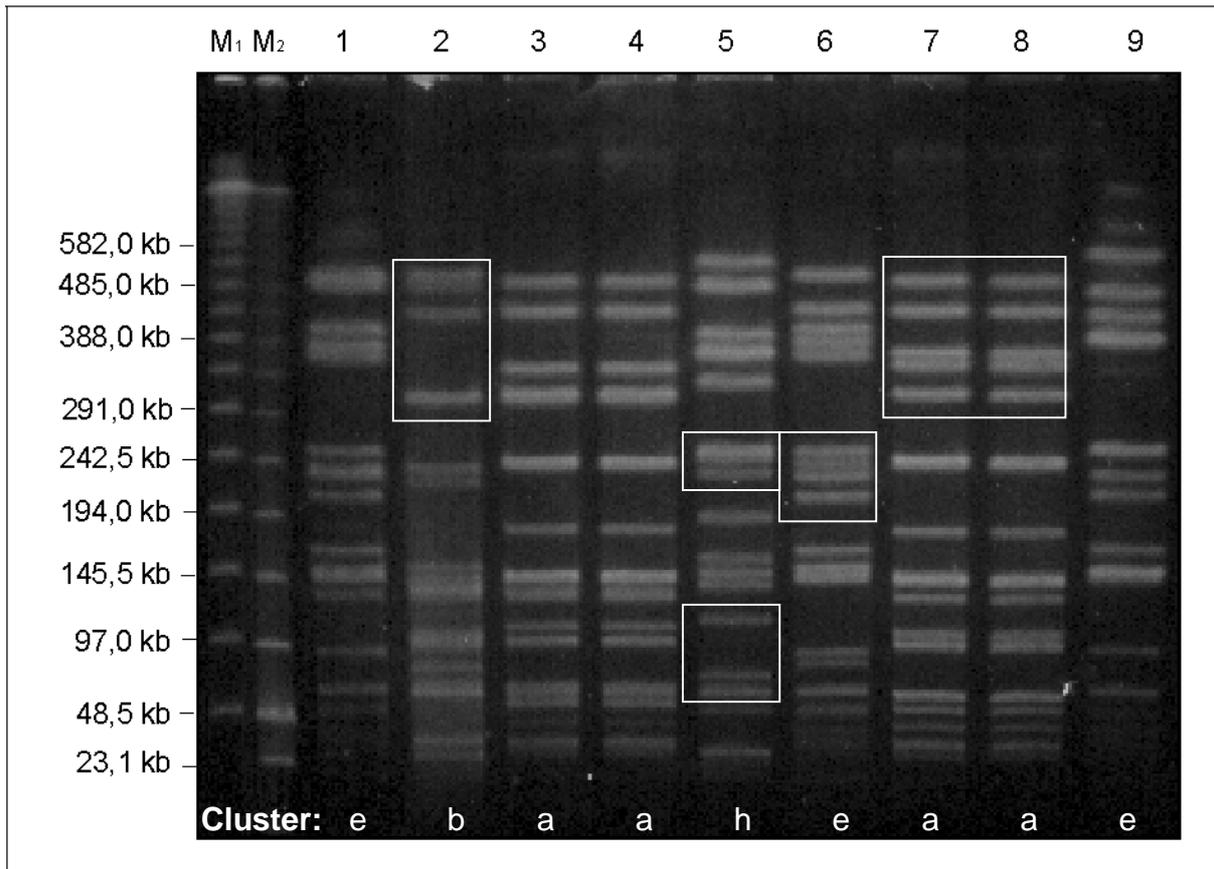
<sup>6)</sup> negativ

<sup>7)</sup> Polymerase-Kettenreaktion nach FIELDS et al. (1997)

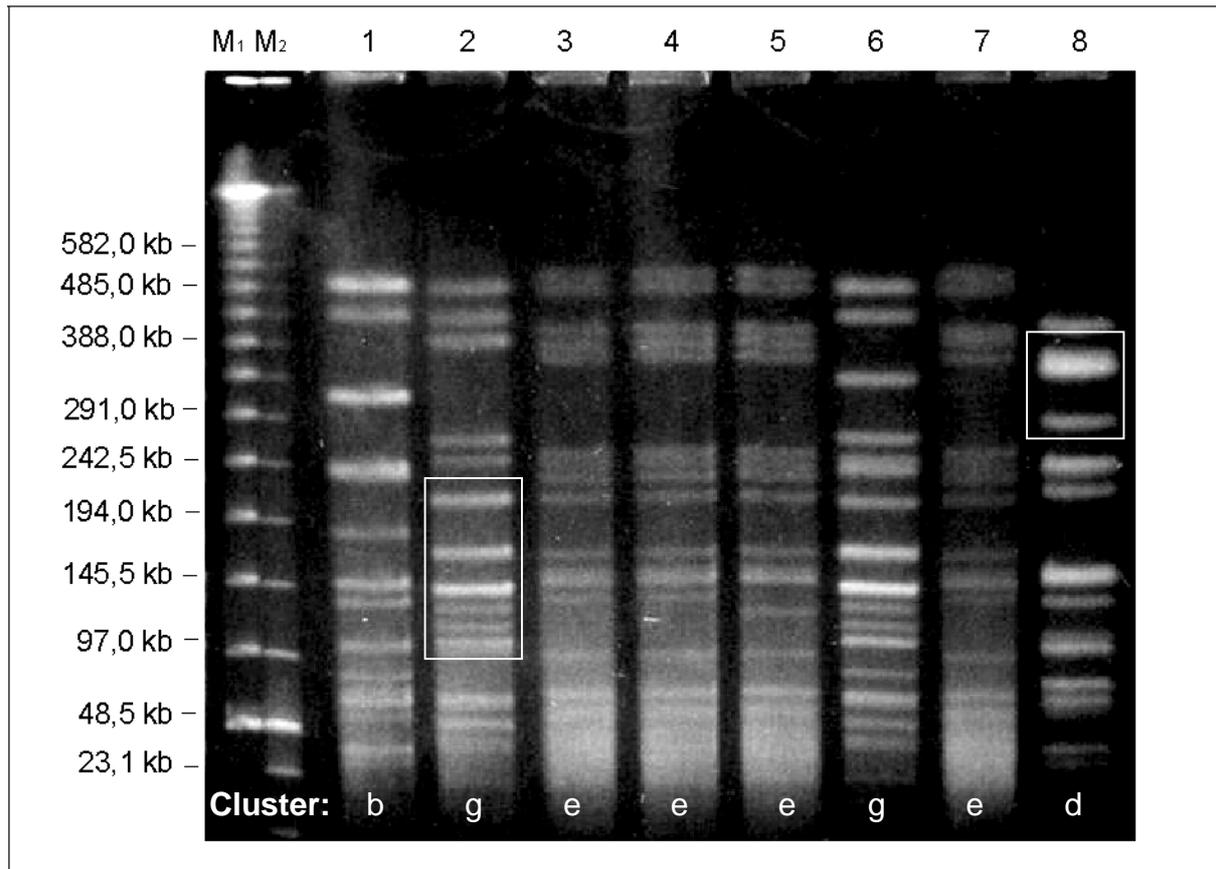
#### 4.2.5 Untersuchung der genetischen Verwandtschaft mittels Pulsfeldgelelektrophorese (DNA-Fingerprinting)

Bei den nach Punkt 4.2.2 ausgewählten Isolaten wurde zur Analyse der klonalen Beziehungen ein DNA-Fingerprinting mittels Pulsfeldgelelektrophorese erstellt. Nach Makrorestriktionsverdau mit dem Enzym *Xba* I ergaben sich bei den 92 untersuchten Stämmen insgesamt 53 verschiedene Restriktionsmuster, die aus 11 bis 16 Banden bestanden. In den Abbildungen 9 und 10 sind exemplarisch die Restriktionsmuster von 17 *E. coli* O157-Isolaten aus Pferdekot dargestellt.

Durch visuellen Vergleich in Kombination mit der Computer-gestützten Auswertung durch das Programm GelCompar 4.0 wurden die Restriktionsmuster nach Ähnlichkeit in acht Gruppen, sogenannte Cluster, unterteilt. Charakteristisch für die Cluster a und b war das Vorhandensein von jeweils drei bis fünf typischen Banden im Bereich von 291,0-533,5 kb. Die Isolate des Clusters d waren durch drei charakteristische Banden im Bereich von 291,0-388,0 kb gekennzeichnet. Typisch für Cluster e war ein Paket von drei bis fünf Banden im Bereich von 194,0 kb bis knapp über 242,5 kb, wobei im Bereich bis 339,5 kb keine weiteren Banden auftraten. Isolate des Clusters g waren am Vorliegen von sechs bis sieben Banden im Bereich von 97,0 kb bis knapp über 194,0 kb zu erkennen. Charakteristisch für Cluster h schließlich waren zwei Banden um 242,5 kb sowie drei Banden im Bereich von 48,5-145,5 kb. „Cluster“ c und f bestanden jeweils nur aus einem Isolat, welche keine der vorgenannten Charakteristika der anderen Cluster teilten. Die jeweils typischen Banden eines Clusters sind in den Abbildungen 9 und 10 durch Umrahmung hervorgehoben.

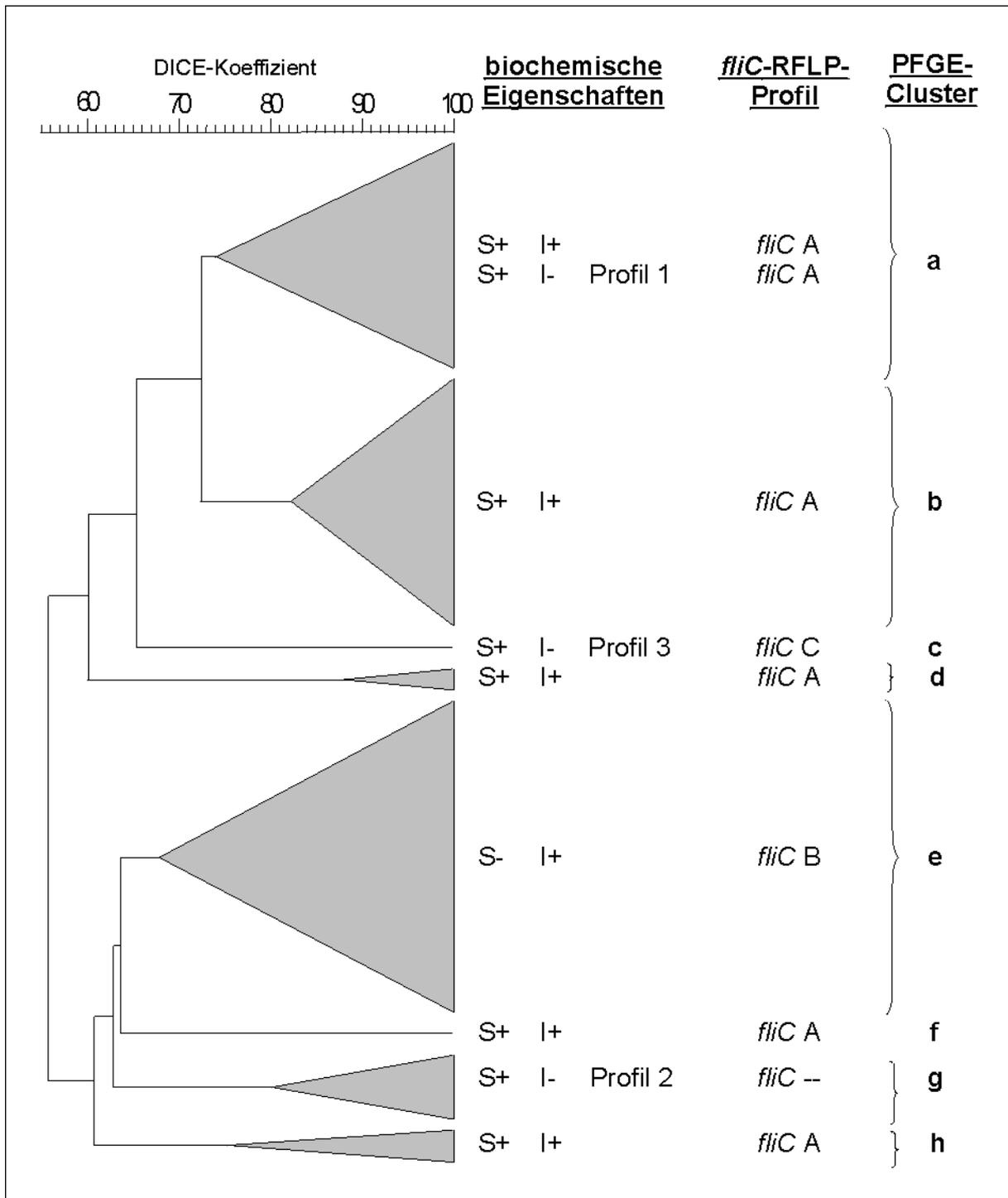


**Abbildung 9:** Restriktionsmuster von 9 *E. coli* O157-Isolaten aus Pferdekot nach Makrorestriktion mittels *Xba* I und Pulsfeldgelelektrophorese (M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>): Marker; (1)-(9): *E. coli*-Isolate aus Pferdekot der Cluster a, b, e und h; typische Banden durch Rahmen hervorgehoben

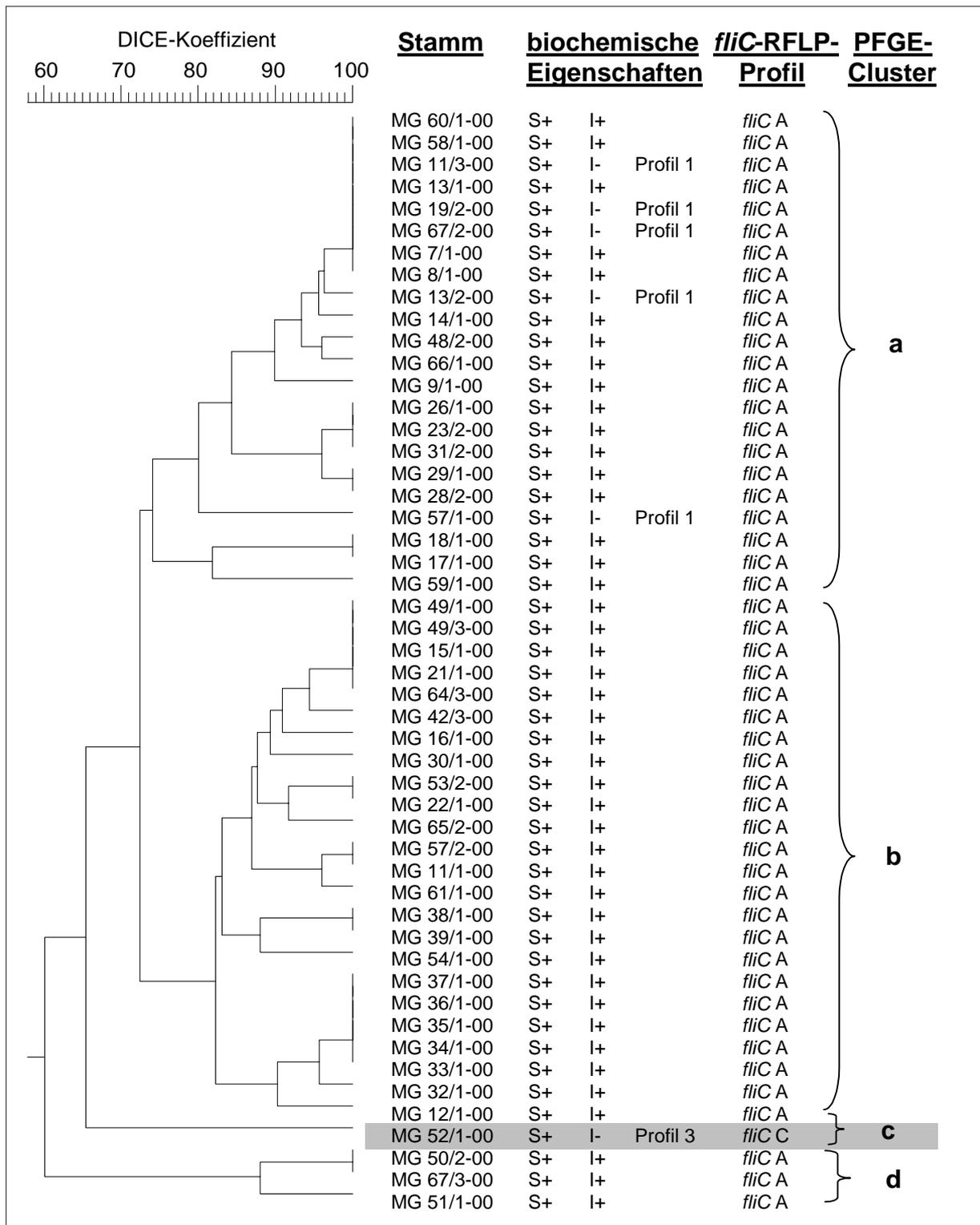


**Abbildung 10:** Restriktionsmuster von 8 *E. coli* O157-Isolaten aus Pferdekot nach Makrorestriktion mittels *Xba* I und Pulsfeldgelelektrophorese (M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>): Marker; (1)-(8): *E. coli*-Isolate aus Pferdekot der Cluster b, d, e und g; typische Banden durch Rahmen hervorgehoben

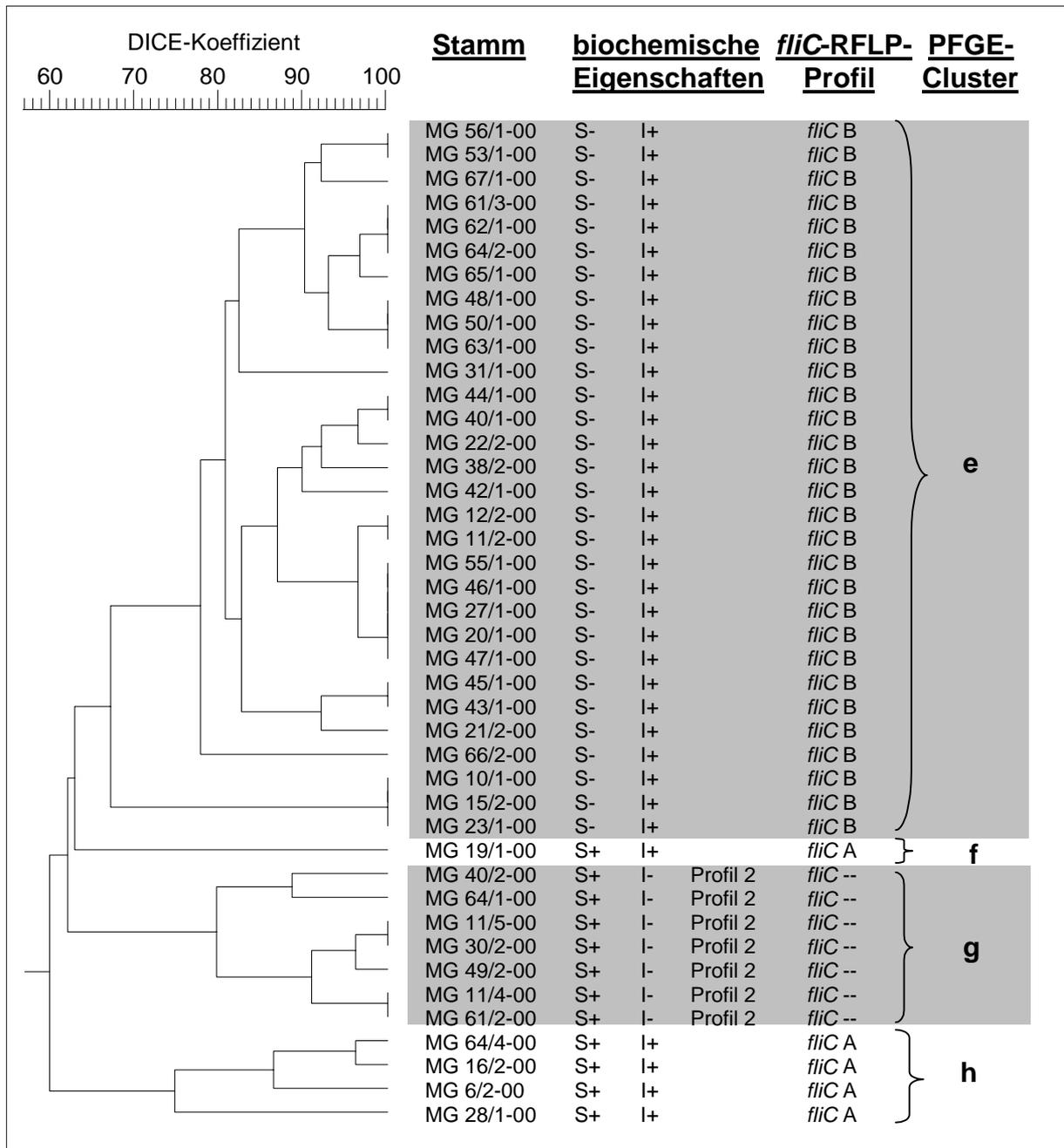
Mit Hilfe des Programms GelCompar 4.0 wurden die jeweiligen DICE-Koeffizienten der erhaltenen Restriktionsmuster untereinander ermittelt und über den UPGMA-Algorithmus als Dendrogramm graphisch dargestellt. Zur Verbesserung der Übersichtlichkeit wurden in [Abbildung 11](#) die jeweiligen Cluster zusammengefaßt dargestellt; in den [Abbildungen 12 und 13](#) sind alle untersuchten Stämme einzeln aufgeschlüsselt.



**Abbildung 11:** Dendrogramm der Makrorestriktionsmuster der 92 untersuchten *E. coli* O157-Isolate aus Pferdekot - Übersicht der Cluster  
 (S+/S-): Sorbit-positiv/-negativ; (I+/I-): Indol-positiv/-negativ; (Profil 1/2/3): Ergebnis der biochemischen Differenzierung, siehe Abschnitt 4.2.1; (*fliC*-RFLP-Profil A, B, C, --): Restriktionsmuster des *fliC*-RFLP nach FIELDS et al. (1997), siehe Abschnitt 4.2.4



**Abbildung 12:** Dendrogramm der Makrorestriktionsmuster der 92 untersuchten *E. coli* O157-Isolate aus Pferdekot - Teil 1 (50 Isolate)  
 (S+): Sorbit-positiv; (I+/I-): Indol-positiv/-negativ; (Profil 1/3): Ergebnis der biochemischen Differenzierung, siehe Abschnitt 4.2.1; (*fliC*-RFLP-Profil A): Restriktionsmuster des *fliC*-RFLP nach FIELDS et al. (1997), siehe Abschnitt 4.2.4



**Abbildung 13:** Dendrogramm der Makrorestriktionsmuster der 92 untersuchten *E. coli* O157-Isolate aus Pferdekot - Teil 2 (42 Isolate)  
 (S+/S-): Sorbit-positiv/-negativ; (I+/I-): Indol-positiv/-negativ; (Profil 2): Ergebnis der biochemischen Differenzierung, siehe Abschnitt 4.2.1;  
 (*fliC*-RFLP-Profil A, B, --): Restriktionsmuster des *fliC*-RFLP nach FIELDS et al. (1997), siehe Abschnitt 4.2.4

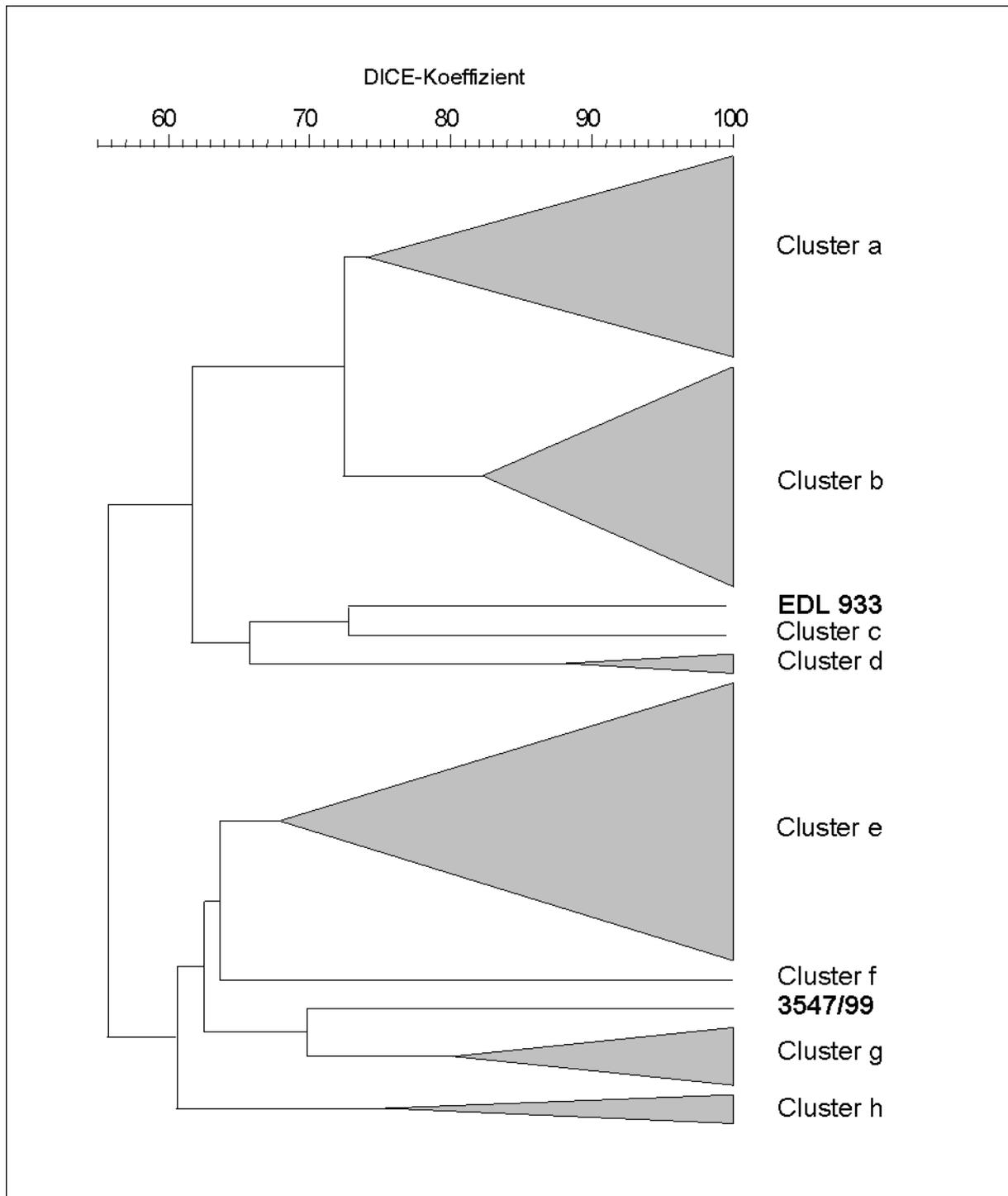
Nach UPGMA-Algorithmus ergaben sich innerhalb der 92 untersuchten *E. coli* O157-Isolate insgesamt acht Cluster. Cluster a umfaßte 22 Stämme; hier fanden sich Sorbit-fermentierende Isolate, die beim *fliC*-RFLP nach FIELDS et al. (1997) das Restriktionsmuster A zeigten (siehe Abschnitt 4.2.4). Die Indol-Bildung war bei Stämmen dieses Clusters jedoch nicht konstant ausgeprägt; die Indol-negativen Isolate

zeigten ausschließlich das biochemische Profil 1 (siehe Punkt 4.2.1). Die Isolate stammten aus Proben vom Schlachthof Gießen, von den Veterinärkliniken der Universität Gießen sowie von einem mittelhessischen Reitstall. Bemerkenswerterweise fand sich ein bestimmtes Restriktionsmuster dieses Clusters sowohl bei Indol-positiven, als auch bei Indol-negativen Stämmen.

Cluster b wurde von 24 Isolaten gebildet, die alle einheitlich Sorbit- und Indol-positiv waren und beim *fliC*-RFLP nach FIELDS et al. (1997) ebenfalls Restriktionsmuster A zeigten. Die entsprechenden Proben wurden am Schlachthof Gießen, in den Veterinärkliniken der Universität Gießen sowie in Reitställen in Mittelhessen und in Rheinland-Pfalz gezogen. Das Isolat MG 52/1-00, welches als einziges beim *fliC*-RFLP das Muster C aufwies und in der „bunten Reihe“ das Profil 3 ergab, bildete ein eigenes „Cluster“ c; die entsprechende Kotprobe war am Schlachthof Gießen entnommen worden. Cluster d bestand wiederum aus drei Isolaten, die sich neben Sorbit-Fermentation und Indol-Produktion durch das *fliC*-Restriktionsmuster A auszeichneten; auch diese Proben stammten vom Schlachthof (s. Abbildungen 11 und 12).

Alle 30 Sorbit-negativen Isolate, die ausnahmslos das *fliC*-Restriktionsmuster B zeigten und Indol-positiv waren, fanden sich in Cluster e. Die zugehörigen Kotproben wurden am Schlachthof Gießen, in den Veterinärkliniken der Universität Gießen sowie in Reitställen in Mittelhessen und in Rheinland-Pfalz gewonnen. „Cluster“ f bestand nur aus einem Stamm, der ebenso wie die vier Isolate des Clusters h Sorbit- und Indol-positiv war und das *fliC*-Restriktionsmuster A zeigte; ersterer wurde von einer Kotprobe vom Schlachthof Gießen isoliert, die letztgenannten entstammen Proben vom Schlachthof und den Veterinärkliniken der Universität Gießen. Die sieben Stämme, von denen in der *fliC*-PCR kein Amplifikat gewonnen werden konnte und die das biochemische Profil 2 aufwiesen, bildeten schließlich Cluster g; auch diese Proben wurden an Schlachthof und den Veterinärkliniken entnommen (s. Abbildungen 11 und 13).

Um die erhaltenen Restriktionsmuster einordnen zu können, wurden diese mit den Mustern zweier Referenzstämmen verglichen: Zum einen wurde EDL 933 gewählt; dieses *E. coli* O157-Isolat weist ein typisches EHEC-Virulenzspektrum auf (*vtx 1*, *vtx 2*, *eae*, *hly<sub>EHEC</sub>*), und wurde während eines US-amerikanischen EHEC-Ausbruchs aus „Hamburgern“ isoliert. Als zweiter Referenzstamm wurde 3547/99 eingesetzt; dieser Sorbit-fermentierende *E. coli* O157:H<sup>-</sup>-Stamm besitzt ebenfalls EHEC-typische Virulenzgene (*vtx 2*, *eae*) und wurde aus Kotproben eines Minipferdes in Bayern gewonnen. Wie in Abbildung 14 zu erkennen, lassen sich diese beiden Referenzstämmen keinem der in dieser Untersuchung erhaltenen Cluster zuordnen. Das Restriktionsmuster von EDL 933 weist die größte Ähnlichkeit mit dem Sorbit-positiven, Indol-negativen Isolat MG 52/1-00 auf, der DICE-Koeffizient beträgt  $72,7 \pm 0,0$  %. Das Muster des Minipferd-Isolats 3547/99 ist dem Cluster g am ähnlichsten, das aus Sorbit-positiven, Indol-negativen Stämmen gebildet wird. Der DICE-Koeffizient zu diesem Cluster beträgt  $69,8 \pm 4,5$  %.



**Abbildung 14:** Dendrogramm der Makrorestriktionsmuster der 92 untersuchten *E. coli* O157-Isolate aus Pferdekot - Übersicht der Cluster (a-h) in Relation zu den Referenzstämmen EDL 933 und 3447/99

## 5 DISKUSSION

In den eigenen Untersuchungen sollte das Vorkommen von *E. coli* O157 in Fäzesproben von Pferden untersucht werden. Besonderes Augenmerk lag dabei auf der Miteinbeziehung Sorbit-fermentierender (SF) *E. coli* O157:H<sup>-</sup>-Stämme, welche bei Anwendung der gebräuchlichen kulturellen Nachweisverfahren aufgrund biochemischer Besonderheiten oftmals nicht erfaßt werden. Die erhaltenen equinen *E. coli* O157-Isolate wurden biochemisch sowie im Hinblick auf Serovazugehörigkeit und Virulenzprofil charakterisiert. Desweiteren wurde bei einer repräsentativen Auswahl an Isolaten die genetische Verwandtschaft untereinander und im Vergleich zu Referenzstämmen mittels Pulsfeldgelelektrophorese untersucht.

### 5.1 Sorbit-fermentierende *E. coli* O157:H<sup>-</sup>-Stämme

#### 5.1.1 Erkrankungen beim Menschen

In der Serogruppe der *E. coli* O157 ist neben den Verotoxin-bildenden H7-Stämmen, welche immer noch als Prototyp der EHEC gelten, auch den verotoxinogenen H<sup>-</sup>-Varianten Beachtung zu schenken. Insbesondere solche Isolate, welche sich von den klassischen *E. coli* O157:H7 durch die Fähigkeit zur raschen Sorbitfermentierung unterscheiden, traten wiederholt bei humanen Erkrankungsfällen in Erscheinung. Seit der Erstbeschreibung bei einem HUS-Ausbruch in Oberbayern im Jahr 1988, bei dem sechs Kinder erkrankten (KARCH et al., 1990), werden solche Stämme bei 3,2-17,7 % der HUS-Patienten in Deutschland nachgewiesen (GUNZER et al., 1992; KARCH und BIELASZEWSKA, 2001). Im Rahmen des bislang größten EHEC-Ausbruchs in Deutschland, der sogenannten „HUS-Epidemie“ in Bayern im Winter 1995/96, bei dem 28 Kinder an HUS erkrankten und drei Kinder starben, wurden ebenfalls SF *E. coli* O157:H<sup>-</sup>-Stämme nachgewiesen (RKI, 1996a; AMMON et al., 1999). Zwei weitere Häufungen wurden im März 2002 (10 Infektionen bundesweit) sowie im Zeitraum Oktober bis Dezember 2002 (27 bestätigte sowie 13 wahrscheinliche Fälle in Süddeutschland) erfaßt (RKI, 2002a; RKI, 2003a). Auffällig ist insbesondere die deutliche Assoziation mit HUS-Erkrankungen, oftmals einhergehend mit hoher Letalität, wohingegen dieses Serovar bei Diarrhöe-Patienten vergleichsweise selten nachgewiesen wird (RKI, 2003a; ALPERS et al., 2004). Ob möglicherweise eine genetische Prädisposition für invasive Infektionen mit solchen Stämmen vorliegt, ist gegenwärtig in der Diskussion (ALPERS et al., 2004).

Mittlerweile wurden SF *E. coli* O157:H<sup>-</sup>-Stämme auch in der Tschechischen Republik (BIELASZEWSKA et al., 1998; BIELASZEWSKA et al., 2000), in Ungarn (CAPRIOLI und TOZZI, 1998), in Finnland (KESKIMÄKI et al., 1998) sowie in Österreich (ORTH et al., 2004) nachgewiesen. Glaubte man lange Zeit die Verbreitung dieser Variante auf Kontinentaleuropa beschränkt (KARCH und BIELASZEWSKA, 2001), so liegen nun auch

Berichte über deren Nachweis in Schottland (SCIEH, 2002) sowie Australien vor (BETTELHEIM et al., 2002).

Neben der geographischen Verbreitung unterscheiden sich SF *E. coli* O157:H<sup>-</sup>-Stämme in weiteren epidemiologischen Besonderheiten vom O157:H7-Prototyp. Während EHEC-Erkrankungen allgemein bevorzugt in den Sommermonaten auftreten (DOUGLAS und KURIEN, 1997; SIMMONS, 1997; WHO, 1997; BANATVALA et al., 2001; RKI, 2002b; RKI, 2003b; RKI, 2004a), werden *E. coli* O157:H<sup>-</sup>-Ausbrüche häufiger in der kühlen Jahreszeit beobachtet (KARCH et al., 1990; RKI, 1996a; RKI, 2003a). Die betroffenen Patienten sind vergleichsweise jung, der Altersmedian liegt meist unter drei Jahren (KARCH et al., 1990; KARCH und BIELASZEWSKA, 2001; RKI, 2002a; RKI, 2003a).

### 5.1.2 Reservoir und Übertragungswege

Bei den meisten Ausbrüchen blieben Infektionsquelle und Übertragungswege unklar (KARCH et al., 1990; RKI, 2002a; RKI, 2003a). Die Erkrankungen im Rahmen der „HUS-Epidemie“ in Bayern waren statistisch mit dem Verzehr von Mortadella und Teewurst assoziiert, der Erreger konnte jedoch in keiner Lebensmittelprobe nachgewiesen werden (AMMON et al., 1999). In zwei Fällen wurden Rinder als wahrscheinliche Infektionsquelle bei sporadischen *E. coli* O157:H<sup>-</sup>-Erkrankungen identifiziert (BIELASZEWSKA et al., 2000; ORTH et al., 2004). Während Wiederkäuer durch zahlreiche Studien weltweit als Reservoir von VTEC-Stämmen inklusive der *E. coli* O157:H7 bestätigt wurden (CHAPMAN et al., 1997; PRADEL et al., 2000; BONARDI et al., 2001; KADDU-MULINDWA et al., 2001; BÜLTE, 2002; GEUE et al., 2002; KEEN und ELDER, 2002; MØLLER-NIELSEN et al., 2002; BLANCO et al., 2003; LEOMIL et al., 2003; EZAWA et al., 2004; FUKUSHIMA und SEKI, 2004), liegen im Gegensatz dazu bemerkenswerterweise keine weiteren Berichte über den Nachweis von SF *E. coli* O157:H<sup>-</sup> bei diesen Tieren vor, obwohl in deutschen und tschechischen Rinderbeständen umfangreiche Untersuchungen hierzu durchgeführt wurden (KARCH und BIELASZEWSKA, 2001). Der Nachweis bei Minipferden in Bayern (RKI, 1999) bot deshalb einen neuen Ansatzpunkt auf der Suche nach dem Reservoir dieser Erregervariante, der mit der vorliegenden Arbeit umgesetzt wurde - allerdings mit negativem Ergebnis. Aufgrund der fehlenden Nachweisbarkeit bei Tieren ist möglicherweise, analog zur Situation bei EPEC-Stämmen, der Mensch als primäres Reservoir dieses besonderen Serotyps in Betracht zu ziehen (KARCH und BIELASZEWSKA, 2001). So muß trotz zahlreicher Untersuchungen eingeräumt werden, daß das Reservoir der SF *E. coli* O157:H<sup>-</sup> auch weiterhin unklar bleibt (ALPERS et al., 2004).

### 5.1.3 Virulenzprofil

Um die besondere Virulenz dieses Serovars zu erklären, wurden verschiedene Studien zum Virulenzprofil durchgeführt. Ebenso wie typische Vertreter der *E. coli* O157:H7 beherbergen SF *E. coli* O157:H<sup>-</sup>-Stämme charakteristischerweise das  $\gamma$ -*eae*- sowie das *hly*<sub>EHEC</sub>-Gen; letzteres wird allerdings häufig nicht exprimiert. Als Verotoxin-Variante tritt nur VT 2 auf. Das Vorkommen des *etp*-Gens ist inkonstant, die ebenfalls Plasmid-codierten Gene *katP* und *espP* fehlen, ebenso die Patho-

genitätsinsel TAI (KARCH et al., 1993; BIELASZEWSKA et al., 1998; AMMON et al., 1999; BIELASZEWSKA et al., 2000; KARCH und BIELASZEWSKA, 2001). Demgegenüber beherbergen SF *E. coli* O157:H<sup>-</sup>-Stämme signifikant häufiger das *cdt V*- sowie das *efa1/lifA*-Gen (JANKA et al., 2002; JANKA et al., 2003; MORABITO et al., 2003). Weiterhin konnte mit *sfpA* ein Plasmid-codiertes Gen identifiziert werden, welches spezifisch bei *eae*-positiven SF *E. coli* O157:H<sup>-</sup>, unabhängig vom Verotoxinbildungsvermögen, auftritt und als Zielsequenz für Screeninguntersuchungen empfohlen wird (BRUNDER et al., 2001; FRIEDRICH et al., 2004).

#### 5.1.4 Phylogenetischer Ursprung

In PFGE-Untersuchungen zeigen SF *E. coli* O157:H<sup>-</sup>-Stämme identische oder nur geringfügig differierende Restriktionsmuster, die sich jedoch deutlich von denen der *E. coli* O157:H7-Stämme unterscheiden (KARCH et al., 1993; BÖHM, 2000). Die dargestellten epidemiologischen, phäno- und genotypischen Unterschiede untermauern die These, daß es sich bei SF *E. coli* O157:H<sup>-</sup>-Stämmen um einen eigenständigen Klon handelt, und nicht etwa um Defektmutanten der klassischen O157:H7-Stämme, die lediglich ihre Beweglichkeit verloren haben (KARCH et al., 1993; BÖHM, 2000; JANKA et al., 2003).

Phylogenetische Studien von FENG et al. (1998) gehen von einer mehrstufigen Entstehungsgeschichte des *E. coli* O157-Komplexes aus, deren Ausgangspunkt eine EPEC-ähnliche Vorläuferzelle darstellt, von welchem der Sorbit-fermentierende O55:H7-Klon abstammt. Durch Aufnahme eines *vtx 2*-transduzierenden Phagen sowie anschließender Mutation im *uidA*-Gen, welche phänotypisch im Übergang von O-Antigen 55 zu O-Antigen 157 resultierte, entstand eine hypothetische SF VTEC O157:H7-Variante, die sich in zwei unterschiedliche Richtungen weiterentwickelte. Durch Verlust der Motilität entwickelte sich zum einen die Linie des SF VTEC O157:H<sup>-</sup>-Klons. Durch Aufnahme eines *vtx 1*-transduzierenden Phagen sowie subsequentem Verlust des Sorbit-Fermentationsvermögens und der  $\beta$ -D-Glucuronidase-Aktivität entstand weiterhin die unmittelbare Vorläuferzelle des *E. coli* O157:H7-Klons.

## 5.2 Methodische Aspekte

### 5.2.1 Methodik der Probenahme

Da der Dickdarm von Mensch und warmblütigen Tieren als natürliches Habitat von *E. coli* angesehen wird, basieren die meisten Prävalenzuntersuchungen von VTEC bzw. *E. coli* O157 auf der Untersuchung von Kotproben bzw. Darminhalt. KEEN und ELDER (2002) konnten in einer Studie bei Mastrindern allerdings zeigen, daß durch Beprobung der Maulhöhle (Tupferproben ohne Flächenbezug) sowie verschiedenen Hautbezirken (Tupferproben von jeweils 500 cm<sup>2</sup>) höhere Nachweisraten als durch Untersuchung von 10 g Fäzes zu erzielen waren. Überraschenderweise waren ins-

besondere solche Hautpartien besonders stark mit *E. coli* O157 kontaminiert, welche generell einen relativ geringen Verschmutzungsgrad aufweisen, wie Rücken und Nacken, wohingegen von den häufiger fäkal verschmutzten Partien an Bauch und Hintergliedmaße seltener *E. coli* O157 isoliert wurden. Eine Erklärung für diese bemerkenswerte Verteilung steht noch aus. Die Autoren geben allerdings zu bedenken, daß die geringere Nachweisbarkeit in Fäzesproben nicht notwendigerweise eine tatsächlich niedrigere Prävalenz widerspiegelt, sondern auch auf eine höhere Nachweisgrenze für die mikrobiell sehr komplex zusammengesetzten Kotproben zurückzuführen sein könnte. Es steht zu vermuten, daß das Vorkommen von *E. coli* O157 auf der Körperoberfläche von Tieren haltungs- und pflegeabhängig ist und die Ergebnisse von KEEN und ELDER (2002) nicht ohne Weiteres auf die Situation bei Pferden übertragbar sind. Untersuchungen hierzu liegen nicht vor.

Bei der Untersuchung von Fäzes-Material auf *E. coli* O157:H7 spielt weiterhin die Technik der Probenahme eine Rolle. RICE et al. (2003) konnten bei Rindern demonstrieren, daß die Beprobung der rektoanal Schleimhaut mittels Tupfern der Untersuchung von Kotproben (10 g) oftmals überlegen ist. Dies traf insbesondere auf expositionserferne Zeiträume zu, während innerhalb der ersten beiden Wochen nach Exposition sich die Untersuchung von Fäzesproben als sensitiver erwies. Diese Ergebnisse lassen sich anhand des *E. coli* O157:H7-Kolonisationsmusters im bovinen Magen-Darm-Trakt erklären. Nach NAYLOR et al. (2003) ist das terminale Rektum, welches sich durch eine hohe Dichte an Lymphfollikeln auszeichnet, als dominierende Kolonisierungsstelle für *E. coli* O157:H7 anzusehen. Dieser Gewebstropismus ist u. a. durch die vorliegende Intimin-Variante bestimmt. Für  $\gamma$ -Intimin-tragende *E. coli* O157:H7-Stämme konnte bereits ein Tropismus für Follikel-assoziiertes Epithel aufgezeigt werden (PHILLIPS und FRANKEL, 2000; PHILLIPS et al., 2000). Auch SF *E. coli* O157:H<sup>-</sup>-Stämme, die in den eigenen Untersuchungen besonders berücksichtigt werden sollten, beherbergen die Intimin-Variante  $\gamma$  (KARCH und BIELASZEWSKA, 2001). Während *E. coli* O157:H7-Stämme, den dargestellten Ergebnissen entsprechend, v. a. die Oberfläche der Fäzes kontaminieren, scheinen VTEC anderer Serovare gleichmäßig in den Fäzes verteilt (NAYLOR et al., 2003). Auch hier ist fraglich, inwieweit sich diese bei Rindern gewonnenen Erkenntnisse auf Pferde übertragen lassen; entsprechende Daten zur Kolonisation bei dieser Tierart liegen nicht vor.

In der Literatur ist bei Pferden und Rindern sowohl die rektale Entnahme von Fäzesproben (HOLLAND et al., 1996; MØLLER-NIELSEN et al., 2002; RILEY et al., 2003), als auch die Beprobung von frisch abgesetztem Kot beschrieben (HANCOCK et al., 1998; HEUVELINK et al., 2002; SANDER, 2002; SYNGE et al., 2003). Während die erstgenannte Methode den Vorteil bietet, ungewollte Kontaminationen aus der Umwelt zu vermeiden, ist sie bei Tieren, die den Umgang mit Menschen nicht gewohnt sind, sowie bei Beprobung großer Tierkollektive kaum durchführbar. Auch in den eigenen Untersuchungen mußte bei lebenden Tieren auf die rektale Entnahme verzichtet werden, da die Pferdebesitzer im Hinblick auf das im Vergleich zu Rindern erhöhte Perforationsrisiko nicht die notwendige Erlaubnis zur rektalen Untersuchung gaben.

### 5.2.2 Vergleich von Anreicherungsverfahren inklusive immunomagnetischer Separation (IMS) und Direktausstrich

In der Literatur werden verschiedene Procedere zum selektiven Nachweis von *E. coli* O157-Stämmen aus Kotproben beschrieben. Mehrere Arbeitsgruppen bescheinigten der Selektivanreicherung eine gesteigerte Sensitivität im Vergleich zu Direktausstrichverfahren. In der Untersuchung von ZHAO et al. (1995) konnten 48 % aller *E. coli* O157:H7-positiven bovinen Fäzesproben nur nach Anreicherung in mTSB+N-Bouillon detektiert werden. Eine Selektivanreicherung mittels Vancomycin- und Cefixim-supplementierter TSB-Bouillon verbesserte die Reisolierungsrate von artifiziell kontaminierten Rinderkotproben von 37 % auf 80 % und senkte die 50 %-Nachweisgrenze von 251 KbE/g auf 13 KbE/g (SANDERSON et al., 1995). Artifiziell kontaminierte Schafkotproben konnten nach Anreicherung mit Cefixim-, Tellurit- und Vancomycin-supplementierter TSB-Bouillon bis zu einem Inokulum von 0,06 KbE/g detektiert werden, wohingegen im Direktausstrich auch Inokula von 2,4 KbE/g Fäzes nicht reisolierbar waren (KUDVA et al., 1995).

Ebenso wie in der Lebensmitteldiagnostik hat sich auch für die Untersuchung von Kotproben die Anwendung der IMS bewährt. Die Kombination aus Anreicherung und IMS erwies sich in der Studie von CHAPMAN et al. (1994) ca. 100-fach sensitiver als der Direktausstrich. HEUVELINK et al. (1998a) berichteten von einer siebenfachen Steigerung der Isolationsrate im Vergleich zum Anreicherungsverfahren ohne IMS. SANDERSON et al. (1995) konnten hingegen keine signifikanten Sensitivitätsunterschiede zwischen Verfahren mit und ohne IMS darstellen.

Die meisten Untersucher verwendeten auch für die Untersuchung von equinen Fäzesproben eine Selektivanreicherung (HEUVELINK et al., 1998b: mEC+N; CHAPMAN et al., 2000: BPW-VCC; HEUVELINK et al., 2002: mTSB+N) sowie die IMS (CHALMERS et al., 1997; HEUVELINK et al., 1998b; CHAPMAN et al., 2000; HEUVELINK et al., 2002). Methodische Vergleichsuntersuchungen für den *E. coli* O157-Nachweis speziell bei der Tierart Pferd liegen jedoch nicht vor. Aus diesem Grund wurden in der ersten Phase der eigenen Untersuchungen alle Proben parallel mit drei verschiedenen Verfahren untersucht, um die Methodenkaskade zu optimieren. Als Anreicherungsmedien wurden die GN-Bouillon nach HAJNA sowie die mTSB-Bouillon gewählt. Erstere zeigte sich in der Untersuchung von MÜLLER und BÜLTE (1997) für das Wachstum von VTEC-Reinkulturen inklusive *E. coli* O157-Stämmen gut geeignet. Die weit verbreitete mTSB-Bouillon wurde für den VTEC-Nachweis in Fäzesproben von TIMM et al. (1998) empfohlen. Da sich der Zusatz von antimikrobiellen Agentien in der Untersuchung von MÜLLER und BÜLTE (1997) als partiell wachstumshemmend erwies, wurde in den eigenen Untersuchungen auf die Supplementierung mit Novobiocin verzichtet. Die beiden Anreicherungsverfahren wurden durch die IMS ergänzt, weil diese sich, wie bereits dargelegt, für die Untersuchung verschiedener Substrate als sensitivitätssteigernd erwiesen hatte. Zusätzlich wurden die Proben im Direktausstrich untersucht, wobei die faserige Beschaffenheit der Pferdefäzes der Anwendung der IMS entgegenstand.

In der ersten Versuchsphase konnten aus 34 von 51 Proben (66,7 %) *E. coli* O157-Stämme isoliert werden. Mit dem Direktausstrich ohne IMS gelang dabei nur in einem

Fall die Detektion von *E. coli* O157, was einem Anteil von 2,9 % aller positiven Proben entsprach. Nach Selektivanreicherung in GN- bzw. mTSB-Medium in Kombination mit der IMS wurden 28 bzw. 32 Proben als *E. coli* O157-positiv erkannt; dies entsprach 82,4 % bzw. 94,1 % aller positiven Proben. Die von vielen Untersuchern dargelegte Verbesserung der Sensitivität durch Anwendung von Selektivanreicherung und/oder IMS konnte also in den eigenen Untersuchungen bestätigt werden. Da diese beiden Verfahren jedoch nicht unabhängig voneinander zur Anwendung kamen, kann nicht nachvollzogen werden, welchen Anteil sie jeweils einzeln an der Verbesserung des *E. coli* O157-Nachweises hatten. In Konsequenz dieser Ergebnisse konnte in der zweiten Versuchsphase die Methodenkaskade auf die Anwendung von mTSB-Bouillon in Kombination mit der IMS reduziert werden.

### 5.2.3 Subkultivierung und Auswahl typischer Kolonien

Da in den eigenen Untersuchungen die SF *E. coli* O157:H<sup>-</sup>-Stämme besonders berücksichtigt werden sollten, mußte auf das wohl gebräuchlichste Selektivmedium (DE BOER und HEUVELINK, 2000), den mit Cefixim und Tellurit supplementierten SMAC-Agar, verzichtet werden. Nach Untersuchungen von BIELASZEWSKA et al. (2005b) sind 96,5 % der SF *E. coli* O157:H<sup>-</sup>-Stämme Tellurit-sensitiv und wachsen auf entsprechend supplementierten Nährböden nicht an. Stattdessen wurde der weniger selektive HC-Agar nach SZABO (1986) gewählt, der sich sowohl in der Untersuchung von Hackfleisch (HECKÖTTER, 1999), als auch von bovinen Fäzesproben bewährt hat (BÜLTE et al., 2002). Für erstere wurde berichtet, daß nach 24-stündiger Anreicherung die Auswertbarkeit durch Überwuchern der Begleitflora eingeschränkt sein kann. In den eigenen Untersuchungen wurde aufgrund der für Fäzesproben charakteristischen hohen mikrobiellen Kontamination nur eine sechsstündige Anreicherung durchgeführt.

Entgegen der üblichen Auswertung wurden in den eigenen Untersuchungen auch Sorbit-positive Kolonien weiter überprüft, um neben den Sorbit-negativen *E. coli* O157:H7-Stämmen ggf. auch Sorbit-fermentierende H<sup>-</sup>-Varianten erfassen zu können. Die zweite Schlüsselreaktion des HC-Mediums, die Überprüfung der  $\beta$ -D-Glucuronidase-Aktivität unter UV-Licht, konnte jedoch aufgrund des teilweise dichten Koloniewachstums nicht zuverlässig erfaßt werden und wurde deshalb nicht in die Auswertung miteinbezogen.

### 5.2.4 Untersuchung des Virulenzprofils

Die besondere Lokalisation der Verotoxin-Gene beeinflusst auch die anzuwendende Nachweismethodik. Bei Subkultivierung muß mit dem Verlust der Toxin-tragenden Phagen gerechnet werden, wie KARCH et al. (1992) es bei 15 von 45 klinischen Isolaten beobachten konnten. Da die in den eigenen Untersuchungen durchgeführte Methodenkaskade mehrere Subkultivierungsschritte beinhaltete, bevor die Isolate auf das Vorhandensein von Verotoxin-Genen untersucht wurden, wurden parallel alle Kolonien auf das Vorhandensein des *eae*-Gens geprüft. Dieses ist auf einer Pathogenitätsinsel lokalisiert und somit als stabiler anzusehen. Das für den Haftungsfaktor Intimin codierende Gen gilt als wichtiger Marker zur Abschätzung des Pathogenitäts-

potentials eines Stammes; BÜLTE (2000; 2001) bezeichnet solche *eae*-positiven VTEC auch als „potentielle EHEC“. Durch die parallele Untersuchung wäre also ein potentiell hochpathogenes Isolat auch nach Verlust des *vtx*-Gens über das *eae*-Gen detektiert worden.

### **5.3 Vorkommen von VTEC O157 bei Pferden**

Die vorliegenden Ergebnisse der eigenen Untersuchungen deuten darauf hin, daß Pferde kein Reservoir für verotoxinogene *E. coli* O157-Stämme darstellen. Dies steht in guter Übereinstimmung mit den vorhandenen Literaturdaten, die von einer Nachweishäufigkeit zwischen 0 % und maximal 1,1 % berichten (STEINMANN und KENEL, 1995; HOLLAND et al., 1996; HANCOCK et al., 1998; GALLAND et al., 2001; DERLET und CARLSON, 2002; SANDER, 2002; HEUVELINK et al., 2003). Dabei wurde die höchste Prävalenz (1 von 90; 1,1 %) bei Pferden gefunden, welche auf Rinderfarmen gehalten wurden. Diese Subpopulation unterlag also ggf. einem erhöhten Infektionsdruck durch die räumliche Nähe zu der als Reservoir geltenden Tierart Rind. Unterstützt wird diese Hypothese durch die Tatsache, daß das PFGE-Muster des equinen Isolats mit dem zweier boviner Isolate des gleichen Betriebs identisch war (HANCOCK et al., 1998).

Die Untersuchungen von STEINMANN und KENEL (1995) sowie HOLLAND et al. (1996), die keine *E. coli* O157 nachweisen konnten, beruhten jedoch nicht auf spezifischen Nachweisverfahren für die Serogruppe O157, sondern vielmehr auf der Isolierung und nachfolgenden Charakterisierung von *E. coli*-Stämmen allgemein. Die Sensitivität dieser Vorgehensweise in Bezug auf *E. coli* O157 muß kritisch hinterfragt werden. Die Arbeiten von HANCOCK et al. (1998), GALLAND et al. (2001) sowie DERLET und CARLSON (2002) wurden ohne Verwendung der IMS durchgeführt, so daß auch hierbei die diagnostischen Möglichkeiten nicht voll ausgeschöpft wurden; die Untersuchung von GALLAND et al. (2001) umfaßte zudem nur 24 Tiere. In der Studie von HEUVELINK et al. (2003) hingegen wurde eine Immuno-Konzentrierung mittels des kommerziell erhältlichen VIDAS-ICE (bioMérieux, Lyon, Frankreich) durchgeführt; in dieser vergleichsweise umfangreichen Untersuchung wurde die zweithöchste Nachweisrate von 0,9 % (3 von 334) erhoben. Die ebenfalls recht umfangreiche Studie von SANDER (2002) zielte auf die Serovar-unabhängige Erfassung von VTEC mittels PCR. Nach Angaben der Autorin lag die Nachweisgrenze dieses Verfahrens bei 2 KbE/25 g Pferdefäzes, welche u. a. mit einem Referenzstamm des Serotyps O157:H7 ermittelt wurde; trotzdem konnte in 400 Proben kein *E. coli* O157 gefunden werden.

Aufgrund der Konzentrierung auf Sorbit-negative Kolonien und/oder der Verwendung Tellurit-haltiger Medien kann aus den Arbeiten von HANCOCK et al. (1998), GALLAND et al. (2001), DERLET und CARLSON (2002) sowie HEUVELINK et al. (2003) keine Aussage über das Vorkommen von **SF *E. coli* O157:H<sup>-</sup>** abgeleitet werden. Die Sensitivitäts-Problematik der Untersuchungen von STEINMANN und KENEL (1995) sowie HOLLAND et al. (1996) wurde bereits angesprochen und gilt auch für dieses spezielle

Serovar. Lediglich bei der von SANDER (2002) verwendeten Nachweismethode wäre eine zuverlässige Miterfassung von *E. coli* O157:H<sup>-</sup>-Stämmen zu erwarten. In dieser Studie gelang deren Nachweis jedoch genauso wenig wie in den eigenen Untersuchungen.

Im Gegensatz zur Situation bei Rindern steht bei der VTEC O157-Ausscheidung bei Pferden die direkte **Übertragung auf den Menschen** im Vordergrund. In Deutschland wurden nach Angaben des Statistischen Bundesamtes im Jahr 2003 524.800 Pferde gehalten (STATISTISCHES BUNDESAMT, 2004); Schätzungen der Deutschen Reiterlichen Vereinigung aus dem Jahr 2001 belaufen sich auf mehr als eine Million Pferde und Ponies (FN, 2005). Im Jahr 2002 waren 761.294 Menschen in Reit- und Fahrvereinen organisiert, Schätzungen zufolge betreiben rund 900.000 weitere Menschen regelmäßig Pferdesport. Ca. ein Viertel der Reiter sind jünger als 14 Jahre (FN, 2005). Außerdem werden Pferde und insbesondere Ponies häufig in Streichelzoos gehalten, die in den letzten Jahren vermehrt als Infektionsort bei EHEC-Erkrankungsfällen in Erscheinung getreten sind (CHAPMAN et al., 2000; HEUVELINK et al., 2002; PRITCHARD et al., 2003). Die besondere Problematik liegt im Zusammentreffen der als VTEC-Reservoir geltenden Wiederkäuer sowie weiterer, sporadisch infizierter Tierarten mit der Risikogruppe der (Klein-)Kinder, wobei der enge Kontakt zwischen Mensch und Tier - wie aus der Bezeichnung ersichtlich - das kennzeichnende Merkmal dieser Tierhaltung darstellt. Im Vergleich zur Bedeutung als Sport- und Freizeitpartner spielt die Lebensmittelgewinnung bei diesen Tieren in Deutschland nur eine untergeordnete Rolle. Im Jahr 2002 wurden 12.587 Einhufer inländischer sowie 106 Einhufer ausländischer Herkunft der Schlachtung zugeführt (STATISTISCHES BUNDESAMT, 2003). Der Pro-Kopf-Verzehr an Pferdefleisch lag in den Jahren 1999 bis 2004 zwischen 0,0 und 0,1 kg. Im Vergleich dazu lag der Pro-Kopf-Verzehr für Schweine- und Rindfleisch im gleichen Zeitraum bei 38,9-41,0 kg bzw. 6,8-10,4 kg (ZMP, 2004). Die Gewinnung von Stutenmilch ist mengenmäßig ebenfalls von untergeordneter Bedeutung. Die Anzahl der Stutenmilch-Betriebe wird aktuell auf ca. 40 geschätzt, wobei nach Literaturangaben allerdings nur ca. 10 Betriebe die Produktion in größerem Umfang betreiben. Da ihre Zusammensetzung derjenigen von Frauenmilch ähnelt, findet sie insbesondere als Muttermilchersatz für Säuglinge Verwendung. Dies begründet insofern ein besonderes Risiko, da Stutenmilch aufgrund ihrer Zusammensetzung keiner Pasteurisierung unterzogen werden kann (POLLMANN und FRANZKY, 2004).

## **5.4 Charakterisierung der equinen *E. coli* O157-Isolate**

### **5.4.1 Biochemische Eigenschaften**

Der in den eigenen Untersuchungen gefundene Anteil **Indol**-negativer *E. coli*-Isolate von 7,3 % liegt geringgradig oberhalb der in der Literatur berichteten Werte. Die von BÜLTE und REUTER (1989) überprüften Stämme zeigten sich zu 2,6 % Indol-negativ, FARMER et al. (1985) gaben Werte von 2 % bis 20 % (inaktive Stämme) an. Unter den

von RATNAM et al. (1988) untersuchten *E. coli* O157:H7-Isolaten waren keine Indol-negativen Varianten zu finden, wohingegen *E. coli* anderer Serovare zu 1-4 % kein Indol produzierten.

Ein typisches Merkmal von *E. coli*, welches auch diagnostisch zum Speziesnachweis genutzt wird (AMTLICHE SAMMLUNG [...], 1996), ist die  **$\beta$ -D-Glucuronidase-Aktivität**. Dieses Enzym ist bei 94-96 % aller *E. coli* nachweisbar (KILIAN und BÜLOW, 1979; FENG und HARTMANN, 1982; BÜLTE und REUTER, 1989), darüber hinaus kann es auch vereinzelt bei *Salmonella* spp., *Shigella* spp. sowie *Pseudomonas* spp. gefunden werden (KILIAN und BÜLOW, 1979; BÜLTE und REUTER, 1989). In Übereinstimmung mit diesen Literaturdaten konnte bei allen equinen non-VTEC O157-Isolaten der eigenen Untersuchungen  $\beta$ -D-Glucuronidase-Aktivität nachgewiesen werden. VTEC-Stämmen des Serovars O157:H7 fehlt diese Enzymaktivität typischerweise (RATNAM et al., 1988; ALEKSIC et al., 1992; OSEK, 2004), was auch diagnostisch, beispielsweise beim Hemorrhagic Colitis-Agar nach SZABO (1986), genutzt wird. Vereinzelt wurde jedoch auch von VTEC dieses Serotyps berichtet, welche  $\beta$ -D-Glucuronidase-Aktivität zeigten; teilweise handelte es sich dabei auch um klinische Isolate (ALEKSIC et al., 1992; NAGANO et al., 2002; DONTOROU et al., 2004).

Die Fermentation von **Sorbit** wird bei *E. coli* zu 75 % (inaktive Stämme) bis 94 % beobachtet (FARMER et al., 1985). VTEC des Serovars O157:H7 hingegen zeigen sich typischerweise Sorbit-negativ (RATNAM et al., 1988; ALEKSIC et al., 1992; OSEK, 2004), weshalb bereits kurz nach Entdeckung dieses neuen *E. coli*-Pathovars die Sorbit-Reaktion zum Screening empfohlen wurde (WELLS et al., 1983). Auch heute noch dient sie bei einer Reihe von Nährmedien als Schlüsselreaktion zum *E. coli* O157-Nachweis (HC-Agar nach SZABO, 1986; CT-SMAC-Agar ZADIK et al., 1993). ALEKSIC et al. (1992) beobachteten, daß Sorbit-Fermentation und  $\beta$ -D-Glucuronidase-Aktivität bei *E. coli* O157-Stämmen verschiedener Serotypen vergesellschaftet auftreten. Dies konnte bei den eigenen Untersuchungen nicht bestätigt werden, da sich die equinen *E. coli* O157-Isolate zu 100 %  $\beta$ -D-Glucuronidase-, jedoch nur zu 62,3 % Sorbit-positiv darstellten. Das Vorliegen unterschiedlicher Sorbit- und  $\beta$ -D-Glucuronidase-Reaktionen innerhalb eines Isolats konnte auch von verschiedenen anderen Autoren beobachtet werden (QUINTERO BOTERO, 2003), so beispielsweise bei porcinen *E. coli* O157:H<sup>-</sup>-Stämmen (OSEK et al., 2004), einem caprinen *E. coli* O157:H7-Isolat (DONTOROU et al., 2004) sowie EHEC-Stämmen des gleichen Serovars (NAGANO et al., 2002).

Nach Literaturdaten beherbergen *E. coli* O157:H7/H<sup>-</sup>-Stämme zu 93,3-100 % das *hly*<sub>EHEC</sub>-Gen, jedoch prägen die SF VTEC O157:H<sup>-</sup>-Varianten den enterohämolytischen Phänotyp oftmals nicht aus (SCHMIDT et al., 1995; BOCKEMÜHL et al., 1997; GYLES et al., 1998; MENG et al., 1998; JANKA, 2003). In den eigenen Untersuchungen konnte nach Subkultur auf Blutagar bei keinem der 92 ausgewählten *E. coli* O157-Isolate **Hämolyse** beobachtet werden. Auf eine genotypische Untersuchung wurde jedoch verzichtet, da die Bedeutung des *hly*<sub>EHEC</sub>-Gens für die Pathogenese EHEC-assoziiierter Erkrankungen weiterhin umstritten ist, obgleich es bei der Mehrzahl der klinischen VTEC-Isolate nachgewiesen werden kann (BOERLIN et al., 1999; PRADEL et al., 2000; ADWAN et al., 2002). Das bereits seit längerem bekannte  $\alpha$ -Hämolysin von *E. coli* ist mit extraintestinalen Infektionen assoziiert (BHAKDI et al., 1988). Nach den

Untersuchungen von HOLLAND et al. (1996) zeigten 11,5 % der *E. coli*-Isolate von Diarrhöe-kranken Fohlen Hämolyse, wohingegen von gesunden Fohlen keine hämolytischen *E. coli*-Stämme gewonnen werden konnten.

#### 5.4.2 Untersuchung des H-Antigens

Die Bestimmung des H-Antigens bereitet in der Routine-Diagnostik oftmals Schwierigkeiten, da dieses nur unzuverlässig exprimiert wird, häufig Kreuzreaktionen beobachtet werden und keine kommerziell erhältlichen und somit standardisierten Antisera zur Verfügung stehen (PRAGER et al., 2003). Um diese Probleme zu umgehen, wurden in den letzten Jahren verschiedene genotypische Methoden zum Nachweis des H7-Typs entwickelt (FIELDS et al., 1997; WANG et al., 2000; JOHNSON und STELL, 2001). In den eigenen Untersuchungen wurde der RFLP-Test nach FIELDS et al. (1997) eingesetzt, welchem eine gute Übereinstimmung mit der klassischen Serotypisierung bescheinigt wird (PRAGER et al., 2003). Neben der zuverlässigen Identifizierung von *E. coli* O157:H7-Stämmen ermöglicht er die Klassifizierung unbeweglicher (H<sup>-</sup>) sowie nicht-typisierbarer (H<sup>nt</sup>) Isolate. VTEC O157:H<sup>-</sup> und VTEC O157:H<sup>nt</sup>-Isolate konnten mit dieser Methode bereits als „genetische H7“-Stämme identifiziert werden. Der unbewegliche Phänotyp von SF *E. coli* O157:H<sup>-</sup>-Stämmen wird auf eine 12 bp-umfassende Deletion im *flhC*-Gen zurückgeführt (MONDAY et al., 2004). Die 92 ausgewählten *E. coli*-Isolate aus den eigenen Untersuchungen zeigten drei unterschiedliche RFLP-Muster, wobei von sieben Isolaten kein Amplifikat erhalten werden konnte. Dabei stimmte keines der Restriktionsmuster mit dem für *E. coli* O157:H7 und O157:H<sup>-</sup> charakteristischen Bild überein. Da sich die Publikation von FIELDS et al. (1997) primär auf den Nachweis von H7-Stämmen konzentriert, ist eine Zuordnung der erhaltenen Restriktionsmuster zu anderen Serotypen nicht möglich.

#### 5.4.3 Verwandtschaftsgrad

Zur Untersuchung der Ähnlichkeit der erhaltenen equinen *E. coli* O157-Isolate untereinander sowie im Vergleich mit Referenzstämmen wurde in den eigenen Untersuchungen das Verfahren der Pulsfeldgelelektrophorese gewählt. Diese Subtypisierungsmethode wurde erstmals von SCHWARTZ und CANTOR (1984) beschrieben und seitdem bei vielen Bakterien-Spezies erfolgreich angewandt (STROCKBINE et al., 1998). BÖHM und KARCH (1992) erprobten ihre Zweckmäßigkeit zur Typisierung von VTEC -Stämmen des Serovars O157:H7. Nach Überprüfung verschiedener Restriktionsendonukleasen erwies sich das Enzym *Xba* I, welches auch in den eigenen Untersuchungen verwendet wurde, zur Differenzierung dieser Stämme am geeignetsten. Während die Autoren zu dem Schluß kamen, bei *E. coli* O157:H7 handele es sich um einen hoch konservierten Klon, der sich mittels PFGE nur unzureichend untergliedern lasse, konnte die Nützlichkeit des Verfahrens inzwischen doch in zahlreichen Studien unterstrichen werden. Im direkten Vergleich mit anderen Typisierungsmethoden wurde der PFGE eine sehr große „discriminatory power“ bescheinigt, so daß sie heute als „gold standard“ angesehen wird (RADU et al., 2001; GIAMMANCO et al., 2002; HAHM et al., 2003; MILCH et al., 2003; FOLEY et al., 2004).

Besonders hilfreich hat sie sich bei der Aufklärung von Ausbrüchen erwiesen (BARRETT et al., 1994; TSUJI et al., 2002; BRUCE et al., 2003; VARMA et al., 2003), also bei der Typisierung von räumlich und/oder zeitlich meist eng assoziierten Isolaten. Darüber hinaus wird sie, wie in den eigenen Untersuchungen, zur Ermittlung der genetischen Verwandtschaft zwischen Stämmen verwendet, welche in keinem erkennbaren epidemiologischen Zusammenhang stehen (KRAUSE et al., 1996; BÖHM, 2000; QUINTERO BOTERO, 2003). Derartige Applikationen werden jedoch von einigen Autoren kritisch betrachtet, da sich die Interpretation der erhaltenen PFGE-Muster schwierig gestaltet und keineswegs einheitlich gehandhabt wird. Bereits ein einzelnes genetisches Ereignis kann - muß aber nicht - zwei bis drei Fragmente des Restriktionsmusters verändern. Nach den vielzitierten Auswertungskriterien von TENOVER et al. (1995) sind solche Isolate als „closely related“ zu bewerten. Stämme, deren PFGE-Muster sich in vier bis sechs Banden unterscheiden, werden dementsprechend als „possibly related“ kategorisiert, da solche Veränderungen bereits durch zwei genetische Ereignisse hervorgerufen werden können. Die Autoren betonen jedoch, daß diese Interpretationshilfe speziell für die Anwendung bei Ausbruchsuntersuchungen bestimmt ist, bei denen eine überschaubare Anzahl zeitlich und räumlich assoziierter Isolate verglichen werden soll. Basierend auf den TENOVER-Kriterien bewerteten KARIUKI et al. (1999) Isolate mit einem DICE-Koeffizienten von über 60 % als „possibly closely related“. KRAUSE et al. (1996) hingegen betrachten Isolate mit einem DICE-Koeffizienten unter 95 % bereits als Subklone.

Anhand der PFGE-Muster ließen sich die 92 equinen Isolate aus den eigenen Untersuchungen in acht Cluster unterteilen, die jeweils einen DICE-Koeffizienten zwischen  $67,8 \pm 9,1$  und  $88,0 \pm 0,0$  aufwiesen; zwei dieser „Cluster“ bestanden jedoch lediglich aus je einem Isolat. Die Clusterbildung spiegelte größtenteils auch biochemische Ähnlichkeit bzw. gleiche *fliC*-RFLP-Profile innerhalb der Isolat-Gruppen wieder. Lediglich Cluster a setzte sich aus Stämmen zusammen, welche unterschiedliche Indol-Reaktionen zeigten. Derart differierende Stämme wiesen teilweise sogar identische PFGE-Profile auf. Dieses Phänomen der phänotypischen Unterscheidbarkeit zwischen Isolaten mit übereinstimmenden PFGE-Mustern wurde bereits von anderen Autoren beschrieben. So konnten innerhalb eines PFGE-Typs beispielsweise unterschiedliche Phagen- oder Serotypen beobachtet werden (LIEBANA et al., 2003; QUINTERO BOTERO, 2003). Trotz der hohen „discriminatory power“ der PFGE bleiben genetische Ereignisse wie Punktmutationen oder Rearrangements, sofern sie außerhalb der Restriktionsstellen stattfinden, bei dieser Typisierungsmethode unbemerkt.

Biochemische Eigenschaften und *fliC*-Polymorphismen schienen untereinander ebenfalls korreliert. Die Gesamtheit der Sorbit-negativen Stämme, welche gleichzeitig als einzige das *fliC*-RFLP-Profil B aufwiesen, bildete Cluster e. Cluster g beinhaltete ausschließlich Stämme des biochemischen Profils 2, welche sich von den restlichen Isolaten zudem durch die fehlende Amplifizierung in der *fliC*-PCR abgrenzten. Das einzige Isolat, welches das *fliC*-RFLP-Profil C zeigte und dem biochemischen Profil 3 zuzuordnen war, unterschied sich auch im PFGE-Muster deutlich von den anderen Stämmen und bildete das eigenständige „Cluster“ c. Sorbit- und Indol-positive Isolate, welche ausschließlich das *fliC*-Profil A aufwiesen, verteilten sich auf die Cluster a, b, d, f und h.

Der *E. coli* O157:H7-Referenzstamm EDL 933 ließ sich keinem der genannten Cluster zuordnen. Die größte Ähnlichkeit (DICE-Koeffizient 72,7 %) zeigte er zu dem Sorbit-positiven und Indol-negativen Isolat mit dem biochemischen Profil 3 und dem *fliC*-RFLP-Profil c. Das Restriktionsmuster dieses Isolats beinhaltet im Bereich von 220-300 kb jedoch nicht die fünf charakteristischen Banden, die bei der Mehrzahl der VTEC O157:H7-Stämme zu finden sind (BÖHM und KARCH, 1992; QUINTERO BOTERO, 2003). Der von Minipferden gewonnene SF *E. coli* O157:H7-Referenzstamm 3547/99 konnte ebenfalls in kein vorgegebenes Cluster integriert werden. Die größte Ähnlichkeit ( $69,8 \pm 4,5$  %) bestand zum Cluster g, welches die *fliC*-PCR-negativen Isolate beinhaltet. Die Restriktionsmuster dieses Clusters zeigten jedoch nicht die für SF VTEC O157:H7-Stämme typischen fünf Banden im Bereich von 190-290 kb (BÖHM, 2000). Berücksichtigt man die Ergebnisse von DAVIS et al. (2003) sowie SINGER et al. (2004), so muß in Betracht gezogen werden, daß die mit Software-Hilfe ermittelten Ähnlichkeitswerte möglicherweise zu hoch angesetzt sind. Nach DAVIS et al. (2003) stellt der unter Verwendung eines einzigen Restriktionsenzym ermittelte DICE-Koeffizient nur einen unzureichenden Schätzwert des genetischen Verwandtschaftsgrades dar. Die Autoren konnten zeigen, daß als identisch bewertete Fragmente („matching bands“) nicht notwendigerweise homologes genetisches Material repräsentieren. Das mangelhafte Auflösungsvermögen von Fragmenten ähnlicher Größe trägt zusätzlich zur Gefahr von Fehlpaarungen bei. Auch SINGER et al. (2004) konnten anhand einer Computersimulation zeigen, daß solche Fehlzuordnungen zu hohe Ähnlichkeitswerte vortäuschen können.

Unter Zugrundelegung der phäno- sowie genotypischen Merkmale muß also geschlußfolgert werden, daß die equinen Isolate der eigenen Untersuchungen weder als klonale Varianten des VTEC O157:H7-Stammes EDL 933, noch des equinen SF VTEC O157:H7-Stammes 3547/99 anzusehen sind.

## **5.5 Bedeutung der Serogruppe O157**

Da die ersten bekanntgewordenen EHEC-Ausbrüche auf das Serovar O157:H7 zurückzuführen waren (RILEY et al., 1983; CARTER et al., 1987; MORGAN et al., 1988), wurde die Serotyp-Bezeichnung mit dem neu etablierten Pathovar gleichgesetzt. Auch wenn das Verotoxinbildungsvermögen in der Zwischenzeit bei über 250 unterschiedlichen Serotypen nachgewiesen werden konnte (BETTELHEIM, 2004), so wird doch insbesondere im angloamerikanischen Sprachraum weiterhin die Bezeichnung „*E. coli* O157“ anstelle der Begriffe „VTEC“, „STEC“ oder „EHEC“ verwendet. Begründet wird dies häufig mit der regional unterschiedlichen Verteilung der einzelnen VTEC-Serovare. Während beispielsweise in Deutschland und anderen Ländern Kontinentaleuropas sowie Australien non-O157-VTEC dominieren (ELLIOTT et al., 2001a; STATENS SERUM INSTITUT, 2003; RKI, 2004a), entfällt die Mehrzahl der amerikanischen und britischen EHEC-Isolate auf die Serogruppe O157 (WHO, 1997; WHO, 1998; LOCKING et al., 2003). Unbestritten ist die besondere Virulenz der VTEC O157:H7-Stämme. Bei schwerwiegenden Krankheitsverläufen wie dem HUS dominieren sie beinahe weltweit (DECLUDT et al., 2000; BANATVALA et al., 2001; GERBER et

al., 2002; Tozzi et al., 2003; RKI, 2004a). Aufgrund der besonderen historischen und klinischen Bedeutung erscheint es gerechtfertigt, *E. coli* O157:H7 als „Prototyp“ der EHEC zu bezeichnen (BÜLTE und HECKÖTTER, 1997). Eine Gleichsetzung der beiden Begriffe wird den tatsächlichen Gegebenheiten allerdings nicht gerecht. Aus diesem Grund wird mittlerweile auch international verstärkt gefordert, eine Serovar-unabhängige Diagnostik zu betreiben und die Verotoxinogenität als Leitmerkmal zu verwenden (WHO, 1998; ACHESON, 2000; FRUTH et al., 2000; EKLUND et al., 2001; RKI und BgVV, 2001; BETTELHEIM und BEUTIN, 2003; SCVPH, 2003).

### 5.5.1 Verotoxin-negative *E. coli* O157

Während der Gruppe der non-O157-VTEC immer mehr Beachtung zukommt, wird der umgekehrte Fall der non-VTEC O157, also *E. coli*-Stämmen der Serogruppe O157 ohne Verotoxinbildungsvermögen, nur selten diskutiert. Dabei ist die serologische Unterteilung der *E. coli*-Stämme nicht deckungsgleich mit der Unterteilung in Pathovaren (RKI, 2002c). Innerhalb der Serogruppe O157 wurden neben VTEC- bzw. EHEC-Isolaten auch Vertreter gefunden, die aufgrund ihres Virulenzspektrums den EPEC (SCHMIDT et al., 1993a; BAUWENS et al., 2000; STEPHAN et al., 2004) bzw. den ETEC (WISLON und FRANCIS, 1986) zuzuordnen sind.

In den eigenen Untersuchungen wurden aus 61,0 % der Pferdekotproben *vtx*-negative *E. coli* O157 nachgewiesen. Dabei ist aber in Betracht zu ziehen, daß keines dieser Isolate bei der für den HC-Agar gebräuchlichen Auswertung detektiert worden wäre. Üblicherweise werden nur Sorbit- und  $\beta$ -D-Glucuronidase-negative Kolonien weiter untersucht; von dieser Vorgehensweise wurde abgewichen, um auch SF *E. coli* O157:H<sup>-</sup> mitzuerfassen. Die vorliegenden Isolate waren jedoch ausnahmslos  $\beta$ -D-Glucuronidase-positiv und zudem zu 62,3 % Sorbit-positiv. Solche O157-Stämme, denen EHEC-typische Virulenzfaktoren fehlen, wurden auch von zahlreichen anderen Autoren in verschiedenen Matrices gefunden, so beispielsweise in Fäzes von Rindern, Schweinen und Truthähnen, auf Rinderschlachttierkörpern sowie in Rinder- und Schweinehackfleisch, Rohwurst und Geflügelprodukten (HEUVELINK et al., 1996; CHAPMAN et al., 1997; HEUVELINK et al., 1999; CHAPMAN et al., 2001; GALLAND et al., 2001; PICHNER et al., 2001; ROGERI et al., 2001; MØLLER-NIELSEN und SCHEUTZ, 2002; BARKOCY-GALLAGHER et al., 2004). Ein Teil der Isolate beherbergte das *eae*-Gen. Im Gegensatz zu den eigenen Isolaten handelte es sich teilweise sogar um *E. coli* des Serotyps O157:H7 (HEUVELINK et al., 1999; BARKOCY-GALLAGHER et al., 2004). Im Vergleich zur vorliegenden Arbeit wurden *vtx*-negative *E. coli* O157 dabei jedoch meist nur aus einem geringen Prozentsatz der untersuchten Proben isoliert. So entdeckten MØLLER-NIELSEN und SCHEUTZ (2002) in 11,7 % der untersuchten Rinderfarmen Tiere, die *vtx*-negative *E. coli* O157 ausschieden. ROGERI et al. (2001) isolierten von 0,5 % der untersuchten Rinder solche Isolate. HEUVELINK et al. (1999) wiesen bei 0,7 % der Schweine und 1,1 % der Truthahn-Sammelkotproben *vtx*- und *eae*-negative *E. coli* O157-Stämme nach. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch CHAPMAN et al. (1997), die bei 0,4 % der untersuchten Schweine solche Isolate fanden.

Die klinische Bedeutung der *vtx*-negativen *E. coli* O157 ist schwierig abzuschätzen. Obgleich das Fehlen eines EHEC-typischen Virulenzprofils solche Stämme in der theoretischen Überlegung in Bezug auf das EHEC-Geschehen als apathogen erscheinen läßt (CHAPMAN et al., 1997), wurden bereits mehrfach *vtx*-negative SF *E. coli* O157:H<sup>-</sup>-Stämme in Zusammenhang mit menschlichen Erkrankungsfällen nachgewiesen. Neben dem Auftreten unblutiger Diarrhöen wurde auch von HUS-Fällen berichtet. Soweit untersucht, beherbergen solche Stämme das *eae*-Gen, oftmals auch das *hly*<sub>EHEC</sub>-Gen (SCHMIDT et al., 1999b; ALLERBERGER et al., 2000; KARCH und BIELASZEWSKA, 2001; CHAKRABORTY et al., 2003). Die tatsächliche Bedeutung dieser Stämme für das Krankheitsgeschehen beim Menschen sowie der zugrunde liegende Pathomechanismus werden momentan noch nicht verstanden. Eine Erklärungsmöglichkeit wird im Vorliegen eines bislang noch nicht identifizierten Virulenzfaktors gesehen (KARCH und BIELASZEWSKA, 2001). Prinzipiell muß in Betracht gezogen werden, daß es sich bei diesen Stämmen um VTEC handelte, die als solche die Krankheit ausgelöst, ihr *vtx*-Gen jedoch während der Isolierung verloren haben. Die Instabilität der Phagen-codierten *vtx*-Gene ist bei non-O157-VTEC unter Laborbedingungen demonstriert worden (KARCH et al., 1992). Für *E. coli* O157:H7-Stämme wird dies ebenfalls vermutet (FENG et al., 2001). Dieser These steht jedoch entgegen, daß in einem solchen Fall der Verozelltest der Stuhlproben mit hoher Wahrscheinlichkeit positiv ausgefallen wäre (SCHMIDT et al., 1999b) bzw. in der Primärkultur neben den *vtx*-negativen Varianten wahrscheinlich noch weitere, *vtx*-positive Isolate gefunden worden wären (ALLERBERGER et al., 2000). Genotypisch stellten sich diese *vtx*-negativen SF *E. coli* O157:H<sup>-</sup>-Isolate sehr ähnlich (SCHMIDT et al., 1999b) bzw. identisch wie die *vtx*-positiven SF *E. coli* O157:H<sup>-</sup>-Referenzstämme dar (ALLERBERGER et al., 2000).

Die Zusammenhänge der Begriffe „VTEC“ und „*E. coli* O157“ sind in Abbildung 15 nochmals schematisch dargestellt. Wie daran ersichtlich, entzieht sich durch Einsatz Serovar-bezogener Nachweismethoden ein nicht unerheblicher Teil der VTEC-Stämme *a priori* der Detektion. Vor dem Hintergrund der EHEC-Epidemiologie wären solche Ergebnisse als falsch-negativ zu bezeichnen. Andererseits beinhalten Serovar-bezogene Verfahren ein unnötig erhöhtes Risiko für Ergebnisse, die im Hinblick auf das eigentliche Untersuchungsziel als falsch-positiv zu werten sind. Denn trotz vereinzelter Nachweise *vtx*-negativer *E. coli* O157-Stämme bei menschlichen Erkrankungsfällen, bei denen ein Kausalzusammenhang jedoch keineswegs als gesichert gilt, muß wohl bei der Mehrzahl *vtx*- und *eae*-negativer Isolate dieser Serogruppe davon ausgegangen werden, daß sie in Bezug auf das EHEC-Geschehen als apathogen anzusprechen sind (CHAPMAN et al., 1997). Der Aussagewert bezüglich der klinischen Bedeutung eines positiven Screening-Ergebnisses, das lediglich auf dem Nachweis der Serogruppe O157 beruht, ist vorsichtig zu betrachten. Das gleiche gilt für die an Bedeutung zunehmenden molekularbiologischen Screeningmethoden, die auf der Detektion von O157-spezifischen Gensequenzen beruhen. In beiden Fällen muß sich zur Abschätzung des tatsächlichen Virulenzpotentials eine weitergehende Untersuchung der Isolate anschließen. Aus den genannten Gründen empfiehlt sich in der VTEC-/EHEC-Diagnostik eine Verlagerung des „target“, weg von Serovar-abhängigen Verfahren, hin zu Verotoxinogenität als Leitmerkmal.

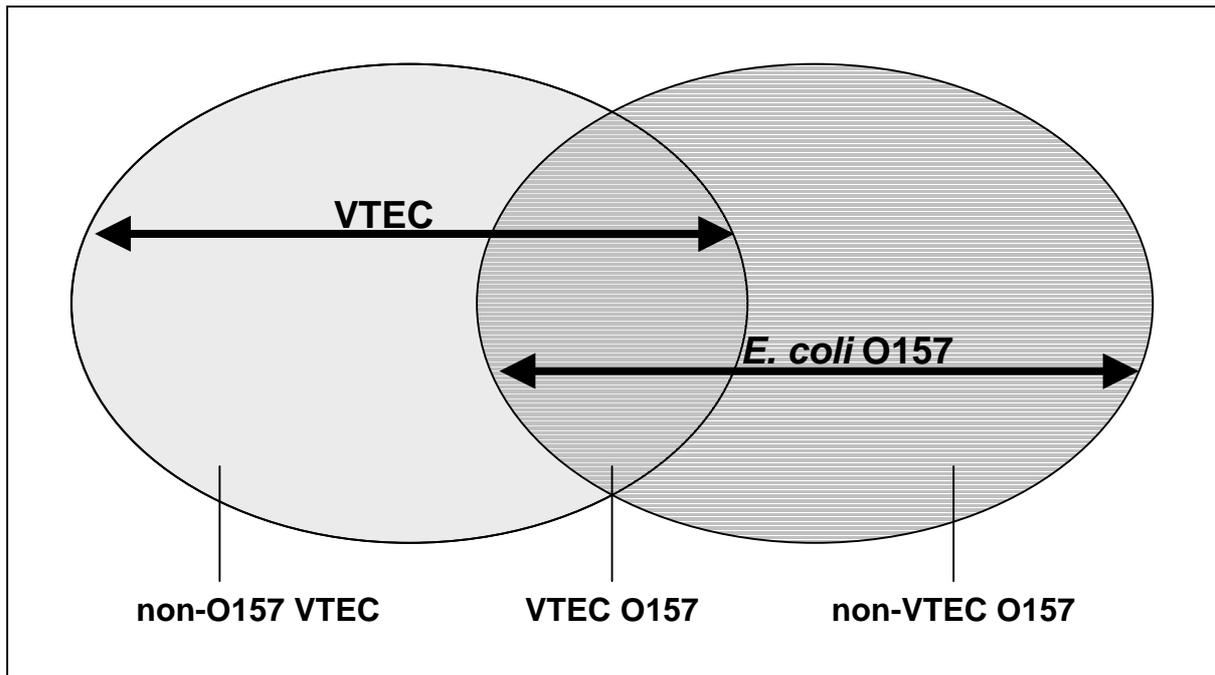


Abbildung 15: Schematische Darstellung der Beziehung zwischen Verotoxin-bildenden *Escherichia coli* (VTEC) und *E. coli* O157 (nach SCVPH, 2003)

## 6 SCHLUSSFOLGERUNGEN

- Zur Untersuchung von Pferdekotproben auf *E. coli* O157 ist die selektive Anreicherung in Kombination mit der immunomagnetischen Separation (IMS) dem Direktausstrich überlegen. Dabei erweist sich die modifizierte Trypton-Soja-Bouillon (mTSB) geringfügig besser geeignet als die gram negative broth nach HAJNA (GN).
- *E. coli* der Serogruppe O157 sind regelmäßig in Pferdekotproben nachweisbar. Dabei handelt es sich allerdings um Isolate, denen die EHEC-typischen Virulenzgene für Verotoxin- und Intiminbildung fehlen. Phäno- und genotypisch unterscheiden sie sich deutlich von typischen Vertretern der VTEC O157:H7/H<sup>-</sup>.
- Nach den vorliegenden Untersuchungen scheinen Pferde kein Reservoir für verotoxinogene *E. coli* O157:H7/H<sup>-</sup> darzustellen.
- Das Reservoir des v. a. in Deutschland verbreiteten Klons der Sorbit-fermentierenden VTEC O157:H<sup>-</sup> ist immer noch unbekannt.
- Die Begriffe „VTEC“ bzw. „EHEC“ und „*E. coli* O157“ können nicht synonym gebraucht werden. Einerseits ist das Verotoxinbildungsvermögen nicht auf die Serogruppe O157 beschränkt, andererseits ist nicht jeder *E. coli* dieser Serogruppe zur Verotoxinbildung befähigt. Dies ist bei der Auswahl geeigneter Nachweismethoden und der Interpretation der erhaltenen Ergebnisse zu berücksichtigen. Der alleinige Nachweis von *E. coli*-Stämmen der Serogruppe O157 erlaubt ohne weitergehende Untersuchungen zum Pathogenitätspotential noch keine Aussage zur Bedeutung als möglicher Krankheitserreger.

## 7 ZUSAMMENFASSUNG

Wiederkäuer gelten als Hauptreservoir der verotoxinogenen *Escherichia coli* (VTEC). Die als potentiell hochvirulent einzustufenden Serovare O157:H7 und O157:H<sup>-</sup> werden in Deutschland jedoch nur sehr selten bei landwirtschaftlichen Nutztieren nachgewiesen. In geringerem Umfang können VTEC auch bei anderen Haus- und Wildtierspezies isoliert werden. In der Literatur finden sich Berichte über den Nachweis von *E. coli* O157 bei Pferden, die in Zusammenhang mit humanen Erkrankungsfällen standen. In Bayern wurde ein Sorbit-fermentierender (SF) *E. coli* O157:H<sup>-</sup>-Stamm bei Minipferden isoliert, die als Infektionsquelle für ein an hämolytisch-urämischem Syndrom (HUS) erkranktes Kind vermutet wurden. Bislang konnte das Reservoir dieser offenbar hochvirulenten SF *E. coli* O157:H<sup>-</sup>-Stämme noch nicht identifiziert werden; bei Wiederkäuern gelang der Nachweis solcher Stämme nur vereinzelt. Aufgrund biochemischer Unterschiede wird dieser Klon von den für *E. coli* O157:H7 gebräuchlichen kulturellen Verfahren nicht erfaßt. In der vorliegenden Arbeit sollte nun das Vorkommen von *E. coli* der Serogruppe O157 unter besonderer Berücksichtigung der SF *E. coli* O157:H<sup>-</sup>-Stämme bei Pferden untersucht werden.

In die eigenen Untersuchungen wurden 100 Pferdekotproben einbezogen, die überwiegend aus Hessen und angrenzenden Regionen stammten. Zur Optimierung der Nachweismethodik wurden die ersten 51 Proben vergleichend in zwei Selektivanreicherungen (modifizierte Trypton-Soja-Bouillon [mTSB] und gram negative broth [GN] nach HAJNA) in Kombination mit der immunomagnetischen Separation (IMS), sowie im Direktausstrich ohne IMS untersucht. Die Subkultivierung erfolgte in allen Ansätzen auf Hemorrhagic Colitis-Agar nach SZABO (HC), da dieser auch das Wachstum Tellurit-sensitiver Organismen wie SF *E. coli* O157:H<sup>-</sup>-Isolate erlaubt. Um letztere mitzuerfassen, wurden nach Subkultivierung zusätzlich zu den jeweils zehn Sorbit-negativen Kolonien auch zehn Sorbit-positive Kolonien mit einem kommerziell erhältlichen *E. coli* O157-Latex-Test überprüft.

Da mit der Kombination mTSB-Bouillon und IMS 94,1 % aller insgesamt *E. coli* O157-positiven Proben erfaßt werden konnten, wurde diese Untersuchungsvariante für die nachfolgenden 49 Fäzesproben ausschließlich eingesetzt. Im Vergleich konnten mit der Kombination GN-Bouillon und IMS 82,4 %, bzw. mit dem Direktausstrich ohne IMS 2,9 % der insgesamt als positiv erkannten Proben ermittelt werden.

Präsumtive *E. coli* O157-Isolate wurden nach biochemischer Bestätigung mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) auf Verotoxin- und *eae*-Gen(e) untersucht. Bei einer repräsentativen Auswahl an Isolaten, darunter mindestens einem aus jeder positiven Fäzesprobe, wurde weiterhin die Serogruppenzugehörigkeit durch PCR bestätigt, das für das H-Antigen codierende *fliC*-Gen mit Hilfe eines Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus-Tests (RFLP) charakterisiert, sowie die Fähigkeit zur Hämolyse überprüft. Weiterhin wurde der Grad der genetischen Verwandtschaft

der Isolate untereinander sowie im Vergleich zu zwei Referenzstämmen mittels Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) untersucht.

In 61 Proben (61%) konnten mit O157-Antiserum agglutinierende Kolonien nachgewiesen und genotypisch bestätigt werden. Von insgesamt 329 Isolaten zeigten 205 Sorbit-Fermentierung (62,3%), 124 waren Sorbit-negativ (37,7%). Alle zeigten auf HC-Agar Fluoreszenz. 24 Isolate (7,3%) waren Indol-negativ und biochemisch nicht eindeutig als *E. coli* zu identifizieren. Bei keinem der Isolate konnte das *eae*-Gen oder Verotoxin-Gene detektiert werden; ebenso war keine Hämolyse zu beobachten. Die Restriktionsmuster waren nicht mit dem von O157:H7-Stämmen identisch. In der PFGE zeigten die 92 untersuchten Isolate 53 verschiedene Restriktionsmuster, die sich zu acht Clustern zusammenfassen ließen. Die zwei einbezogenen Referenzstämmen, ein O157:H7-Isolat sowie ein von den o. e. Minipferden gewonnenes SF VTEC O157:H<sup>-</sup>-Isolat, konnten jedoch keinem Cluster zugeordnet werden.

Nach diesen Untersuchungen stellen Pferde kein Reservoir für verotoxinogene *E. coli* O157:H7/H<sup>-</sup> dar. Auffallend ist jedoch das regelmäßige Auftreten von Verotoxin-negativen Isolaten dieser Serogruppe. Das Vorkommen solcher Isolate wurde in der Literatur bereits bei einer Vielzahl unterschiedlicher Probenarten beschrieben, wenngleich nicht mit der hier gefundenen Häufigkeit. Bei Untersuchungsmethoden, die lediglich auf dem Nachweis der Serogruppe O157 beruhen, ist also bei der Interpretation eines positiven Befundes Vorsicht geboten. Ohne weitergehende Untersuchungen zum Pathogenitätspotential läßt sich daraus noch keine Bedeutung als möglicher Krankheitserreger ableiten. Diese Ergebnisse unterstützen die Forderung nach Serovar-unabhängigen VTEC-Nachweismethoden.

## 8 SUMMARY

Ruminants are regarded as the main reservoir of verocytotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC). The serotypes O157:H7 and O157:H<sup>-</sup>, which must be considered potentially highly virulent, are rarely detected in German livestock. To a lesser extent, VTEC can also be isolated from companion animals and wildlife. There are reports about the detection of *E. coli* O157 in horses, which were connected with illness in humans. In Bavaria, a sorbitol-fermenting (SF) *E. coli* O157:H<sup>-</sup>-strain was isolated from ponies, which were considered to be the source of infection for a child suffering from hemolytic uremic syndrome (HUS). Up to now, the reservoir of these obviously highly virulent SF *E. coli* O157:H<sup>-</sup>-strains could not be identified. They could only occasionally be found in ruminants. Because of biochemical differences, this clone cannot be detected by the cultural methods usually applied for *E. coli* O157:H7. In this work, the occurrence of *E. coli* O157 in horses, with special emphasis on SF *E. coli* O157:H<sup>-</sup>, was investigated.

Investigations included 100 fecal samples which had been collected from horses in Hesse and neighbouring regions. To optimize the detection method, the first 51 samples were examined with two different selective enrichment media (modified tryptic soy broth [mTSB] and gram negative broth [GN] according to HAJNA), both combined with the immunomagnetic separation technique (IMS), and additionally by direct plating without IMS. Subcultivation was performed in all cases on hemorrhagic colitis-agar according to SZABO (HC), because this medium allows growth of tellurite-sensitive organisms like SF *E. coli* O157:H<sup>-</sup>-isolates. To include the latter, ten sorbitol-positive colonies were tested with a commercially available *E. coli* O157 latex test kit after subcultivation, in addition to ten sorbitol-negative colonies, respectively.

Because 94,1 % of all *E. coli* O157-positive samples could be detected by the combination of mTSB and IMS, this method was solely applied to the following 49 fecal samples. With the combination of GN-broth and IMS respectively with direct plating without IMS, only 82,4 % respectively 2,9 % of all positive samples could be detected.

After biochemical confirmation, presumptive *E. coli* O157-isolates were tested for verocytotoxin- and *eae*-gene(s) by polymerase-chain-reaction (PCR). A representative subset of strains, including at least one strain of each positive sample, was further examined. The serogroup was confirmed by PCR, the *fliC*-gene, coding for the H-antigen, was characterized by restriction fragment length polymorphism (RFLP), and the ability for hemolysis was tested. Additionally, the degree of genetic relatedness among the isolates themselves and in comparison with two reference strains was examined by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE).

In 61 samples (61 %), colonies could be found which showed agglutination with O157-antiserum and were confirmed genotypically. Of a total of 329 isolates, 205 isolates showed sorbitol-fermentation (62,3 %), 124 were sorbitol-negative (37,7 %). All showed fluorescence on HC-agar. 24 isolates (7,3 %) were indole-negative and

could not definitely be identified as *E. coli* by biochemical reactions. The *eae*-gene or verocytotoxin-genes were not detected in any isolate; hemolysis was not observed either. The restriction patterns were not identical with that of O157:H7-strains. The 92 strains showed 53 different PFGE-restriction patterns, which could be grouped in eight clusters.

According to these results, horses cannot be regarded as a significant reservoir for verocytotoxigenic *E. coli* O157:H7/H<sup>-</sup>. However, the regular occurrence of verocytotoxin-negative isolates of this serogroup is remarkable. The detection of such isolates has been described in the literature for a multitude of different matrices, though not with the frequency found in this work. Positive results of examination methods, which only rely on the detection of serogroup O157, must be interpreted with care. A significance as potential pathogen cannot be deduced without further examinations of the virulence profile. These results support the demand for serotype-independent detection methods for VTEC.

## 9 LITERATURVERZEICHNIS

- ABAAS, S., A. FRANKLIN, I. KUHN, F. ORSKOV und I. ORSKOV  
Cytotoxin activity on vero cells among *Escherichia coli* strains associated with diarrhea in cats  
Am. J. Vet. Res. 50, 1294 - 1296 (1989)
- ABDUCH FÁBREGA, V. L., A. J. PIANTINO FERREIRA, F. REIS DA SILVA PATRICIO, C. BRINKLEY und I. C. A. SCALETSKY  
Cell-detaching *Escherichia coli* (CDEC) strains from children with diarrhea: identification of a protein with toxigenic activity  
FEMS Microbiol. Lett. 217, 191 - 197 (2002)
- ABDULMAWJOOD, A. und M. BÜLTE  
Optimization of the polymerase chain reaction (PCR) for the detection of verocytotoxin type 2d  
Proc. 41. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG), Eigenverlag der DVG, Gießen, 389- 394 (2000)
- ABDULMAWJOOD, A. und M. BÜLTE  
Evaluation of a PCR system for the detection of *E. coli* O157 based on *rfbE* O157 gene  
Proc. 42. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG), Eigenverlag der DVG, Gießen, 362- 367 (2001)
- ABDULMAWJOOD, A., M. BÜLTE, N. COOK, S. ROTH, H. SCHÖNENBRÜCHER und J. HOORFAR  
Toward an international standard for PCR-based detection of foodborne *Escherichia coli* O157 - Part 1. Assay development and multi-center validation  
J. Microbiol. Methods 55, 775 - 786 (2003)
- ABDULMAWJOOD, A., M. BÜLTE, S. ROTH, H. SCHÖNENBRÜCHER, N. COOK, M. D'AGOSTINO, M. BURKHARD, K. JORDAN, S. PELKONEN und J. HOORFAR  
Toward an international standard für PCR-based detection of foodborne *Escherichia coli* O157: validation of the PCR-based method in a multicenter interlaboratory trial  
J. AOAC Int. 87, 856 - 860 (2004)
- ABE, K., S. YAMAMOTO und K. SHINAGAWA  
Economic impact of an *Escherichia coli* O157:H7 outbreak in Japan  
J. Food Prot. 65, 66 - 72 (2002)
- ACHESON, D. W. K.  
Nomenclature of enterotoxins  
Lancet 351, 1003 (1998)
- ACHESON, D. W. K.  
How does *Escherichia coli* O157:H7 testing in meat compare with what we are seeing clinically?  
J. Food Prot. 63, 819 - 821 (2000)
- ACHESON, D. W. K., L. L. LINCICOME, S. DE BREUCKER und G. KEUSCH  
Detection of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* in ground beef and milk by commercial enzyme immunoassay  
J. Food Prot. 59, 344 - 349 (1996)

- ADACHI, J. A., Z. D. JIANG, J. J. MATHEWSON, M. P. VERENKAR, S. THOMPSON, F. MARTINEZ-SANDOVAL, R. STEFFEN, C. D. ERICSSON und H. L. DU PONT  
Enteroaggregative *Escherichia coli* as a major etiologic agent in traveler's diarrhea in 3 regions of the world  
Clin. Infect. Dis. 15, 1706 - 1709 (2001)
- ADU-BOBIE, J., G. FRANKEL, C. BAIN, A. G. GONCALVES, L. R. TRABULSI, G. DOUCE, S. KNUTTON und G. DOUGAN  
Detection of intimins  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , and  $\delta$ , four intimin derivatives expressed by attaching and effacing microbial pathogens  
J. Clin. Microbiol. 36, 662 - 668 (1998)
- ADWAN, K., N. ABU-HASAN, T. ESSAWI und M. BDIR  
Isolation and characterisation of Shiga toxinogenic *Escherichia coli* strains from northern Palestine  
J. Med. Microbiol. 51, 332 - 335 (2002)
- AGIN, T. S. und M. K. WOLF  
Identification of a family of intimins common to *Escherichia coli* causing attaching-effacing lesions in rabbits, humans, and swine  
Infect. Immun. 65, 320 - 326 (1997)
- AHMED, R., C. BOPP, A. BORCZYK und S. KASATIYA  
Phage-typing scheme for *Escherichia coli* O157:H7  
J. Infect. Dis. 155, 806 - 809 (1987)
- AIZAWA, S.-I.  
Bacterial flagella and type III secretion systems  
FEMS Microbiol. Lett. 202, 157 - 164 (2001)
- AKADEMIE FÜR DAS ÖFFENTLICHE GESUNDHEITSWESEN IM BAYERISCHEN STAATSMINISTERIUM FÜR ARBEIT UND SOZIALORDNUNG, FAMILIE, FRAUEN UND GESUNDHEIT  
Bericht über Infektionen mit Enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC) in Bayern  
Blätter zur Fortbildung Nr. 14 (1998)
- ALBERT, M. J., S. M. FARUQUE, A. S. FARUQUE, K. A. BETTELHEIM, P. K. NEOGI, N. A. BHUIYAN und J. B. KAPER  
Controlled study of cytolethal distending toxin-producing *Escherichia coli* infections in Bangladeshi children  
J. Clin. Microbiol. 34, 717 - 719 (1996)
- ALBERT, T., M. GAREIS und L. KRÖCKEL  
Mikrobiologische Qualität von Fleischerzeugnissen aus ökologischer Produktion  
Fleischwirtsch. 83, 147 - 150 (2003)
- ALBIHN, A., E. ERIKSSON, C. WALLEN und A. ASPAN  
Verotoxinogenic *Escherichia coli* (VTEC) O157:H7 - a nationwide Swedish survey of bovine faeces  
Acta Vet. Scand. 44, 43 - 52 (2003)
- ALEKSIĆ, S., H. KARCH und J. BOCKEMÜHL  
A biotyping scheme for Shiga-like (vero) toxin-producing *Escherichia coli* O157 and a list of serological cross-reactions between O157 and other gram-negative bacteria  
Zbl. Bakt. 276, 221 - 230 (1992)

- AL-GALLAS, N., R. BEN AISSA, T. A. ANNABI. O. BAHRI und A. BOUDABOUS  
Isolation and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from meat and dairy products  
Food Microbiol. 19, 389 - 398 (2002)
- ALLERBERGER, F., M. P. DIERICH, U. GRUBER-MOESENBACHER, A. LIESEGANG, R. PRAGER, G. HARTMANN, W. RABSCH, H. TSCHÄPE und H. KARCH  
Nontoxic sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157:H<sup>-</sup> associated with a family outbreak of diarrhoea  
Wien. Klin. Wochenschr. 112, 846 - 850 (2000)
- ALPERS, K., D. WERBER, C. FRANK, J. KOCH, S. BEHNKE, G. MORLOCK, A. HEISSENHUBER, D. MASLO, A. DIEDLER, A. FRIEDRICH, A. MELLMANN, R. PRAGER, A. FRUTH, M. TIMM, P. GALLIEN, A. GERBER, P. ZUCS, K. STARK und A. AMMON  
Ausbruch von Hämolytisch-Urämischem Syndrom durch sorbitolfermentierende *Escherichia coli* O157:H<sup>-</sup> in Süddeutschland, Oktober bis Dezember 2002  
EHEC-Workshop 2004, Wildbad Kreuth, 22.-24. Juli 2004 (2004)
- AMMON, A., L. R. PETERSEN und H. KARCH  
A large outbreak of hemolytic uremic syndrome caused by an unusual sorbitol-fermenting strain of *Escherichia coli* O157:H<sup>-</sup>  
J. Infect. Dis. 179, 1274 - 1277 (1999)
- ANONYMOUS  
Enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection as of May 2004, Japan  
IASR 25, 138 - 139 (2004a)
- ANONYMOUS  
Outbreak of Vero cytotoxin-producing *E. coli* O157 linked to milk in Denmark  
Eurosurveillance Weekly 8, <http://www.eurosurveillance.org/ew/2004/040513.asp#2>  
(2004b)
- ARMSTRONG, G. D., P. N. McLAINE und P. C. ROWE  
Clinical trials of synsorb-Pk in preventing hemolytic uremic syndrome  
in: Kaper, J. B. und A. D. O'Brien (Hrsg.), *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* strains, American Society for Microbiology, Washington, D. C., 374 - 384 (1998)
- ARTHUR, T. M., G. A. BARKOCY-GALLAGHER, M. RIVERA-BETANCOURT und M. KOOHMARAIE  
Prevalence and characterization of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* on carcasses in commercial beef cattle processing plants  
Appl. Environ. Microbiol. 68, 4847 - 4852 (2002)
- AVERY, S. M., E. LIEBANA, C.-A. REID, M. J. WOODWARD und S. BUNCIC  
Combined use of two genetic fingerprinting methods, pulsed-field gel electrophoresis and ribotyping, for characterization of *Escherichia coli* O157 isolates from food animals, retail meats, and cases of human disease  
J. Clin. Microbiol. 40, 2806 - 2812 (2002)
- AVERY, S. M., E. LIEBANA, M. L. HUTCHISON und S. BUNCIC  
Pulsed field gel electrophoresis of related *Escherichia coli* O157 isolates associated with beef cattle and comparison with unrelated isolates from animals, meats and humans  
Int. J. Food Microbiol. 92, 161 - 169 (2004)
- BAKER, M., R. EYLES, J. BENNETT, C. NICOL, W. WONG und N. GARRETT  
Emergence of verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) in New Zealand  
NZ Public Health Rep. 6, 9 - 12 (1999)

- BANATVALA, N., P. M. GRIFFIN, K. D. GREENE, T. J. BARRETT, W. F. BIBB, J. H. GREEN, J. G. WELLS and THE HEMOLYTIC UREMIC SYNDROME STUDY COLLABORATORS  
The United States national prospective hemolytic uremic syndrome study: microbiologic, serologic, clinical, and epidemiologic findings  
J. Infect. Dis. 183, 1063 - 1070 (2001)
- BARKOCY-GALLAGHER, G. A., T. M. ARTHUR, G. R. SIRAGUSA, J. E. KEEN, R. O. ELDER, W. W. LAEGREID und M. KOOHMARAIE  
Genotypic analyses of *Escherichia coli* O157:H7 and O157 nonmotile isolates recovered from beef cattle and carcasses at processing plants in the midwestern states of the United states  
Appl. Environ. Microbiol. 67, 3810 - 3818 (2001)
- BARKOCY-GALLAGHER, G. A., T. M. ARTHUR, M. RIVERA-BETANCOURT, X. NOU, S. D. SHACKELFORD, T. L. WHEELER und M. KOOHMARAIE  
Characterization of O157:H7 and other *Escherichia coli* isolates recovered from cattle hides, feces, and carcasses  
J. Food Prot. 67, 993 - 998 (2004)
- BARRETT, T. J., H. LIOR, J. H. GREEN, R. KHAKHRIA, J. G. WELLS, B. P. BELL, K. D. GREENE, J. LEWIS und P. M. GRIFFIN  
Laboratory investigation of a multistate food-borne outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 by using pulsed-field gel electrophoresis and phage typing  
J. Clin. Microbiol. 32, 3013 - 3017 (1994)
- BAUER, M. E. und R. A. WELCH  
Characterization of an RTX toxin from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7  
Infect. Immun. 64, 167 - 175 (1996)
- BAUERFEIND, R., S. BARTH, A. TSCHOLCHIEW, G. VALLEJO und R. WEISS  
Nachweis und Charakterisierung von Shigatoxin-bildenden *Escherichia coli* bei Zucht- und Mastschweinen in Deutschland  
EHEC-Workshop 2004, Wildbad Kreuth, 22.-24. Juli 2004 (2004)
- BAUWENS, L., W. DE MEURICHY und F. VERCAMMEN  
Isolation of *Escherichia coli* O157 from zoo animals  
Vlaams. Diergeneesk. Tijdschr. 69, 76 - 79 (2000)
- BELL, C.  
Approach to the control of entero-haemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC)  
Int. J. Food Microbiol. 78, 197 - 216 (2002)
- BENKERROUM, N., Y. BOUHLAL, A. EL ATTAR und A. MARHABEN  
Occurrence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 in selected dairy and meat products marketed in the city of Rabat, Morocco  
J. Food Prot. 67, 1234 - 1237 (2004)
- BENNETT, A. R., S. McPHEE und R. P. BETTS  
Evaluation of methods for the isolation and detection of *Escherichia coli* O157 in minced beef  
Lett. Appl. Microbiol. 20, 375 - 379 (1995)
- BERTIN, Y., K. BOUKHORS, N. PRADEL, V. LIVRELLI und C. MARTIN  
Stx2 subtyping of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle in France: Detection of a new Stx2 subtype and correlation with additional virulence factors  
J. Clin. Microbiol. 39, 3060 - 3065 (2001)

- BESSER, R. E., S. M. LETT, J. T. WEBER, M. P. DOYLE, T. H. BARRETT, J. G. WELLS und P. M. GRIFFIN  
An outbreak of diarrhea and hemolytic uremic syndrome from *Escherichia coli* O157:H7 in fresh-pressed apple cider  
JAMA 269, 2217 - 2220 (1993)
- BETTELHEIM, K. A.  
Serotypes of verotoxin-producing *Escherichia coli* reported in the literature, apart from those belonging to serogroup O157  
<http://www.microbionet.com.au/frames/feature/vtec/brief01.html>, Stand: 06.03.2004 (2004)
- BETTELHEIM, K. A. und L. BEUTIN  
Rapid laboratory identification and characterization of verocytotoxigenic (Shiga toxin producing) *Escherichia coli* (VTEC/STEC)  
J. Appl. Microbiol. 95, 205 - 217 (2003)
- BETTELHEIM, K. A., M. WHIPP, S. P. DJORDJEVIC und V. RAMACHANDRAN  
First isolation outside Europe of sorbitol-fermenting verocytotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) belonging to O group O157  
J. Med. Microbiol. 51, 713 – 714 (2002)
- BETTELHEIM, K. A., M. A. HORNITZKY, S. P. DJORDJEVIC und A. KUZEVSKI  
Antibiotic resistance among verocytotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) and non-VTEC isolated from domestic animals and humans  
J. Med. Microbiol. 52, 155 - 162 (2003)
- BEUTIN, L.  
Vorkommen, klinische Bedeutung und Erkennung von Verotoxin-produzierenden Stämmen von *E. coli*  
Bundesgesundhbl. 4, 152 – 154 (1989)
- BEUTIN, L.  
Die Bedeutung und Erkennung von *Escherichia coli* als Krankheitserreger beim Menschen  
Bundesgesundhbl. 9, 380- 386 (1990)
- BEUTIN, L.  
*Escherichia coli* as a pathogen in dogs and cats  
Vet. Res. 30, 285 - 298 (1999)
- BEUTIN, L., J. PRADA, S. ZIMMERMANN, R. STEPHAN, I. ØRSKOV und F. ØRSKOV  
Enterohemolysin, a new type of hemolysin produced by some strains of enteropathogenic *E. coli* (EPEC)  
Zbl. Bakt. Hyg. A 267, 576 - 588 (1988)
- BEUTIN, L., M. A. MONTENEGRO, I. ØRSKOV, F. ØRSKOV, J. PRADA, S. ZIMMERMANN und R. STEPHAN  
Close association of verotoxin (Shiga-like toxin) production with enterohemolysin production in strains of *Escherichia coli*  
J. Clin. Microbiol. 27, 2559 - 2564 (1989)
- BEUTIN, L., L. BODE, M. OZEL und R. STEPHAN  
Enterohemolysin production is associated with a temperate bacteriophage in *Escherichia coli* serogroup O26 strains  
J. Bacteriol. 172, 6469 - 6475 (1990)
- BEUTIN, L., D. GEIER, H. STEINBRÜCK, S. ZIMMERMANN und F. SCHEUTZ  
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 (1993a)

- BEUTIN, L., U. H. STROEHER und P. A. MANNING  
Isolation of enterohemolysin (Ehly2)-associated sequences encoded on temperate phages of *Escherichia coli*  
Gene 132, 95 - 99 (1993b)
- BEUTIN, L., K. GLEIER, S. ZIMMERMANN und D. GEIER  
Zur Identifizierung von Verotoxin-bildenden (VTEC) und enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC) auf Indikatornährböden  
Klin. Lab. 40, 193 - 201 (1994)
- BEUTIN, L., S. ZIMMERMANN und K. GLEIER  
Human Infections with Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Other Than Serogroup O157 in Germany  
Emerg. Infect. Dis. 4, 635 - 639 (1998)
- BEUTIN, L., G. KRAUSE, S. ZIMMERMANN, S. KAULFUSS und K. GLEIER  
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 (2004)
- BGVV (Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin)/BFR (Bundesinstitut für Risikobewertung)  
Empfehlungen zum Nachweis und zur Bewertung von *Listeria monocytogenes* in Lebensmitteln im Rahmen der amtlichen Lebensmittelüberwachung - Stand Juli 2000  
[http://www.bgvv.de/cm/234/empfehlungen\\_zum\\_nachweis\\_und\\_zur\\_bewertung\\_von\\_listeria\\_monocytogenes\\_in\\_lebensmitteln\\_im\\_rahmen\\_der\\_amtlichen\\_lebensmittelueberwachung.pdf](http://www.bgvv.de/cm/234/empfehlungen_zum_nachweis_und_zur_bewertung_von_listeria_monocytogenes_in_lebensmitteln_im_rahmen_der_amtlichen_lebensmittelueberwachung.pdf), (2000)
- BHAKDI, S., N. MACKMAN, G. MENESTRINA, L. GRAY, F. HUGO, W. SEEGER und I. B. HOLLAND  
The hemolysin of *Escherichia coli*  
Eur. J. Epidemiol. 4, 135 - 143 (1988)
- BHAN, M. K., P. RAJ, M. M. LEVINE und J. B. KAPER  
Enteroaggregative *Escherichia coli* associated with persistent diarrhea in a cohort of rural children in India  
J. Infect. Dis. 159, 1061 - 1064 (1989)
- BIELASZEWSKA, M., H. SCHMIDT, M. A. KARMALI, R. KHAKHRIA, J. JANDA, K. BLÁHOVÁ und H. KARCH  
Isolation and characterization of sorbitol-fermenting Shiga toxin (verocytotoxin)-producing *Escherichia coli* O157:H<sup>-</sup>-strains in the Czech Republic  
J. Clin. Microbiol. 36, 2135 - 2137 (1998)
- BIELASZEWSKA, M., H. SCHMIDT, A. LIESEGANG, R. PRAGER, W. RABSCH, H. TSCHÄPE, A. CÍZEK, J. JANDA, K. BLÁHOVÁ und H. KARCH  
Cattle can be a reservoir of sorbitol-fermenting Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H<sup>-</sup> strains and a source of human diseases  
J. Clin. Microbiol. 38, 3470 - 3473 (2000)
- BIELASZEWSKA, M., M. FELL, L. GREUNE, R. PRAGER, A. FRUTH, H. TSCHÄPE, M. A. SCHMIDT und H. KARCH  
Characterization of cytolethal distending toxin genes and expression in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains of non-O157 serogroups  
Infect. Immun. 72, 1812 - 1816 (2004)

- BIELASZEWSKA, M., B. SINHA, T. KUCZIUS und H. KARCH  
Cytotoxic distending toxin from Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 causes irreversible G2/M arrest, inhibition of proliferation, and death of human endothelial cells  
*Infect. Immun.* 73, 552 - 562 (2005a)
- BIELASZEWSKA, M., P. I. TARR, H. KARCH, W. ZHANG und W. MATHYS  
Phenotypic and molecular analysis of tellurite resistance among enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and sorbitol-fermenting O157:NM clinical isolates  
*J. Clin. Microbiol.* 43, 452 - 454 (2005b)
- BISPING, W.  
Bakterielle Infektionskrankheiten - Salmonellose  
in: Wintzer, H.-J. (Hrsg.): Krankheiten des Pferdes - Ein Leitfaden für Studium und Praxis, 2. Aufl., Parey, Berlin, 529 - 530 (1997)
- BLÁHOVÁ, K., J. JANDA, J. KREISINGER, E. MATEJKOVÁ und A. ŠEDIVÁ  
Long-term follow-up of Czech children with D+ hemolytic-uremic syndrome  
*Pediatr. Nephrol.* 17, 400 - 403 (2002)
- BLAIS, B. W., R. A. BOOTH, L. M. PHILIPPE und H. YAMAZAKI  
Effect of temperature and agitation on enrichment of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef using modified EC broth with novobiocin  
*Int. J. Food Microbiol.* 36, 221 - 225 (1997)
- BLANCO, J., E. A. GONZALEZ, P. ESPINOSA, M. BLANCO, J. I. GARABAL und M. P. ALONSO  
Enterotoxigenic and necrotizing *Escherichia coli* in human diarrhoea in Spain  
*Eur. J. Epidemiol.* 8, 548 - 552 (1992)
- BLANCO, J. E., M. BLANCO, J. BLANCO, A. MORA, L. BALAGUER, M. MOURINO, A. JUAREZ und W. H. JANSEN  
O serogroups, biotypes, and *eae* genes in *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic and healthy rabbits  
*J. Clin. Microbiol.* 34, 3101 - 3107 (1996)
- BLANCO, M., J. E. BLANCO, A. MORA, J. REY, J. M. ALONSO, M. HERMOSO, J. HERMOSO, M. P. ALONSO, G. DAHBI, E. A. GONZÁLEZ, M. I. BERNÁRDEZ und J. BLANCO  
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 (2003)
- BLANCO, M., J. E. BLANCO, A. MORA, G. DAHBI, M. P. ALONSO, E. A. GONZÁLEZ, M. I. BERNÁRDEZ und J. BLANCO  
Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from cattle in Spain and identification of a new intimin variant gene (*eae-xi*)  
*J. Clin. Microbiol.* 42, 645 - 651 (2004)
- BOCKEMÜHL, J., H. KARCH, H. RÜSSMANN, S. ALEKSIC, R. WISS und P. EMMRICH  
Shiga-like toxin (verotoxin)-produzierende *Escherichia coli* O22:H8  
*Bundesgesundhbl.* 33, 3 - 6 (1990)
- BOCKEMÜHL, J., H. KARCH und H. TSCHÄPE  
Infektionen des Menschen durch enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC) in Deutschland, 1996  
*Bundesgesundhbl.* 40, 194 - 197 (1997)

- BOCKEMÜHL, J., H. KARCH und H. TSCHÄPE  
Zur Situation der Infektionen des Menschen durch enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC) in Deutschland 1997  
Bundesgesundhbl. 41, 2 – 5 (1998)
- BOERLIN, P., S. A. McEWEN, F. BOERLIN-PETZOLD, J. B. WILSON, R. P. JOHNSON und C. L. GYLES  
Associations between Virulence factors of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* and Disease in Humans  
J. Clin. Microbiol. 37, 497 – 503 (1999)
- BÖHM, H.  
Typisierung enterohämorrhagischer *Escherichia coli* O157 mittels Makrorestriktionsenzymanalyse  
Med. Diss., Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg (2000)
- BÖHM, H. und H. KARCH  
DNA fingerprinting of *Escherichia coli* O157:H7 strains by pulsed-field gel electrophoresis  
J. Clin. Microbiol. 30, 2169 - 2172 (1992)
- BOLDUC, D., L. F. SROUR, L. SWEET, A. NEATBY, E. GALANTIS, S. ISAACS und G. LIM  
Severe outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 in health care institutions in Charlottetown, Prince Edward Island, fall, 2002  
Can. Commun. Dis. Rep. 30, 81 - 87 (2004)
- BOLTON, F. J., L. CROZIER und J. K. WILLIAMSON  
Isolation of *Escherichia coli* O157 from raw meat products  
Lett. Appl. Microbiol. 23, 317 – 321 (1996)
- BOLTON, D. J., A. M. DOHERTY und J. J. SHERIDAN  
Beef HACCP: intervention and non-intervention systems  
Int. J. Food Microbiol. 66, 119 - 129 (2001)
- BOPP, D. J., B. D. SAUDERS, A. L. WARING, J. ACKELSBERG, N. DUMAS, E. BRAUN-HOWLAND, D. DZIEWULSKI, B. J. WALLACE, M. KELLY, T. HALSE, K. ARUDA  
MUSSE, P. F. SMITH, D. L. MORSE und R. J. LIMBERGER  
Detection, isolation , and molecular subtyping of *Escherichia coli* O157:H7 and *Campylobacter jejuni* associated with a large waterborne outbreak  
J. Clin. Microbiol. 41, 174 - 180 (2003)
- BORNARDI, S., E. MAGGI, G. PIZZIN, S. MORABITO und A. CAPRIOLI  
Faecal carriage of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 and carcass contamination in cattle at slaughter in northern Italy  
Int. J. Food Microbiol. 66, 47 - 53 (2001)
- BOUVET, J., C. BAVAI, R. ROSSEL, A. LE ROUX, M. P. MONTET, S. RAY-GUENIOT, C. MAZUY, V. ATRACHE und C. VERNZY-ROZAND  
Effects of cutting process on pork meat contamination by verotoxin-producing *Escherichia coli* and *E. coli* O157:H7  
Int. J. Food Microbiol. 77, 91 - 97 (2002a)
- BOUVET, J., M. P. MONTET, R. ROSSEL, A. LE ROUX, C. BAVAI, S. RAY-GUENIOT, C. MAZUY, V. ATRACHE und C. VERNZY-ROZAND  
Effects of slaughter processes on pig carcass contamination by verotoxin-producing *Escherichia coli* and *E. coli* O157:H7  
Int. J. Food Microbiol. 77, 99 - 108 (2002b)

- BOYD, B. und C. LINGWOOD  
Verotoxin receptor glycolipid in human renal tissue  
*Nephron* 51, 207 - 210 (1989)
- BRETT, K. N., V. RAMACHANDRAN, M. A. HORNITZKY, K. A. BETTELHEIM, M. J. WALKER und S. P. DJORDJEVIC  
*Stx*<sub>1c</sub> 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 (2003)
- BROWN, C. A., B. G. HARMON, T. ZHAO und M. P. DOYLE  
Experimental *Escherichia coli* O157:H7 carriage in calves  
*Appl. Environ. Microbiol.* 63, 27 – 32 (1997)
- BRUCE, M. G., M. B. CURTIS, M. M. PAYNE, R. K. GAUTOM, E. C. THOMPSON, A. L. BENNETT und J. M. KOBAYASHI  
Lake-associated outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 in Clark County, Washington, August 1999  
*Arch. Pediatr. Adolesc. Med.* 157, 1016 - 1021 (2003)
- BRUNDER, W., H. SCHMIDT und H. KARCH  
KatP, a novel catalase-peroxidase encoded by the large plasmid of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7  
*Microbiol.* 142, 3305 - 3315 (1996)
- BRUNDER, W., H. SCHMIDT und H. KARCH  
EspP, a novel extracellular serine protease of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 cleaves human coagulation factor V  
*Mol. Microbiol.* 24, 767 - 778 (1997)
- BRUNDER, W., H. SCHMIDT, M. FROSCH und H. KARCH  
The large plasmids of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) are highly variable genetic elements  
*Microbiol.* 145, 1005 - 1014 (1999)
- BRUNDER, W., A. S. KHAN, J. HACKERG und H. KARCH  
Novel type of fimbriae encoded by the large plasmid of sorbitol-fermenting enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7  
*Infect. Immun.* 69, 4447 – 4457 (2001)
- BRUNEAU, A., H. RODRIGUE, J. ISMÄEL, R. DION und R. ALLARD  
Outbreak of *E. coli* O157:H7 associated with bathing at a public beach in the Montreal-centre region  
*Can. Commun. Dis. Rep.* 30, 133 - 136 (2004)
- BUCHKO, S. J., R. A. HOLLEY, W. O. OLSON, V. P. J. GANNON und D. M. VEIRA  
The effect of different grain diets on fecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7 by steers  
*J. Food Prot.* 63, 1467 – 1474 (2000)
- BÜLTE, M.  
Fortschritte zur Anwendbarkeit von DNS-DNS-Hybridisierungsverfahren in der Routinediagnostik  
Proc. 32. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG), Eigenverlag der DVG, Gießen, 408 - 416 (1991)

BÜLTE, M.

Versuch einer lebensmittelrechtlichen Bewertung von Verotoxin-bildenden *E. coli* (VTEC) und enterohämorrhagischen *E. coli* (EHEC)  
53. Arbeitstagung des Arbeitskreises Lebensmittelhygienischer Tierärztlicher Sachverständiger (ALTS), Berlin, 14.-15.06.2000 (2000)

BÜLTE, M.

Nachweis und Charakterisierung von Verotoxin-bildenden *Escherichia coli*-Stämmen (VTEC) aus unterschiedlichen Habitaten  
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 114, 473 - 477 (2001)

BÜLTE, M.

Veterinärmedizinische Aspekte der Infektionen durch enterohämorrhagische *E.-coli*-Stämme (EHEC)  
Bundesgesundhbl. 45, 484 - 490 (2002)

BÜLTE, M. und S. HECKÖTTER

Vorkommen und Bedeutung von O157 und anderen verotoxinbildenden *E. coli* bei Tieren und in Lebensmitteln  
Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. 88, 665 - 680 (1997)

BÜLTE, M. und R. REUTER

Glucuronidase-Nachweis und Indol-Kapillartest als zuverlässige Schnellidentifizierungsverfahren zur Erfassung von *E. coli* in Lebensmitteln - toxinogene Stämme eingeschlossen  
Zbl. Hyg. 188, 284 - 293 (1989)

BÜLTE, M. und V. WROCKLAGE

Die PCR-Technik zur Ermittlung von verotoxinogenen *E. coli*-Stämmen bei Schlacht- und Nutztieren  
Proc. 33. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG), Eigenverlag der DVG, Gießen, 486 - 495 (1992)

BÜLTE, M., M. A. MONTENEGRO, R. HELMUTH, T. TRUMPF und G. REUTER

Nachweis von Verotoxin-bildenden *E. coli* (VTEC) bei gesunden Rindern und Schweinen mit dem DNS-DNS-Koloniehybridisierungsverfahren  
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 103, 380 - 384 (1990)

BÜLTE, M., S. HECKÖTTER, P. KEIL, C. SCHUY, A. MÜLLER und S. ALEKSIC

Enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC) – aktuelle Lebensmittelinfektionserreger auch in der Bundesrepublik Deutschland? 3. Nachweismöglichkeiten für VTEC und EHEC  
Fleischwirtsch. 78, 146 - 151 (1998)

BÜLTE, M., M. GOLL und A. STAHL

Nachweis von non-O157 VTEC- und O157-Stämmen in einer Mutterkuhherde in Weidehaltung  
Proc. 43. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG), Eigenverlag der DVG, Gießen, 190 - 195 (2002)

BÜLTE, M., A. STAHL, M. GOLL, B. KUNZ und A. BUBERT

Singlepath<sup>®</sup> *Escherichia coli* O157 and Duopath<sup>®</sup> Verotoxins: Evaluation of improved immunochromatographic rapid tests for the detection of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157 and non-O157 strains in food  
5<sup>th</sup> International Symposium on "Shiga Toxin (Verocytotoxin) - Producing *Escherichia coli* Infections", Edinburgh, Schottland, 08.-11.06.2003 (2003)

- BÜLTE, M., M. GOLL, B. KUNZ und A. BUBERT  
Direkter Nachweis von Verotoxinen in unterschiedlichen Lebensmittelmatrizen mit dem „Duopath® Verotoxins“-System  
EHEC-Workshop 2004, Wildbad Kreuth, 22.-24. Juli 2004 (2004)
- BÜRK, C., R. DIETRICH, G. AÇAR, M. MORAVEK, M. BÜLTE und E. MÄRTLBAUER  
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 (2003)
- BURLAND, V., Y. SHAO, N. T. PERNA, G. PLUNKETT, H. J. SOFIA und F. R. BLATTNER  
The complete DNA sequence and analysis of the large virulence plasmid of *Escherichia coli* O157:H7  
Nucl. Acids Res. 26, 4196 - 4204 (1998)
- BYRNE, C. M., P. O'KIELY, D. J. BOLTON, J. J. SHERIDAN, D. A. McDOWELL UND I. S. BLAIR  
Fate of *Escherichia coli* O157:H7 during silage fermentation  
J. Food Prot. 65, 1854 - 1860 (2002)
- CALDERWOOD, S. B., D. W. K. ACHESON, G. T. KEUSCH, T. J. BARRETT, P. M. GRIFFIN, N. A. STROCKBINE, B. SWAMINATHAN, J. B. KAPER, M. M. LEVINE, B. S. KAPLAN, H. KARCH, A. D. O'BRIEN, T. G. OBRIG, Y. TAKEDA, P. I. TARR und I. K. WACHSMUTH  
Proposed new nomenclature for SLT(VT) family  
ASM News 62, 118 – 119 (1996)
- CALLAWAY, T. R., T. S. EDRINGTON, R. C. ANDERSON, K. J. GENOVESE, T. L. POOLE, R. O. ELDER, J. A. BYRD, K. M. BISCHOFF und D. J. NISBET  
*Escherichia coli* O157:H7 populations in sheep can be reduced by chlorate supplementation  
J. Food Prot. 66, 194 - 199 (2003)
- CANADIAN PEDIATRIC SOCIETY  
Advice for parents on hamburger disease/barbecue syndrome (verotoxigenic *E. coli* gastroenteritis, or VTEC gastroenteritis)  
<http://www.cps.ca/english/statements/ID/id95-04.htm> (1995)
- CAPRIOLI, A. und A. E. TOZZI  
Epidemiology of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in continental Europe  
in: Kaper, J. B. und A. D. O'Brien (Hrsg.), *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* strains, American Society for Microbiology, Washington, D. C., 38 - 48 (1998)
- CAPRIOLI, A., V. FALBO, L. G. RODA, F. M. RUGGERI und C. ZONA  
Partial purification and characterization of an *Escherichia coli* toxic factor that induces morphological cell alterations  
Infect. Immun. 39, 1300 - 1306 (1983)
- CAPRIOLI, A., V. FALBO, F. M. RUGGERI, L. BALDASSARRI, R. BISICCHIA, G. IPPOLITO, E. ROMOLI und G. DONELLI  
Cytotoxic necrotizing factor production by hemolytic strains of *Escherichia coli* causing extraintestinal infections  
J. Clin. Microbiol. 25, 146 - 149 (1987)
- CARPENTER, J. L., N. C. ANDELMAN, F. M. MOORE und N. W. KING JR.  
Idiopathic cutaneous and renal glomerular vasculopathy of greyhounds  
Vet. Pathol. 25, 401 - 407 (1988)

- CARTER, A. O., A. A. BORCZYK, J. A. CARLSON, B. HARVEY, J. C. HOCKIN, M. A. KARMALI, C. KRISHNAN, D. A. KORN und H. LIOR  
A severe outbreak of *Escherichia coli* O157:H7-associated hemorrhagic colitis in a nursing home  
N. Eng. J. Med. 317, 1496 - 1500 (1987)
- CDC (Centers for Disease Control and Prevention)  
Update: Gastrointestinal illness associated with imported semi-soft cheese  
MMWR 33, 16, 22 (1984)
- CDC (Centers for Disease Control and Prevention)  
Foodborne outbreaks of enterotoxigenic *Escherichia coli* - Rhode Island and New Hampshire, 1993  
MMWR 43, 81, 87 - 89 (1994)
- CDC (Centers for Disease Control and Prevention)  
Community outbreak of hemolytic uremic syndrome attributable to *Escherichia coli* O111:NM - South Australia, 1995  
MMWR 44, 550 - 551, 557 - 558 (1995)
- CDC (Centers for Disease Control and Prevention)  
Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with drinking unpasteurized commercial apple juice - British Columbia, California, Colorado, and Washington, October 1996  
MMWR 45, 975 (1996)
- CDC (Centers for Disease Control and Prevention)  
*Escherichia coli* O111:H8 outbreak among teenage campers - Texas, 1999  
MMWR 49, 321 - 324 (2000)
- CDC (Centers for Disease Control and Prevention)  
Outbreaks of *Escherichia coli* O157:H7 infections among children associated with farm visits - Pennsylvania and Washington, 2000  
MMWR 50, 293 - 297 (2001)
- CDC (Centers for Disease Control and Prevention)  
Recommendations: Farm animal contact (Stand: 6. März 2003)  
[http://www.cdc.gov/foodborneoutbreaks/pulication/recomm\\_farm\\_animal.htm](http://www.cdc.gov/foodborneoutbreaks/pulication/recomm_farm_animal.htm) (2003)
- CDC (Centers for Disease Control and Prevention)  
Preliminary FoodNet data on the incidence of infection with pathogens transmitted commonly through food - selected sites, United States, 2003  
MMWR 53, 338-343 (2004)
- CEBULA, T. A., W. L. PAYNE und P. FENG  
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 (1995)
- CERMELLI, C., G. FABIO, C. CASOLARI und P. QUAGLIO  
Evaluation of a vero cell toxicity test to detect EHEC infection  
New Microbiol. 25, 235 - 238 (2002)
- CHAKRABORTY, S., A. KAHN, S. KAHALI, S. M. FARUQUE, S. YAMASAKI und T. RAMAMURTHY  
Infantile diarrhoea associated with sorbitol-fermenting, non-Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7  
Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 22, 324 - 326 (2003)

- CHALMERS, R. M., R. L. SALMON, G. A. WILLSHAW, T. CHEASTY, N. LOOKER, I. DAVIES und C. WRAY  
Vero-cytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in a farmer handling horses  
Lancet 349, 1816 (1997)
- CHAPMAN, P. A., D. J. WRIGHT und C. A. SIDDONS  
A comparison of immunomagnetic separation and direct culture for the isolation of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 from bovine faeces  
J. Med. Microbiol. 40, 424 - 427 (1994)
- CHAPMAN, P. A., C. A. SIDDONS, A. T. CERDÁN MALO und M. A. HARKIN  
A 1-year study of *Escherichia coli* O157 in cattle, sheep, pigs and poultry  
Epidemiol. Infect. 119, 245 - 250 (1997)
- CHAPMAN, P. A., J. CORNELL und C. GREEN  
Infection with verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 during a visit to an inner city open farm  
Epidemiol. Infect. 125, 531 - 536 (2000)
- CHAPMAN, P. A., A. T. CERDÁN MALO, M. ELLIN, R. ASHTON und M. A. HARKIN  
*Escherichia coli* O157 in cattle and sheep at slaughter, on beef and lamb carcasses and in raw beef and lamb products in South Yorkshire, UK  
Int. J. Food Microbiol. 64, 139 - 150 (2001)
- CHINA, B., V. PIRSON und J. MAINIL  
Prevalence and molecular typing of attaching and effacing *Escherichia coli* among calf populations in Belgium  
Vet. Microbiol. 63, 249 - 259 (1998)
- CHINEN, I., J. D. TANARO, E. MILIWEBSKY, L. H. LOUND, G. CHILLEMI, S. LEDRI, A. BASCHKIER, M. SCARPIN, E. MANFREDI und M. RIVAS  
Isolation and characterization of *Escherichia coli* O157:H7 from retail meats in Argentina  
J. Food Prot. 64, 1346 - 1351 (2001)
- CLARK, C. G., S. T. JOHNSON, R. H. EASY, J. L. CAMPBELL und J. G. RODGERS  
PCR for detection of *cdt*-III and the relative frequencies of cytolethal distending toxin variant-producing *Escherichia coli* isolates from humans and cattle  
J. Clin. Microbiol. 40, 2671 - 2674 (2002)
- COBBOLD, R. und P. DESMACHELIER  
Characterisation and clonal relationships of Shiga-toxingenic *Escherichia coli* (STEC) isolated from Australian dairy cattle  
Vet. Microbiol. 79, 323 - 335 (2001)
- COBBOLD, R. und P. DESMACHELIER  
Horizontal transmission of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* within groups of dairy calves  
Appl. Environ. Microbiol. 68, 4148 - 4152 (2002)
- COBBOLD, R. N. und P. DESMACHELIER  
In vitro studies on the colonization of bovine colonic mucosa by Shiga-toxingenic *Escherichia coli* (STEC)  
Epidemiol. Infect. 132, 87 - 94 (2004)
- COIA, J. E., J. C. SHARP, D. M. CAMPBELL, J. CURNOW und C. N. RAMSAY  
Environmental risk factors for sporadic *Escherichia coli* O157 infection in Scotland: results of a descriptive epidemiology study  
J. Infect. 36, 317 - 321 (1998)

- COIA, J. E., Y. JOHNSTON, N. J. STEERS und M. F. HANSON  
A survey of the prevalence of *Escherichia coli* O157 in raw meats, raw cow's milk and raw-milk cheeses in south-east Scotland  
Int. J. Food Microbiol. 66, 63 - 69 (2001)
- CONEDERA, G., P. DALVIT, M. MARTINI, G. GALIERO, M. GRAMAGLIA, E. GOFFREDO, G. LOFFREDO, S. MORABITO, D. OTTAVIANI, F. PATERLINI, G. PEZZOTTI, M. PISANU, P. SEMPRINI und A. CAPRIOLI  
Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in minced beef and dairy products in Italy  
Int. J. Food Microbiol. 96, 67 - 73 (2004)
- CORNELIS, G. R. und F. VAN GIJSEGEM  
Assembly and function of type III secretory systems  
Annu. Rev. Microbiol. 54, 735 - 774 (2000)
- CORNICK, N. A., S. L. BOOHER, T. A. CASEY und H. W. MOON  
Persistent colonization of sheep by *Escherichia coli* O157:H7 and other *E. coli* pathotypes  
Appl. Environ. Microbiol. 66, 4926 - 4934 (2000)
- COWDEN, J. M., S. AHMED, M. DONAGHY und A. RILEY  
Epidemiological investigation of the Central Scotland outbreak of *Escherichia coli* O157 infection, November to December 1996  
Epidemiol. Infect. 126, 335 - 341 (2001)
- CRAMPIN, M., G. WILLSHAW, R. HANCOCK, T. DJURETIC, C. ELSTOB, A. ROUSE, T. CHEASTY und J. STUART  
Outbreak of *Escherichia coli* O157 infection associated with a music festival  
Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 18, 268 - 288 (1999)
- CRANE, J. K., B. P. McNAMARA und M. S. DONNENBERG  
Role of EspF in host cell death induced by enteropathogenic *Escherichia coli*  
Cell Microbiol. 3, 197 - 211 (2001)
- CRAY, JR., W. C., T. A. CASEY, B. T. BOSWORTH und M. A. RASMUSSEN  
Effect of dietary stress on fecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in calves  
Appl. Environ. Microbiol. 64, 1975 - 1979 (1998)
- CREASEY, E. A., D. FRIEDBERG, R. K. SHAW, T. UMANSKI, S. KNUTTON, I. ROSENSHINE und G. FRANKEL  
CesAB is an enteropathogenic *Escherichia coli* chaperone for the type-III translocator proteins EspA and EspB  
Microbiol. 149, 3639 - 3647 (2003a)
- CREASEY, E. A., R. M. DELAHAY, A. A. BISHOP, R. K. SHAW, B. KENNY, S. KNUTTON und G. FRANKEL  
CesT is a bivalent enteropathogenic *Escherichia coli* chaperone required for translocation of both Tir and Map  
Mol. Microbiol. 47, 209 - 221 (2003b)
- CUDJOE, K. S., P. D. PATEL, E. OLSEN, E. SKJERVE und Ø. OLSVIK  
Immunomagnetic separation techniques for the detection of pathogenic bacteria in foods  
in: Kroll, R. G., M. Sussman und A. Gilmour (Hrsg.): New Techniques in Food and Beverage Microbiology, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 17 - 29 (1993)
- DATZ, M., C. JANETZKI-MITTMANN, S. FRANKE, F. GUNZER, H. SCHMIDT und H. KARCH  
Analysis of the enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 DNA region containing lambdoid phage gene *p* and Shiga-like toxin structural genes  
Appl. Environ. Microbiol. 62, 791 - 797 (1996)

- DAVIS, M. A., D. D. HANCOCK, T. E. BESSER und D. R. CALL  
Evaluation of pulsed-field gel electrophoresis as a tool for determining the degree of genetic relatedness between strains of *Escherichia coli* O157:H7  
J. Clin. Microbiol. 41, 1843 - 1849 (2003)
- DE BOER, E. und A. E. HEUVELINK  
Methods for the detection and isolation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*  
Symp. Ser. Soc. Appl. Microbiol. 29, 133S - 143S (2000)
- DE JONGE, R., K. TAKUMI, S. RITMEESTER und F. M. VAN LEUSDEN  
The adaptive response of *Escherichia coli* O157 in an environment with changing pH  
J. Appl. Microbiol. 94, 555 - 560 (2003)
- DE RYCKE, J., E. A. GONZALEZ, J. BLANCO, E. OSWALD, M. BLANCO und R. BOIVIN  
Evidence for two types of cytotoxic necrotizing factor in human and animal clinical isolates of *Escherichia coli*  
J. Clin. Microbiol. 28, 694 - 699 (1990)
- DE RYCKE, J., A. MILON und E. OSWALD  
Necrotoxic *Escherichia coli* (ntec): two emerging categories of human and animal pathogens  
Vet. Res. 30, 221 - 233 (1999)
- DE RYCKE, J. und E. OSWALD  
Cytotolethal distending toxin (CDT): a bacterial weapon to control host cell proliferation?  
FEMS Microbiol. Lett. 203, 141 - 148 (2001)
- DECLUDT, B., P. BOUVET, P. MARIANI-KURKDJIAN, F. GRIMONT, P. A. D. GRIMONT, B. HUBERT, C. LOIRAT und SOCIÉTÉ DE NÉPHROLOGIE PÉDIATRIQUE  
Haemolytic uraemic syndrome and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection in children in France  
Epidemiol. Infect. 124, 215 - 220 (2000)
- DE GRANDIS, S., H. LAW, J. BRUNTON, C. GYLES und C. A. LINGWOOD  
Globotetraosyl ceramide is recognized by the pig edema disease toxin  
J. Biol. Chem. 264, 12520 - 12525 (1989)
- DEIBEL, C., S. KRÄMER, T. CHAKRABORTY und F. EBEL  
EspE, a novel secreted protein of attaching and effacing bacteria, is directly translocated into infected host cells, where it appears as a tyrosine-phosphorylated 90 kDa protein  
Mol. Microbiol. 28, 463 - 474 (1998)
- DENG, W., J. L. PUENTE, S. GRUENHEID, Y. LI, B. A. VALLANCE, A. VÁZQUEZ, J. BARBA, J. A. IBARRA, P. O'DONNELL, P. METALNIKOV, K. ASHMAN, S. LEE, D. GOODE, T. PAWSON und B. B. FINLAY  
Dissecting virulence: Systematic and functional analyses of a pathogenicity island  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101, 3597 - 3602 (2004)
- DEPARTMENT OF HUMAN SERVICES, GOVERNMENT OF SOUTH AUSTRALIA  
Petting zoo infection control guideline (Stand: Februar 2002)  
<http://www.dh.sa.gov.au/pehs/PDF-files/petting-zoos-guidelines.pdf> (2002)
- DERLET, R. W. und J. R. CARLSON  
An analysis of human pathogens found in horse/mule manure along the John Muir Trail in Kings Canyon and Sequoia and Yosemite national parks  
Wilderness Environ. Med. 13, 113 - 118 (2002)
- DJAFARI, S., F. EBEL, C. DEIBEL, S. KRAMER, M. HUDEL und T. CHACRABORTY  
Characterization of an exported protease from Shiga toxin-producing *Escherichia coli*  
Mol. Microbiol. 25, 771 - 784 (1997)

- DJORDJEVIC, S. P., M. A. HORNITZKY, G. BAILEY, P. GILL, B. VANSELOW, K. WALKER und K. A. BETTELHEIM  
Virulence properties and serotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from healthy Australian slaughter-age sheep  
J. Clin. Microbiol. 39, 2017 - 2021 (2001)
- DOLL, F., H. WEBER, W. WEBER, J. BRUNIG und H. KOLB  
Eignung des RIDASCREEN® Enzymimmunoassays zum Nachweis von Verotoxinen in Lebensmitteln  
Fleischwirtsch. 81, 97 - 99 (2001)
- DONNENBERG, M. S., J. YU und J. B. KAPER  
A second chromosomal gene necessary for intimate attachment of enteropathogenic *Escherichia coli* to epithelial cells  
J. Bacteriol. 175, 4670 - 4680 (1993)
- DONTOROU, A., C. PAPADOPOULOU, G. FILIOUSSIS, I. APOSTOLOU, V. ECONOMOU, A. KANSOUZIDOU und S. LEVIDIOTOU  
Isolation of a rare *Escherichia coli* O157:H7 strain from farm animals in Greece  
Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 27, 201 - 207 (2004)
- DOUGLAS, A. S. und A. KURIEN  
Seasonality and other epidemiological features of haemolytic uraemic syndrome and *E. coli* O157 isolates in Scotland  
Scott. Med. J. 42, 166 - 171 (1997)
- DOYLE, M. P. und J. L. SCHOENI  
Survival and growth characteristics of *Escherichia coli* associated with hemorrhagic colitis  
Appl. Environ. Microbiol. 48, 855 - 856 (1984)
- DOYLE, M. P. und J. L. SCHOENI  
Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from retail fresh meats and poultry  
Appl. Environ. Microbiol. 53, 2394 - 2396 (1987)
- DRYSDALE, M., M. McRAE, N. J. C. STRACHAN, T. M. S. REID und I. D. OGDEN  
The detection of non-O157 *E. coli* in food by immunomagnetic separation  
J. Appl. Microbiol. 97, 220 - 224 (2004)
- DUFFELL, E., E. ESPIÈ, T. NICHOLS, G. K. ADAK, H. DE VALK, K. ANDERSON und J. M. STUART  
Investigation of an outbreak of *E. coli* O157 infections associated with a trip to France of schoolchildren from Somerset, England  
Eurosurveillance 8, 81 - 86 (2003)
- DUFFY, G., S. B. O'BRIEN, E. CARNEY, J. J. SHERIDAN, D. A. McDOWELL und I. S. BLAIR  
Characterisation of *E. coli* O157 isolates from bovine hide and beef trimming in Irish abattoirs by pulsed field gel electrophoresis  
J. Microbiol. Methods 60, 375 - 382 (2005)
- DUNN, J. R., J. E. KEEN, R. DEL VECCHIO, T. E WITTUM und R. A. THOMPSON  
*Escherichia coli* O157:H7 in a cohort of weaned, preconditioned range beef calves  
J. Food Prot. 67, 2391 - 2396 (2004)
- EFFLER, P., M. ISAÄCSON, L. ARNTZEN, R. HEENAN, P. CANTER, T. BARRETT, L. LEE, C. MAMBO, W. LEVINE, A. ZAIDI und M. GRIFFIN  
Factors contributing to the emergence of *Escherichia coli* O157 in Africa  
Emerg. Infect. Dis. 7, 812 - 819 (2001)

- EKLUND, M., F. SCHEUTZ und A. SIITONEN  
Clinical isolates of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: Serotypes, virulence characteristics, and molecular profiles of strains of the same serotype  
J. Clin. Microbiol. 39, 2829 - 2834 (2001)
- EKLUND, M., K. LEINO und A. SIITONEN  
Clinical *Escherichia coli* strains carrying *stx* genes: *stx* variants and *stx*-positive virulence profiles  
J. Clin. Microbiol. 40, 4585 - 4593 (2002)
- ELDER, R. O., J. E. KEEN, G. R. SIRAGUSA, G. A. BARKOCY-GALLAGHER, M. KOOHMARAIE und W. W. LAEGREID  
Correlation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 prevalence in feces, hides, and carcasses of beef cattle during processing  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 2999 - 3003 (2000)
- ELLIOTT, S. J., S. SRINIVAS, M. J. ALBERT, K. ALAM, R. M. ROBINS-BROWNE, S. T. GUNZBURG, B. J. MEE und B. J. CHANG  
Characterization of the roles of hemolysin and other toxins in enteropathy caused by alpha-hemolytic *Escherichia coli* linked to human diarrhea  
Infect. Immun. 66, 2040 - 2051 (1998a)
- ELLIOTT, S. J., L. A. WAINWRIGHT, T. K. McDANIEL, K. G. JARVIS, Y. DENG, L.-C. LAI, B. P. McNAMARA, M. S. DONNENBERG und J. B. KAPER  
The complete sequence of the locus of enterocyte effacement (LEE) from enteropathogenic *E. coli* E2348/69  
Mol. Microbiol. 28, 1 - 4 (1998b)
- ELLIOTT, E. J., R. M. ROBINS-BROWNE, E. V. O'LOUGHLIN, V. BENNETT-WOOD, J. BOURKE, P. HENNING, G. G. HOGG, J. KNIGHT, H. POWELL, D. REDMOND und CONTRIBUTORS TO THE AUSTRALIAN PAEDIATRIC SURVEILLANCE UNIT  
Nationwide study of haemolytic uraemic syndrome: clinical, microbiological, and epidemiological features  
Arch. Dis. Child. 85, 125 - 131 (2001a)
- ELLIOTT, S. J., E. O. KREJANY, J. L. MELLIES, R. M. ROBINS-BROWNE, C. SASAKAWA und J. B. KAPER  
EspG, a novel type III system-secreted protein from enteropathogenic *Escherichia coli* with similarities to VirA of *Shigella flexneri*  
Infect. Immun. 69, 4027 - 4033 (2001b)
- ELLIOTT, S. J., C. B. O'CONNELL, A. KOUTSOURIS, C. BRINKLEY, M. S. DONNENBERG, G. HECHT und J. B. KAPER  
A gene from the locus of enterocyte effacement that is required for enteropathogenic *Escherichia coli* to increase tight-junction permeability encodes a chaperone for EspF  
Infect. Immun. 70, 2271 - 2277 (2002)
- ENDO, Y., K. TSURUGI, T. YUTSUDO, Y. TAKEDA, T. OGASAWARA und K. IGARASHI  
Site of action of a vero toxin (VT2) from *Escherichia coli* O157:H7 and of Shiga toxin on eukaryotic ribosomes. RNA N-glycosidase activity of the toxins  
Eur. J. Biochem. 171, 45 - 50 (1988)
- ENGLISH, P. M. B.  
*E. coli* O157, cows to humans via rabbits? - UK (02)  
proMED-mail, 24.11.2001 (2001)
- ESCHERICH, T.  
Die Darmbakterien des Neugeborenen und Säuglings  
Fortschr. Med. 3, 514 - 557 (1885)

- ETHELBERG, S., K. E. P. OLSEN, F. SCHEUTZ, C. JENSEN, P. SCHIELLERUP, J. ENGBERG, A. M. PETERSEN, B. OLESEN, P. GERNER-SMIDT und K. MOLBAK  
Virulence factors for hemolytic uremic syndrome, Denmark  
Emerg. Infect. Dis. 10, 842 - 847 (2004)
- EZAWA, A., F. GOCHO, M. SAITOH, T. TAMURA, K. KAWATA, T. TAKAHASHI und N. KIKUCHI  
A three-year study of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 on a farm in Japan  
J. Vet. Med. Sci. 66, 779 - 784 (2004)
- FANTELLI, K.  
Häufigkeit, Virulenzspektrum und Typisierung von Shigatoxin bildenden *Escherichia coli* (STEC), *Listeria monocytogenes* und *Yersinia enterocolitica* in Hackfleischproben aus Kleinmetzgereien. Ein Beitrag zum Risk Assessment in der Schweiz  
Vet. Med. Diss, Universität Zürich (2001)
- FARMER III, J. J., B. R. DAVIS, F. W. HICKMAN-BRENNER, H. McWORTHER, G. P. HUNTLEY-CARTER, M. A. ASBURY, C. RIDDLE, H. G. WATHEN-GRADY, C. ELIAS, G. R. FANNING, A. G. STEIGERWALT, C. M. O'HARA, G. K. MORRIS, P. B. SMITH und D. J. BRENNER  
Biocemical identification of new species and biogroups of Enterobacteriaceae isolated from clinical specimens  
J. Clin. Microbiol. 21, 46 - 76 (1985)
- FDA/CFSAN (U. S. food & Drug Administration/ Center for Food Safety & Applied Nutrition)  
Bad Bug Book - Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook; Enterotoxigenic *Escherichia coli*  
<http://www.cfsan.fda.gov/~mow/chap13.html> (2003)
- FELDMAN, M. F. und G. R. CORNELIS  
The multitasking type III chaperones: all you can do with 15 kDa  
FEMS Microbiol. Lett. 219, 151 - 158 (2003)
- FENG, P. C. S. und P. A. HARTMAN  
Fluorogenic assays for immediate confirmation of *Escherichia coli* (1982)  
Appl. Environ. Microbiol. 43, 1320 - 1329 (1982)
- FENG, P., K. A. LAMPEL, H. KARCH und T. S. WHITTAM  
Genotypic and phenotypic changes in the emergence of *Escherichia coli* O157:H7  
J. Infect. Dis. 177, 1750 - 1753 (1998)
- FENG, P., M. DEY, A. ABE und T. TAKEDA  
Isogenic strain of *Escherichia coli* O157:H7 that has lost both Shiga toxin 1 and 2 genes  
Clin. Diagn. Lab. Immunol. 8, 711 - 717 (2001)
- FENWICK, B. W. und L. A. COWAN  
Canine model of hemolytic-uremic syndrome  
in: Kaper, J. B. und A. D. O'Brien (Hrsg.), *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* strains, American Society for Microbiology, Washington, D. C., 268 - 277 (1998)
- FIELDS, P. I., K. BLOM, H. J. HUGHES, L. O. HELSEL, P. FENG und B. SWAMINATHAN  
Molecular characterization of the gene encoding H antigen in *Escherichia coli* and development of a PCR-restriction fragment length polymorphism test for identification of *E. coli* O157:H7 and O157:NM  
J. Clin. Microbiol. 35, 1066 - 1070 (1997)

- FINLAY, B. B. und S. FALKOW  
Common themes in microbial pathogenicity revisited  
Microbiol. Mol. Biol. Rev. 61, 136 - 169 (1997)
- FISCHER, J. R., T. ZHAO, M. P. DOYLE, M. R. GOLDBERG, C. A. BROWN, C. T. SEWELL,  
D. M. KAVANAUGH und C. D. BAUMAN  
Experimental and field studies of *Escherichia coli* O157:H7 in white-tailed deer  
Appl. Environ. Microbiol. 67, 1218 - 1224 (2001)
- FITZHENRY, R. J., S. REECE, L. R. TRABULSI, R. HEUSCHKEL, S. MURCH, M.  
THOMSON, G. FRANKEL und A. D. PHILLIPS  
Tissue tropism of enteropathogenic *Escherichia coli* strains belonging to the O55 serogroup  
Infect. Immun. 70, 4362 - 4368 (2002)
- FITZHENRY, R. J., M. P. STEVENS, C. JENKINS, T. S. WALLIS, R. HEUSCHKEL, S.  
MURCH, M. THOMSON, G. FRANKEL und A. D. PHILLIPS  
Human intestinal tissue tropism of intimin epsilon O103 *Escherichia coli*  
FEMS Microbiol. Lett. 218, 311 - 316 (2003)
- FLORES, R. A. und M. L. TAMPLIN  
Distribution patterns of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef produced by a laboratory-  
scale grinder  
J. Food Prot. 65, 1894 - 1902 (2002)
- FLORES, R. A.  
Distribution of *Escherichia coli* O157:H7 in beef processed in a table-top bowl cutter  
J. Food Prot. 67, 246 - 251 (2004)
- FN (Deutsche Reiterliche Vereinigung e. V.)  
Zahlen, Daten, Fakten zum Pferdesport in Deutschland - Die 111 wichtigsten und  
interessantesten Eckdaten des Jahres 2003  
[http://www.fn-dokr.de/isy.net/servlet/broadcast/jahresbericht\\_fakten.html](http://www.fn-dokr.de/isy.net/servlet/broadcast/jahresbericht_fakten.html) (2005)
- FOLEY, S. L., S. SIMJEE, J. MENG, D. G. WHITE, P. F. McDERMOTT und S. ZHAO  
Evaluation of molecular typing methods for *Escherichia coli* O157:H7 isolates from cattle,  
food, and humans  
J. Food Prot. 67, 651 - 657 (2004)
- FOSTER, J. W.  
*Escherichia coli* acid resistance: tales of an amateur acidophile  
Nat. Rev. Microbiol. 2, 898 - 907 (2004)
- FRANKE, S., D. HARMSEN, A. CAPRIOLI, D. PIERARD, L. H. WIELER und H. KARCH  
Clonal relatedness of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* O101 strains of human  
and porcine origin  
J. Clin. Microbiol. 33, 3174 - 3178 (1995)
- FRASER, M. E., M. FUJINAGA, M. M. CHERNEY, A. R. MELTON-CHELSEA, E. M. TWIDDY,  
A. D. O'BRIEN und M. N. G. JAMES  
Structure of Shiga toxin type 2 (Stx2) from *Escherichia coli* O157:H7  
J. Biol. Chem. 279, 27511 - 27517 (2004)
- FRATAMICO, P. M., F. J. SCHULTZ und R. L. BUCHANAN  
Rapid isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from enrichment cultures of foods using an  
immunomagnetic separation method  
Food Microbiol. 9, 105 - 113 (1992)

- FRIEDRICH, A. W., M. BIELASZEWSKA, W.-L. ZHANG, M. PULZ, T. KUCZIUS, A. AMMON und H. KARCH  
*Escherichia coli* harboring Shiga toxin 2 gene variants: frequency and association with clinical symptoms  
J. Infect. Dis. 185, 74 - 84 (2002)
- FRIEDRICH, A. W., J. BORELL, M. BIELASZESKA, A. FRUTH, H. TSCHÄPE und H. KARCH  
Shiga toxin 1c producing *Escherichia coli* strains: Phenotypic and genetic characterization and association with human disease  
J. Clin. Microbiol. 41, 2448 - 2453 (2003)
- FRIEDRICH, A. W., K. V. NIERHOFF, M. BIELASZEWSKA, A. MELLMANN und H. KARCH  
Phylogeny, clinical associations, and diagnostic utility of the pilin subunit gene (*sfpA*) of sorbitol-fermenting, enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H<sup>-</sup>  
J. Clin. Microbiol. 42, 4697 - 4701 (2004)
- FRUTH, A., H. RICHTER, M. TIMM, W. STRECKEL, H. KLIE, R. PRAGER, R. REISSBRODT, P. GALLIEN, E. SKIEBE, I. RIENÄCKER, H. KARCH, J. BOCKEMÜHL, K.-W. PERLBERG und H. TSCHÄPE  
Zur Verbesserung der gegenwärtigen bakteriologischen Diagnostik von enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC)  
Bundesgesundhbl. 43, 310 – 317 (2000)
- FRUTH, A., R. PRAGER, A. FRIEDRICH, T. KUCZIUS, P. ROGGENTIN, H. KARCH, A. AMMON, J. BOCKEMÜHL und H. TSCHÄPE  
Infektionen des Menschen durch enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC) in der Bundesrepublik Deutschland von 1998 bis 2001  
Bundesgesundhbl. 45, 715 – 721 (2002)
- FSIS/USDA (Food Safety and Inspection Service/ United States Department of Agriculture)  
New measures to address *E. coli* O157:H7 contamination  
<http://www.fsis.usda.gov/OA/background/ec0902.htm> (2002)
- FSIS/USDA (Food Safety and Inspection Service/ United States Department of Agriculture)  
FSIS sampling for ground beef shows *E. coli* O157:H7 downward trend  
<http://www.fsis.usda.gov/OA/news/2003/gbsample.htm> (2003)
- FSIS/USDA (Food Safety and Inspection Service/ United States Department of Agriculture)  
Microbiological results of raw ground beef products analyzed for *Escherichia coli* O157:H7  
<http://www.fsis.usda.gov/Frame/FrameRedirect.asp?main=http://www.fsis.usda.gov/OPHS/ecoltest/tables1.htm> (2004a)
- FSIS/USDA (Food Safety and Inspection Service/ United States Department of Agriculture)  
Raw ground beef - *E. coli* testing results  
[http://www.fsis.usda.gov/Science/Ground\\_Beef\\_E.Coli\\_Testing\\_Results/index.asp](http://www.fsis.usda.gov/Science/Ground_Beef_E.Coli_Testing_Results/index.asp) (2004b)
- FUKUSHIMA, H., K. HOSHINA und M. GOMYODA  
Long-term survival of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26, O111, and O157 in bovine feces  
Appl. Environ. Microbiol. 65, 5177 – 5181 (1999)
- FUKUSHIMA, H. und R. SEKI  
High numbers of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* found in bovine faeces collected at slaughter in Japan  
FEMS Microbiol. Lett. 238, 189 - 197 (2004)

- GALLAND, J. C., D. R. HYATT, S. S. CRUPPER und D. A. ACHESON  
Prevalence, antibiotic susceptibility, and diversity of *Escherichia coli* O157:H7 isolates from a longitudinal study of beef cattle feedlots  
Appl. Environ. Microbiol. 67, 1619 - 1627 (2001)
- GALLIEN, P., H. KLIE, S. LEHMANN, D. PROTZ, R. HELMUTH, R. SCHÄFER und M. EHRLER  
Nachweis verotoxinbildender *E. coli* in Feldisolaten von Haus- und landwirtschaftlichen Nutztieren in Sachsen-Anhalt  
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 107, 331 – 334 (1994)
- GALLIEN, P., H. RICHTER, H. KLIE, M. TIMM, H. KARCH, S. LEHMANN, K.-W. PERLBERG, P. TEUFEL und D. PROTZ  
Nachweis von Shigatoxin-produzierenden *Escherichia coli* (STEC) in Lebensmitteln und Charakterisierung der Isolate  
Bundesgesundhbl. 41, 26 – 30 (1998)
- GALLIEN, P., H. KARCH, C. MUCH, H. STEINRÜCK, S. LEHMANN, M. TIMM, H. RICHTER, K.-W. PERLBERG und D-PROTZ  
Subtypisierung von *eae*-Genen in Shigatoxin-produzierenden *Escherichia coli* (STEC)  
Fleischwirtsch. 80, 84 – 89 (2000)
- GALLIEN, P., C. MUCH, K.-W. PERLBERG und D. PROTZ  
Nachweis der High-Pathogenicity Island in Shigatoxin-produzierenden *Escherichia coli* aus unterschiedlichen Habitaten  
Fleischwirtsch. 81, 86 - 88 (2001)
- GALLIEN, P., A. STAHL und M. BÜLTE  
Ergebnisse eines bundesweiten Ringversuchs - Standardisierung eines molekularbiologischen Verfahrens zur Charakterisierung Shigatoxin-bildnder *E. coli*  
Fleischwirtsch. 82, 105 - 109 (2002a)
- GALLIEN, P., M. TIMM, S. LEHMANN und H. STEINRÜCK  
Vorkommen der Pathogenitätsinsel LPA in Shigatoxin-produzierenden *Escherichia coli*  
Fleischwirtsch. 82, 119 – 122 (2002b)
- GALLIEN, P., S. LEHMANN, M. TIMM und H. STEINRÜCK  
Nachweis Shigatoxin-produzierender *E. coli* im Kot von Schlachtrindern und auf Schlachtkörperoberflächen  
Fleischwirtsch. 83, 142 – 145 (2003)
- GALLIEN, P., M. TIMM, S. LEHMANN, U. BRANDT und A. SCHILLER  
Method for detection and specific isolation of Shigatoxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in vegetarian foods  
EHEC-Workshop 2004, Wildbad Kreuth, 22.-24. Juli 2004 (2004)
- GANNON, V. P. J., C. TEERLING, S. A. MASRI und C. L. GYLES  
Molecular cloning and nucleotide sequence of another variant of the *Escherichia coli* Shiga-like toxin II family  
J. Gen. Microbiol. 136, 1125 - 1135 (1990)
- GARBER, L., S. WELLS, L. SCHROEDER-TUCKER und K. FERRIS  
Factors associated with fecal shedding of verotoxin-producing *Escherichia coli* O157 on dairy farms  
J. Food Prot. 62, 307 – 312 (1999)
- GARCÍA, A. und J. G. FOX  
The rabbit as a new reservoir host of enterohemorrhagic *Escherichia coli*  
Emerg. Infect. Dis. 9, 1592 - 1597 (2003)

- GARCÍA, A., R. P. MARINI, Y. FENG, A. VITSKY, K. A. KNOX, N. S. TAYLOR, D. B. SCHAUER und J. G. FOX  
A naturally occurring rabbit model of enterohemorrhagic *Escherichia coli*-induced disease  
J. Infect. Dis. 186, 1682 - 1686 (2002)
- GAREIS, M., R. PICHNER, N. BREY und H. STEINRÜCK  
Nachweis Verotoxin-bildender *E. coli* (VTEC) bei gesunden Mitarbeitern eines Fleisch verarbeitenden Betriebes  
Bundesgesundhbl. 43, 781 – 787 (2000)
- GARG, A. X., R. S. SURI, N., BARROWMAN, F. REHMAN, D. MATSELL, M. P. ROSAS-ARELLANO, M. SALVADORI, R. B. HAYNES und W. F. CLARK  
Long-term renal prognosis of diarrhea-associated hemolytic uremic syndrome  
JAMA 290, 1360 - 1370 (2003)
- GARRED, O., B. VAN DEURS und K. SANDVIG  
Furin-induced cleavage and activation of Shiga toxin  
J. Biol. Chem. 270, 10817 - 10821 (1995)
- GASSER, C., E. GAUTHIER, A. STECK, R. E. SIEBENMANN und R. OECHSLIN  
Hämolytisch-urämisches Syndrom: bilaterale Nierenrindennekrosen bei akuten erworbenen hämolytischen Anämien  
Schweiz. Med. Wochenschr. 85, 905 - 909 (1955)
- GAUTHIER, A. und B. B. FINLAY  
Type III secretion system inhibitors are potential antimicrobials  
ASM News 68, 383 - 387 (2002)
- GE, B., S. ZHAO, R. HALL und J. MENG  
A PCR-ELISA for detecting Shiga-toxin-producing *Escherichia coli*  
Microbes Infect. 4, 285 - 290 (2002)
- GERBER, A., H. KARCH, F. ALLERBERGER, H. M. VERWEYEN und L. B. ZIMMERHACKL  
Clinical course and the role of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection on the hemolytic-uremic syndrome in pediatric patients, 1997-2000, in Germany and Austria: a prospective study  
J. Infect. Dis. 186, 493 - 500 (2002)
- GEUE, L., M. SEGURA-ALVAREZ, F. J. CONRATHS, T. KUCZIUS, J. BOCKEMÜHL, H. KARCH und P. GALLIEN  
A long-term study on the prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) on four German cattle farms  
Epidemiol. Infect. 129, 173 - 185 (2002)
- GIAMMANCO, G. M., S. PIGNATO, F. GRIMONT, P. A. D. GRIMONT, A. CAPRIOLI, S. MORABITO und G. GIAMMANCO  
Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 isolated in Italy and France  
J. Clin. Microbiol. 40, 4619 - 4624 (2002)
- GIANVITI, A., A. E. TOZZI, L. DE PETRIS, A. CAPRIOLI, L. RAVA, A. EDEFONTI, G. ARDISSINO, G. MONTINI, G. ZACCHELLO, A. FERRETTI, C. PECORARO, T. DE PALO, A. CARINGELLA, M. GAIDO, R. COPPO, F. PERFUMO, N. MIGLIETTI, I. RATSCHKE, R. PENZA, G. CAPASSO, S. MARINGHINI, S. LI VOLTI, C. SETZU, M. PENNESI, A. BETTINELLI, L. PERATONER, I. PELA, E. SALVAGGIO, G. LAMA, S. MAFFEI und G. RIZZONI  
Risk factors for poor renal prognosis in children with hemolytic uremic syndrome  
Pediatr. Nephrol. 18, 1229 - 1235 (2003)

- GIRON, J. A., T. JONES, F. MILLAN-VELASCO, E. CASTRO-MUNOZ, L. ZARATE, J. FRY, G. FRANKEL, S. L. MOSELEY, B. BAUDRY und J. B. KAPER  
Diffuse-adhering *Escherichia coli* (DAEC) as a putative cause of diarrhea in Mayan children in Mexico  
J. Infect. Dis. 163, 507 - 513 (1991)
- GOBIUS, K. S., G. M. HIGGS und P. M DESMARCHELIER  
Presence of activatable Shiga toxin genotype (*stx<sub>2d</sub>*) in Shiga toxicogenic *Escherichia coli* from livestock sources  
J. Clin. Microbiol. 41, 3777 - 3783 (2003)
- GRANT, M. A.  
Improved laboratory enrichment for enterohemorrhagic *Escherichia coli* by exposure to extremely acidic conditions  
Appl. Environ. Microbiol. 70, 1226 - 1230 (2004)
- GRAUKE, L. J., I. T. KUDVA, J. W. YOON, C. W. HUNT, C. J. WILLIAMS und C. J. HOVDE  
Gastrointestinal tract location of *Escherichia coli* O157:H7 in ruminants  
Appl. Environ. Microbiol. 68, 2269 – 2277 (2002)
- GRIF, K., H. KARCH, C. SCHNEIDER, F. D. DASCHNER, L. BEUTIN, T. CHEASTY, H. SMITH, B. ROWE, M. P. DIERICH und F. ALLERBERGER  
Comparative study of five different techniques for epidemiological typing of *Escherichia coli* O157  
Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 32, 165 - 176 (1998a)
- GRIF, K., M. P. DIERICH, H. KARCH und F. ALLERBERGER  
Strain-specific differences in the amount of Shiga toxin released from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 following exposure to subinhibitory concentrations of antimicrobial agents  
Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 17, 761 - 766 (1998b)
- GROSSMANN, K. M.  
Nachweis und Charakterisierung von Shigatoxin-bildenden *Escherichia coli* (STEC) bei Tauben  
Vet. Med. Diss., Freie Universität Berlin (2002)
- GRUENHEID, S., I. SEKIROV, N. A. THOMAS, W. DENG, P. O'DONNELL, D. GOODE, Y. LI, E. A. FREY, N. F. BROWN, P. METALNIKOV, T. PAWSON, K. ASHMAN und B. B. FINLAY  
Identification and characterization of NleA, a non-LEE-encoded type III translocated virulence factor of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7  
Mol. Microbiol. 51, 1233 - 1249 (2004)
- GUNZBURG, S. T., B. J. CHANG, S. J. ELLIOTT, V. BURKE und M. GRACEY  
Diffuse and enteroaggregative patterns of adherence of enteric *Escherichia coli* isolated from aboriginal children from the Kimberley region of Western Australia  
J. Infect. Dis. 167, 755 - 758 (1993)
- GUNZER, F., H. BÖHM, H. RÜSSMANN, M. BITZAN, S. ALEKSIK und H. KARCH  
Molecular detection of sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157 in patients with hemolytic-uremic syndrome  
J. Clin. Microbiol. 30, 1807 – 1810 (1992)

- GUPTA, A., S. B. HUNTER, S. A. BIDOL, S. DIETRICH, J. KINCAID, E. SALEHI, L. NICHOLSON, C. A. GENESE, S. TODD-WEINSTEIN, L. MARENGO, A. C. KIMURA und J. T. BROOKS  
*Escherichia coli* O157 cluster evaluation  
Emerg. Infect. Dis. 10, 1856 - 1858 (2004)
- GYLES, C., R. JOHNSON, A. GAO, K. ZIEBELL, D. PIERARD, S. ALEKSIC und P. BOERLIN  
Association of enterohemorrhagic *Escherichia coli* hemolysin with serotypes of Shiga-like-toxin-producing *Escherichia coli* of human and bovine origins  
Appl. Environ. Microbiol. 64, 4134 – 4141 (1998)
- HAHM, B.-K., Y. MALDONADO, E. SCHREIBER, A. K. BHUNIA und C. H. NAKATSU  
Subtyping of foodborne and environmental isolates of *Escherichia coli* by multiplex-PCR, rep-PCR, PFGE, ribotyping and AFLP  
J. Microbiol. Methods 53, 387 - 399 (2003)
- HAHN, H., D.FALKE, S.H.E. KAUFMANN und U. ULLMANN  
Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie  
Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 3. Auflage, 251 (1999)
- HAJNA, A. A.  
A new enrichment broth medium for gram-negative organisms of the intestinal group  
Publ. Hlth. Lab. 13, 59 - 62 (1955)
- HANCOCK, D. D., D. H. RICE, L. A. THOMAS, D. A. DARGATZ und T. E. BESSER  
Epidemiology of *Escherichia coli* O157 in feedlot cattle  
J. Food Prot. 60, 462 - 465 (1997)
- HANCOCK, D. D., T. E. BESSER, D. H. RICE, E. D. EBEL, D. E. HERRIOTT und L. V. CARPENTER  
Multiple sources of *Escherichia coli* O157 in feedlots and dairy farms in the Northwestern USA  
Prev. Vet. Med. 35, 11 - 19 (1998)
- HANCOCK, D., T. BESSER, J. LEJEUNE, M. DAVIS und D. RICE  
The control of VTEC in the animal reservoir  
Int. J. Food Microbiol. 66, 71 - 78 (2001)
- HARA-KUDO, Y., M. MIYAHARA und S. KUMAGAI  
Loss of O157 antigenicity of verotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 surviving under starvation conditions  
Appl. Environ. Microbiol. 66, 5540 - 5543 (2000)
- HARMON, B. G., C. A. BROWN, S. TKALCIC, P. O. E. MUELLER, A. PARKS, A. V. JAIN, T. ZHAO und M. P. DOYLE  
Fecal shedding and rumen growth of *Escherichia coli* O157:H7 in fasted calves  
J. Food Prot. 62, 574 - 579 (1999)
- HARTLEIB, S., R. PRAGER, I. HEDENSTRÖM, S. LÖFDAHL und H. TSCHÄPE  
Prevalence of the new, SPI1-like, pathogenicity island ETT2 among *Escherichia coli*  
Int. J. Med. Microbiol. 292, 487 - 493 (2003)
- HARTUNG, M. (Hrsg.)  
Bericht über die epidemiologische Situation der Zoonosen in Deutschland für 1999  
[www.bgvv.de/cm/222/zoober99.pdf](http://www.bgvv.de/cm/222/zoober99.pdf), S. 123 (2000)

HARTUNG, M. (Hrsg.)

Bericht über die epidemiologische Situation der Zoonosen in Deutschland für 2002

[www.bgvv.de/cm/222/epidemiologische\\_situation\\_der\\_zoonosen\\_in\\_deutschland\\_im\\_jahr\\_2002.pdf](http://www.bgvv.de/cm/222/epidemiologische_situation_der_zoonosen_in_deutschland_im_jahr_2002.pdf), S. 175 - 176 (2003)

HAYASHI, T., K. MAKINO, M. OHNISHI, K. KUROKAWA, K. ISHI, K. YOKOYAMA, C.-G. HAN, E. OHTSUBO, K. NAKAYAMA, T. MURATA, M. TANAKA, T. TOBE, T. IIDA, H. TAKAMI, T. HONDA, C. SASAKAWA, N. OGASAWARA, T. YASUNAGA, S. KUHARA, T. SHIBA, M. HATTORI und H. SHINAGAWA

Complete genome sequence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and genomic comparison with a laboratory strain K-12

DNA Res. 8, 11 - 22 (2001)

HECKÖTTER, S.

Vergleichende Untersuchungen zum Nachweis von *E. coli* O157.H7-Stämmen aus künstlich kontaminiertem Rinderhackfleisch unter besonderer Berücksichtigung der immunomagnetischen Separation (IMS)

Vet. Med. Diss., Justus-Liebig-Universität Gießen (1999)

HEIR, W., B. A. LINDSTEDT, T. VARDUND, Y. WASTESON und G. KAPPERUD

Genomic fingerprinting of shigatoxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains: comparison of pulsed field gel electrophoresis (PFGE) and fluorescent amplified-fragment-length polymorphism (FAFLP)

Epidemiol. Infect. 125, 537 - 548 (2000)

HEROLD, S. und H. SCHMIDT

Genaktivität von *E. coli* O157:H7 EDL 933 unter Einfluß von Norfloxacin

6. Fachsymposium der Fachgruppe Lebensmittelmikrobiologie und -hygiene der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) in Zusammenarbeit mit den Fachgruppen der DVG und VAAM, Suhl, 10.-12.03.2004 (2004)

HERTZKE, D. M., L. A. COWAN, P. SCHONING und B. W. FENWICK

Glomerular ultrastructural lesions of idiopathic cutaneous and renal glomerular vasculopathy of greyhounds

Vet. Pathol. 32, 451 - 459 (1995)

HESS, R. D., R. LIESKE, G. KLOPFER und D. W. K. ACHESON

Conclusions from a questionnaire on STEC/VTEC diagnostics in the Federal Republic of Germany

J. Lab. Med. 23, 427 - 436 (1999)

HEUVELINK, A. E., K. WERNARS und E. DE BOER

Occurrence of *Escherichia coli* O157 and other verocytotoxin-producing *E. coli* in retail raw meats in the Netherlands

J. Food Prot. 59, 1267 - 1272 (1996)

HEUVELINK, A. E., F. L. A. M. VAN DEN BIGGELAAR, E. DE BOER, R. G. HERBES, W. J. G. MELCHERS, J. H. J. HUIS IN 'T VELD und L. A. H. MONNENS

Isolation and characterization of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 strains from Dutch cattle and sheep

J Clin. Microbiol. 36, 878 - 882 (1998a)

HEUVELINK, A. E., F. L. A. M. VAN DEN BIGGELAAR, J. T. M. ZWARTKRUIS-NAHUIS, R. G. HERBES, R. HUYBEN, N. NAGELKERKE, W. J. G. MELCHERS, L. A. H. MONNENS und E. DE BOER

Occurrence of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 on Dutch dairy farms

J. Clin. Microbiol. 36, 3480 - 3487 (1998b)

- HEUVELINK, A. E., J. T. M. ZWARTKRUIS-NAHUIS, F. L. A. M. VAN DEN BIGGELAAR, W. J. VAN LEEUWEN und E. DE BOER  
Isolation and characterization of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 from slaughter pigs and poultry  
Int. J. Food Microbiol. 52, 67 – 75 (1999)
- HEUVELINK, A. E., C. VAN HEERWAARDEN, J. T. M. ZWARTKRUIS-NAHUIS, R. VAN OOSTEROM, K. EDINK, Y. T. H. P. VAN DUYNHOVEN und E. DE BOER  
*Escherichia coli* O157 infection associated with a petting zoo  
Epidemiol. Infect. 129, 295 - 302 (2002)
- HEUVELINK, A. E., C. VAN HEERWAARDEN, J. J. H. C. VALKENBURG und E. DE BOER  
Occurrence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* on petting zoos  
5<sup>th</sup> International Symposium on "Shiga Toxin (Verocytotoxin) - Producing *Escherichia coli* Infections", Edinburgh, Schottland, 08.-11.06.2003 (2003)
- HOLLAND, R. E., A. SCHMIDT, N. SRIRANGANATHAN, S. D. GRIMES, R. A. WILSON, C. M. BROWN und R. D. WALKER  
Characterization of *Escherichia coli* isolated from foals  
Vet. Microbiol. 48, 243 – 255 (1996)
- HOLLAND, R. E., R. A. WILSON, M. S. HOLLAND, V. YUZBASIYAN-GURKAN, T. P. MULLANEY und D. G. WHITE  
Characterization of *eae*<sup>+</sup> *Escherichia coli* isolated from healthy and diarrheic calves  
Vet. Microbio. 66, 251 - 263 (1999)
- HOLT, J. G., N. R. KRIEG, P. H. A. SNEATH, J. T. STALEY und S. T. WILLIAMS  
Bergey's Manual of Determinative Bacteriology  
Williams & Wilkins Verlag, 9. Auflage, 179 - 180 (1994)
- HOORFAR, J., N. COOK, B. MALORNY, M. WAGNER, D. DE MEDICI, A. ABDULMAWJOOD und P. FACH  
Diagnostic PCR: making internal control mandatory  
J. Appl. Microbiol. 96, 221 - 222 (2004)
- HOPKINS, K. L. und A. C. HILTON  
Optimization of random amplification of polymorphic DNA analysis for molecular subtyping of *Escherichia coli* O157  
Lett. Appl. Microbiol. 32, 126 - 130 (2001)
- HOVDE, C. J., P. R. AUSTIN, K. A. CLOUD, C. J. WILLIAMS und C. W. HUNT  
Effect of cattle diet on *Escherichia coli* O157:H7 acid resistance  
Appl. Environ. Microbiol. 65, 3233 – 3235 (1999)
- HUGHES, A. K., P. K. STRICKLETT und C. E. KOHAN  
Cytotoxic effect of Shiga toxin-1 on human proximal tubule cells  
Kidney Int. 54, 426 - 437 (1998)
- HUGHES, A. K., P. K. STRICKLETT, D. SCHMID und D. E. KOHAN  
Cytotoxic effect of Shiga toxin-1 on human glomerular epithelial cells  
Kidney Int. 57, 2350 - 2359 (2000)
- HULL, A. E., D. W. K. ACHESON, P. ECHEVERRIA, A. DONOHUE-ROLFE und G. KEUSCH  
Mitomycin immunoblot colony assay for detection of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* in fecal samples: comparison with DNA probes  
J. Clin. Microbiol. 31, 1167 – 1172 (1993)

- HUPPERTZ, H. I., S. RUTKOWSKI, S. ALEKSIC und H. KARCH  
Acute and chronic diarrhoea and abdominal colic associated with enteroaggregative *Escherichia coli* in young children living in western Europe  
*Lancet* 349, 1660 -1662 (1997)
- HURLEY, B. P., C. M. THORPE und D. W. K. ACHESON  
Shiga toxin translocation across intestinal epithelial cells is enhanced by neutrophil transmigration  
*Infect. Immun.* 69, 6148 - 6155 (2001)
- HUSEMAN, D., J. GELLERMAN, I. VOLLMER, I. OHDE, S. DEVAUX, J. H. EHRICH und G. FILLER  
Long-term prognosis of hemolytic uremic syndrome and effective renal plasma flow  
*Pediatr. Nephrol.* 13, 672 - 677 (1999)
- HUYS, G., M. CNOCKAERT, J. M. JANDA und J. SWINGS  
*Escherichia albertii* sp. nov., a diarrhoeagenic species isolated from stool specimens of Bangladeshi children.  
*Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53, 807 - 810 (2003)
- IKEDA, K., O. IDA, K. KIMOTO, T. TAKATORIGE, N. NAKANISHI und K. TATARA  
Effect of early fosfomycin treatment on prevention of hemolytic uremic syndrome accompanying *Escherichia coli* O157:H7 infection  
*Clin. Nephrol.* 52, 357 - 362 (1999)
- ISAÄCSON, M., P. H. CANTER, P. EFFLER, L. ARNTZEN, P. BOMANS und R. HEENAN  
Haemorrhagic colitis epidemic in Africa  
*Lancet* 341, 961 (1993)
- ITO, H., A. TERAJ, H. KURAZONO, Y. TAKEDA und M. NISHIBUCHI  
Cloning and nucleotide sequencing of Vero toxin 2 variant genes from *Escherichia coli* O91:H21 isolated from a patient with the hemolytic uremic syndrome  
*Microb. Pathog.* 8, 47 - 60 (1990)
- ITOH, Y., Y. SUGITA-KONISHI, F. KASUGA, M. IWAKI, Y. HARA-KUDO, N. SAITO, Y. NOGUCHI, H. KONUMA und S. KUMUGAI  
Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 present in radish sprouts  
*Appl. Environ. Microbiol.* 64, 1532 - 1535 (1998)
- IWASA, M., S. MAKINO, H. ASAKURA, H. KOBORI und Y. MORIMOTO  
Detection of *Escherichia coli* O157:H7 from *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) at a cattle farm in Japan  
*J. Med. Entomol.* 36, 108 - 112 (1999)
- IYODA, S., A. WADA, J. WELLER, S. J. FLOOD, E. SCHREIBER, B. TUCKER und H. WATANABE  
Evaluation of AFLP, a high-resolution DNA fingerprinting method, as a tool for molecular subtyping of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 isolates  
*Microbiol. Immunol.* 43, 803 - 806 (1999)
- JACEWICZ, M. S., D. W. K. ACHESON, D. G. BINION, G. A. WEST, L. L. LINCICOME, C. FIOCHHI und G. T. KEUSCH  
Responses of human intestinal microvascular endothelial cells to Shiga toxins 1 and 2 and pathogenesis of hemorrhagic colitis  
*Infect. Immun.* 67, 1439 - 1444 (1999)

- JACKSON, M. P., J. W. NEWLAND, R. K. HOLMES und A. D. O'BRIEN  
Nucleotide sequence analysis of the structural genes for Shiga-like toxin I encoded by bacteriophage 933J from *Escherichia coli*  
*Microb. Pathog.* 2, 147 - 153 (1987a)
- JACKSON, M. P., R. J. NEILL, A. D. O'BRIEN, R. K. HOLMES und J. W. NEWLAND  
Nucleotide sequence analysis and comparison of the structural genes for Shiga-like toxin I and Shiga-like toxin II encoded by bacteriophages from 933J from *Escherichia coli* 933  
*FEMS Microbiol. Lett.* 44, 109 - 114 (1987b)
- JAMES, E. C., K. N. STANLEY, H. E. ALLISON, H. J. FLINT, C. S. STEWART, R. J. SHARP, J. R. SAUNDERS und A. J. McCARTHY  
Lytic and lysogenic infection of diverse *Escherichia coli* and *Shigella* strains with a verocytotoxigenic bacteriophage  
*Appl. Environ. Microbiol.* 67, 4335 - 4337 (2001)
- JAMES, M., M. FUJINAGE, M. E. FRASER, M. M. CHERNEY, A. R. MELTON-CELSA, E. TWIDDY und A. D. O'BRIEN  
The molecular structure of Shiga toxin type 2 from *Escherichia coli* O157:H7  
5<sup>th</sup> International Symposium on "Shiga Toxin (Verocytotoxin)-Producing *Escherichia coli* Infections", Edinburgh, Schottland, 08.-11.06.2003 (2003)
- JANKA, A.  
Genomische Unterschiede zwischen Shiga Toxin-produzierenden *Escherichia coli* (STEC) O157:H7 und Sorbitol-fermentierenden (SF) STEC O157:H<sup>-</sup>  
Diss., Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg (2000)
- JANKA, A., M. BIELASZEWSKA, U. DOBRINDT und H. KARCH  
Identification and distribution of the enterohemorrhagic *Escherichia coli* factor for adherence (efa1) gene in sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157:H<sup>-</sup>  
*Int. J. Med. Microbiol.* 292, 207 - 214 (2002)
- JANKA, A. M. BIELASZEWSKA, U. DOBRINDT, L. GREUNE, M. A. SCHMIDT und H. KARCH  
Cytotoxic distending toxin gene cluster in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H<sup>-</sup> and O157:H7 Characterization and evolutionary considerations.  
*Infect. Immun.* 71, 3634 - 3638 (2003)
- JARVIS, K. G., J. A. GIRON, A. E. JERSE, T. K. McDANIEL, M. S. DONNENBERG und J. B. KAPER  
Enteropathogenic *Escherichia coli* contains a specialized secretion system necessary for the export of proteins involved in attaching and effacing lesion formation  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 7996 - 8000 (1995)
- JARVIS, K. G. und J. B. KAPER  
Secretion of extracellular proteins by enterohemorrhagic *Escherichia coli* via a putative type III secretion system  
*Infect. Immun.* 64, 4826 - 4829 (1996)
- JELACIC, J. K., T. DAMROW, G. S. CHEN, S. JELACIC, M. BIELASZEWSKA, M. CIOL, H. M. CARVALHO, A. R. MELTON-CELSA, A. D. O'BRIEN und P. I. TARR  
Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Montana: bacterial genotypes and clinical profiles  
*J. Infect. Dis.* 188, 719 - 729 (2003)
- JENKINS, C., N. T. PERRY, T. CHEASTY, D. H. SHAW, G. FRANKEL, G. DOUGAN, G. J. GUNN, H. R. SMITH, A. W. PATON und J. C. PATON  
Distribution of the saa gene in strains of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* of human and bovine origins  
*J. Clin. Microbiol.* 41, 1775 - 1778 (2003)

- JERSE, A. E., J. YU, B. D. TALL und J. B. KAPER  
A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 7839 - 7843 (1990)
- JIANG, X., J. MORGAN und M. P. DOYLE  
Fate of *Escherichia coli* O157:H7 in manure-amended soil  
Appl. Environ. Microbiol. 68, 2605 – 2609 (2002)
- JOHNSEN, G., Y. WASTESON, E. HEIR, O. I. BERGET und H. HERIKSTAD  
*Escherichia coli* O157:H7 in faeces from cattle, sheep and pigs in the southwestern part of Norway during 1998 and 1999  
Int. J. Food Microbiol. 65, 193 - 200 (2001)
- JOHNSON, W. M. und H. LIOR  
Response of Chinese hamster ovary cells to a cytolethal distending toxin (CDT) of *Escherichia coli* and possible misinterpretation as heat-labile (LT) enterotoxin  
FEMS Microbiol. Lett. 43, 19 - 23 (1987)
- JOHNSON, W. M. und H. LIOR  
A new heat-labile cytolethal distending toxin (CLDT) produced by *Escherichia coli* isolates from clinical material  
Microb. Pathog. 4, 103 - 113 (1988)
- JOHNSON, J. R. und T. T. O'BRYAN  
Improved repetitive-element PCR fingerprinting for resolving pathogenic and nonpathogenic phylogenetic groups within *Escherichia coli*  
Clin. Diagn. Lab. Immun. 7, 265 - 273 (2000)
- JOHNSON, J. R. und A. L. STELL  
PCR for specific detection of H7 flagellar variant of *fliC* among extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*  
J. Clin. Microbiol. 39, 3712 - 3717 (2001)
- JOHNSON, W. M., D. R. POLLARD, H. LIOR, S. D. TYLER und K. R. ROZEE  
Differentiation of genes coding for *Escherichia coli* verotoxin 2 and the verotoxin associated with porcine edema disease (VTe) by the polymerase chain reaction  
J. Clin. Microbiol. 28, 2351 - 2353 (1990)
- JONSSON, M. E., A. ASPÁN, E. ERIKSSON und I. VÅGSHOLM  
Persistence of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 in calves kept on pasture and in calves kept indoors during the summer months in a Swedish dairy herd  
Int. J. Food Microbiol. 66, 55 - 61 (2001)
- JORES, J., L. RUMER, S. KIESSLING, J. B. KAPER und L. H. WIELER  
A novel locus of enterocyte effacement (LEE) pathogenicity island inserted at *pheV* in bovine Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strain O103:H2  
FEMS Microbiol. Lett. 204, 75 - 79 (2001)
- JORES, J., K. ZEHMKE, J. EICHBERG, L. RUMER und L. H. WIELER  
Description of a novel intimin variant (type  $\zeta$ ) in the bovine O84:NM verotoxin-producing *Escherichia coli* strain 537/89 and the diagnostic value of intimin typing  
Exp. Biol. Med. 228, 370 - 376 (2003)
- JOSE, J., F. JÄHNIG und T. F. MEYER  
Common structural features of IgA1 protease-like outer membrane protein autotransporters  
Mol. Microbiol. 18, 378 - 380 (1995)

- JOTHIKUMAR, N. und M. W. GRIFFITHS  
Rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7 with multiplex real-time PCR assays  
Appl. Environ. Microbiol. 68, 3169 - 3171 (2002)
- JUDGE, N. A., H. S. MASON und A. D. O'BRIEN  
Plant cell-based intimin vaccine given orally to mice primed with intimin reduces time of *Escherichia coli* O157:H7 shedding in feces  
Infect. Immun. 72, 168 - 175 (2004)
- KADDU-MULINDWA, D. H., T. AISU, K. GLEIER, S. ZIMMERMANN und L. BEUTIN  
Occurrence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in fecal samples from children with diarrhea and from healthy zebu cattle in Uganda  
Int. J. Food Microbiol. 66, 95 - 101 (2001)
- KANG, S. J., S. J. RYU, J. S. CHAE, S. K. EO, G. J. WOO und J. H. LEE  
Occurrence and characteristics of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 in calves associated with diarrhoea  
Vet. Microbiol. 98, 323 - 328 (2004)
- KARCH, H., und M. BIELASZEWSKA  
Sorbitol-fermenting Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H<sup>-</sup> strains: Epidemiology, phenotypic and molecular characteristics, and microbiological diagnosis  
J. Clin. Microbiol. 39, 2043 - 2049 (2001)
- KARCH, H. und T. MEYER  
Single primer pair for amplifying segments of distinct Shiga-like-toxin genes by polymerase chain reaction  
J. Clin. Microbiol. 27, 2751 - 2757 (1989)
- KARCH, H., N. STROCKBINE und A. D. O'BRIEN  
Growth of *Escherichia coli* in the presence of trimethoprim-sulfamethoxazole facilitates detection of Shiga-like toxin producing strains by colony blot assay  
FEMS Microbiol. Lett. 35, 141 - 145 (1986)
- KARCH, H., J. HEESEMANN und R. LAUFS  
Phage-associated cytotoxin production by and enteroadhesiveness of enteropathogenic *Escherichia coli* isolated from infants with diarrhea in West Germany  
J. Infect. Dis. 155, 707 - 715 (1987)
- KARCH, H., R. WISS, H. GLONING, P. EMMRICH, S. ALEKSIC und J. BOCKEMÜHL  
Hämolytisch-urämisches Syndrom bei Kleinkindern durch Verotoxin-produzierende *Escherichia coli*  
Dtsch. Med. Wschr. 115, 489 - 495 (1990)
- KARCH, H., T. MEYER, H. RÜSSMANN und J. HEESEMANN  
Frequent loss of Shiga-like toxin genes in clinical isolates of *Escherichia coli* upon subcultivation  
Infect. Immun. 60, 3464 - 3467 (1992)
- KARCH, H., H. BÖHM, H. SCHMIDT, F. GUNZER, S. ALEKSIC und J. HEESEMANN  
Clonal structure and pathogenicity of Shiga-like toxin-producing, sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157:H<sup>-</sup>  
J. Clin. Microbiol. 31, 1200 - 1205 (1993)
- KARCH, H., C. JANETZKI-MITTMANN, S. ALEKSIC und M. DATZ  
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 (1996)

- KARCH, H., H.-I. HUPPERTZ, J. BOCKEMÜHL, H. SCHMIDT, A. SCHWARZKOPF und R. LISSNER  
Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Infections in Germany  
J. Food Prot. 60, 1454 – 1457 (1997)
- KARCH, H., H. SCHMIDT, J. JANETZKI-MITTMANN, J. SCHEEF und M. KRÖGER  
Shiga toxins even when different are encoded in identical positions in related temperate bacteriophages  
Mol. Gen. Genet. 262, 600 - 607 (1999a)
- KARCH, H., S. SCHUBERT, D. ZHANG, W. ZHANG, H. SCHMIDT, R. ÖLSCHLÄGER und J. HACKER  
A genomic island, termed high-pathogenicity island, is present in certain non-O157 Shiga toxin producing *E. coli* clonal lineages  
Infect. Immun. 67, 5994 - 6001 (1999b)
- KARIUKI, S., C. GILKS, J. KIMARI, A. OBANDA, J. MUYODI, P. WAIYAKI und C. A. HART  
Genotype analysis of *Escherichia coli* strains isolated from children and chickens living in close contact  
Appl. Environ. Microbiol. 65, 472 - 476 (1999)
- KARMALI, M. A.  
Prospects for preventing serious systemic toxemic complications of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections using Shiga toxin receptor analogues  
J. Infect. Dis. 189, 355 - 359 (2004)
- KARMALI, M. A., B. T. STEELE, M. PETRIC und C. LIM  
Sporadic cases of haemolytic-uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools  
Lancet i, 619 - 620 (1983)
- KARMALI, M. A., C. A. LINGWOOD und M. PETRIC  
Maintaining the existing phenotype nomenclatures for *E. coli* cytotoxins  
ASM News 62, 167 - 169 (1996)
- KARMALI, M. A., M. MASCARENHAS, S. SHEN, K. ZIEBELL, S. JOHNSON, R. REID-SMITH, J. ISAAC-RENTON, C. CLARK, K. RAHN und J. B. KAPER  
Association of genomic O island 122 of *Escherichia coli* EDL 933 with verocytotoxin-producing *Escherichia coli* seropathotypes that are linked to epidemic and/or serious disease  
J. Clin. Microbiol. 41, 4930 - 4940 (2003)
- KARPMAN, D.  
Platelet interactions with VTEC virulence factors  
5<sup>th</sup> International Symposium on "Shiga Toxin (Verocytotoxin)-Producing *Escherichia coli* Infections", Edinburgh, Schottland, 08.-11.06.2003 (2003)
- KASSENBOG, H. D., C. W. HEDBERG, M. HOEKSTRA, M. C. EVANS, A. E. CHIN, R. MARCUS, D. J. VUGIA, K. SMITH, S. D. AHUJA, L. SLUTSKER, P. M. GRIFFIN und EMERGING INFECTIONS PROGRAM FOODNET WORKING GROUP  
Farm visits and undercooked hamburgers as major risk factors for sporadic *Escherichia coli* O157:H7 infections: data from a case-control study in 5 FoodNet sites  
Clin. Infect. Dis. 38, Suppl. 3, S271 - S278 (2004)
- KAYSER, F., K. A. BIENZ, J. ECKERT und R. M. ZINKERNAGEL  
Medizinische Mikrobiologie  
Thieme, Stuttgart-New York, 10. Auflage, 303 - 304 (2001)

- KEEN, J. E. und R. O. ELDER  
Isolation of Shiga-toxigenic *Escherichia coli* O157 from hide surfaces and the oral cavity of finished beef feedlot cattle  
J. Am. Vet. Med. Assoc. 220, 756 - 763 (2002)
- KEHL, K. S., P. HAVENS, C. E. BEHNKE und D. W. K. ACHESON  
Evaluation of the Premier EHEC assay for detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*  
J. Clin. Microbiol. 35, 2051 - 2054 (1997)
- KENNY, B. und B. B. FINLAY  
Protein secretion by enteropathogenic *Escherichia coli* is essential for transducing signals to epithelial cells  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 7991 - 7995 (1995)
- KENNY, B. und M. JEPSON  
Targeting of an enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) effector protein to host mitochondria  
Cell Microbiol. 2, 579 - 590 (2000)
- KENNY, B., L.-C. LAI, B. B. FINLAY und M. S. DONNENBERG  
EspA, a protein secreted by enteropathogenic *Escherichia coli*, is required to induce signals in epithelial cells  
Mol. Microbiol. 20, 313 - 323 (1996)
- KENNY, B., R. DE VINNEY, M. STEIN, D. H. REINSCHEID, E. A. FREY und B. B. FINLEY  
Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells  
Cell 91, 511 - 520 (1997)
- KENNY, B., S. ELLIS, A. D. LEARD, J. WARAWA, H. MELLOR und M. A. JEPSON  
Co-ordinate regulation of distinct host cell signalling pathways by multifunctional enteropathogenic *Escherichia coli* effector molecules  
Mol. Microbiol. 44, 1095 - 1107 (2002)
- KESKIMÄKI, M., M. SAARI, T. HEISKANEN und A. SIITONEN  
Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Finland from 1990 through 1997: prevalence and characteristics of isolates  
J. Clin. Microbiol. 36, 3641 - 3646 (1998)
- KEUSCH, G. T., M. JACEWICZ, D. A. ACHESON, A. DONOHUE-ROLFE, A. V. KANE und R. H. McCLUER  
Globotriaosylceramide, Gb3, is an alternative functional receptor for Shiga-like toxin 2e  
Infect. Immun. 63, 1138 - 1141 (1995)
- KHAKRHRIA, R., D. DUCK und H. LIOR  
Extended phage-typing scheme for *Escherichia coli* O157:H7  
Epidemiol. Infect. 105, 511 - 520 (1990)
- KILIAN, M. und P. BÜLOW  
Rapid identification of Enterobacteriaceae. II. Use of a beta-glucuronidase detecting agar medium (PGUA agar) for the identification of *E. coli* in primary cultures of urine samples  
Acta Pathol. Microbiol. Scand. [B] 87, 271 - 276 (1979)
- KISTEMANN, T., S. ZIMMER, I. VÅGSHOLM und Y. ANDERSSON  
GIS-supported investigation of human EHEC and cattle VTEC O157 infections in Sweden: Geographical distribution, spatial variation and possible risk factors  
Epidemiol. Infect. 132, 495 - 505 (2004)

- KLAPPROTH, J.-M. A., I. C. A. SCALETSKY, B. P. McNAMARA, L.-C. LAI, C. MALSTROM, S. P. JAMES und M. S. DONNENBERG  
A large toxin from pathogenic *Escherichia coli* strains that inhibits lymphocyte activation  
*Infect. Immun.* 68, 2148 - 2155 (2000)
- KLEIN, G. und M. BÜLTE  
Antibiotic susceptibility pattern of *Escherichia coli* strains with verocytotoxic *E. coli*-associated virulence factors from food and animal faeces  
*Food Microbiol.* 20, 27 – 33 (2003)
- KLIE, H., M. TIMM, H. RICHTER, P. GALLIEN, K.-W. PERLBERG und H. STEINRÜCK  
Nachweis und Vorkommen von Verotoxin- bzw. Shigatoxin-bildenden *Escherichia coli* (VTEC bzw. STEC) in Milch  
*Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* 110, 337 – 341 (1997)
- KOBAYASHI, H., J. SHIMADA, M. NAKAZAWA, T. MOROZUMI, T. POHJANVIRTA, S. PELKONEN und K. YAMAMOTO  
Prevalence and characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from healthy cattle in Japan  
*Appl. Environ. Microbiol.* 67, 484 - 489 (2001)
- KOBAYASHI, H., T. POHJANVIRTA und S. PELKONEN  
Prevalence and characteristics of intimin- and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from gulls, pigeons and broilers in Finland  
*J. Vet. Med. Sci.* 64, 1071 - 1073 (2002)
- KOCH, C., S. HERTWIG, R. LURZ, B. APPEL und L. BEUTIN  
Isolation of a lysogenic bacteriophage carrying the *stx<sub>1</sub>ox<sub>3</sub>* gene, which is closely associated with Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from sheep and humans  
*J. Clin. Microbiol.* 39, 3992 – 3998 (2001)
- KÖHLER, B., H. KARCH und H. SCHMIDT  
Antibacterials that are used as growth promoters in animal husbandry can affect the release of Shiga-toxin-2-converting bacteriophages and Shiga toxin 2 from *Escherichia coli* strains  
*Microbiology* 146, 1085 – 1090 (2000)
- KÖHLER W., H. J. EGGERS, B. FLEISCHER, R. MARRE, H. PFISTER und G. PULVERER  
Medizinische Mikrobiologie  
Urban & Fischer, München-Jena, 8. Auflage, 299 (2001)
- KOKAI-KUN, J. F., A. R. MELTON-CELSA und A. D. O'BRIEN  
Elastase in intestinal mucus enhances the cytotoxicity of Shiga toxin type 2d  
*J. Biol. Chem.* 275, 3713 - 3721 (2000)
- KOLLING, G. L. und K. R. MATTHEWS  
Export of virulence genes and Shiga toxin by membrane vesicles of *Escherichia coli* O157:H7  
*Appl. Environ. Microbiol.* 65, 1843 – 1848 (1999)
- KONOWALCHUK, J., J. I. SPEIRS und S. STAVRIC  
Vero Response to a Cytotoxin of *Escherichia coli*  
*Infect. Immun.* 18, 775 – 779 (1977)
- KRAUSE, U., F. M. THOMSON-CARTER und T. H. PENNINGTON  
Molecular epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 by pulsed-field gel electrophoresis and comparison with that by bacteriophage typing  
*J. Clin. Microbiol.* 34, 959 – 961 (1996)

- KUDVA, I. T., P. G. HATFIELD und C. J. HOVDE  
Effect of diet on the shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in a sheep model  
Appl. Environ. Microbiol. 61, 1363 - 1370 (1995)
- KUDVA, I. T., P. S. EVANS, N. T. PERNA, T. J. BARRETT, G. J. DE CASTRO, F. M. AUSUBEL, F. R. BLATTNER und S. B. CALDERWOOD  
Polymorphic amplified typing sequences provide a novel approach to *Escherichia coli* O157:H7 strain typing  
J. Clin. Microbiol. 40, 1152 - 1159 (2002)
- KUDVA, I. T., R. W. GRIFFIN, M. MURRAY, M. JOHN, N. T. PERNA, T. J. BARRETT und S. B. CALDERWOOD  
Insertions, deletions, and single-nucleotide polymorphisms at rare restriction enzyme sites enhance discriminatory power of polymorphic amplified typing sequences, a novel strain typing system for *Escherichia coli* O157:H7  
J. Clin. Microbiol. 42, 2388 - 2397 (2004)
- KUMAR, H. S., I. KARUNASAGAR, I. KARUNASAGAR, T. TEIZOU, K. SHIMA und S. YAMASAKI  
Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolated from seafood and beef  
FEMS Microbiol. Lett. 233, 173 - 178 (2004)
- LAEGREID, W. W. und J. E. KEEN  
Estimation of the basic reproduction ratio ( $R_0$ ) for Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 (STEC O157) in beef calves  
Epidemiol. Infect. 132, 291 - 295 (2004)
- LAHTI, E., O. RUOHO, L. RANTALA, M.-L. HÄNNINEN und T. HONKANEN-BUZALSKI  
Longitudinal study of *Escherichia coli* O157 in a cattle finishing unit  
Appl. Environ. Microbiol. 69, 554 - 561 (2003)
- LAI, L.-C., L. A. WAINWRIGHT, K. D. STONE und M. S. DONNENBERG  
A third secreted protein that is encoded by the enteropathogenic *Escherichia coli* pathogenicity island is required for transduction of signals and for attaching and effacing activities in host cells  
Infect. Immun. 65, 2211 - 2217 (1997)
- LATHEM, W. W., T. E. GRYS, S. E. WITOWSKI, A. G. TORRES, J. B. KAPER, P. I. TARR und R. A. WELCH  
StcE, a metalloprotease secreted by *Escherichia coli* O157:H7, specifically cleaves C1 esterase inhibitor  
Mol. Microbiol. 45, 277 - 288 (2002)
- LATHEM, W. W., T. BERGSBAKEN und R. A. WELCH  
Potentiation of C1 esterase inhibitor by StcE, a metalloprotease secreted by *Escherichia coli* O157:H7  
J. Exp. Med. 199, 1077 - 1087 (2004)
- LAW, D.  
Virulence factors of *Escherichia coli* O157 and other Shiga toxin-producing *E. coli*  
J. Appl. Microbiol. 88, 729 - 745 (2000)
- LEE, M. H., K. S. CHO, K. W. KAHNG und C. M. KANG  
A case of hemolytic uremic syndrome associated with Epstein-Barr virus infection  
Korean J. Intern. Med. 13, 131 - 135 (1998)

- LEE, R. B., D. C. HASSANE, D. L. COTTLE und C. L. PICKETT  
Interactions of *Campylobacter jejuni* cytolethal distending toxin subunits CdtA and CdtC with HeLa cells  
*Infect. Immun.* 71, 4883 - 4890 (2003)
- LEHMACHER, A., H. MEIER, S. ALEKSIC und J. BOCKEMÜHL  
Detection of hemolysin variants of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* by PCR and culture on vancomycin-cefixime-cefsulodin blood agar  
*Appl. Environ. Microbiol.* 64, 2449 - 2453 (1998)
- LEISTNER, L.  
Hürden-Technologie für die Herstellung stabiler Fleischerzeugnisse  
*Fleischwirtsch.* 66, 10 - 15 (1986)
- LEJEUNE, J. T., T. E. BESSER und D. D. HANCOCK  
Cattle water troughs as reservoirs of *Escherichia coli* O157  
*Appl. Environ. Microbiol.* 67, 3053 - 3057 (2001)
- LEOMIL, L., L. AIDAR-UGRINOVICH, B. E. C. GUTH, K. IRINO, M. P. VETTORATO, D. L. ONUMA und A. F. P. DE CASTRO  
Frequency of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolates among diarrheic and non-diarrheic calves in Brazil  
*Vet. Microbiol.* 97, 103 - 109 (2003)
- LEUNG, P. H. M., J. S. M. PEIRIS, W. W. S. NG, R. M. ROBINS-BROWNE, K. A. BETTELHEIM und W. C. YAM  
A newly discovered verotoxin variant, VT2g, produced by bovine verocytotoxigenic *Escherichia coli*  
*Appl. Environ. Microbiol.* 69, 7549 - 7553 (2003)
- LEUSCHNER, R. G. und M. P. BOUGHTFLOWER  
Laboratory-scale preparation of soft cheese artificially contaminated with low levels of *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica* serovars Typhimurium, Enteritidis, and Dublin  
*J. Food Prot.* 65, 508 - 514 (2002)
- LEVINE, M. M.  
*Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent  
*J. Infect. Dis.* 155, 377 - 389 (1987)
- LEVINE, M. M., J. G. XU, J. B. KAPER, H. LIOR, V. PRADO, B. TALL, J. NATARO, H. KARCH und K. WACHSMUTH  
A DNA probe to identify enterohemorrhagic *Escherichia coli* of O157:H7 and other serotypes that cause hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome  
*J. Infect. Dis.* 156, 175 - 182 (1987)
- LIEBANA, E., R. P. SMITH, E. LINDSAY, I. McLAREN, C. CASSAR, F. A. CLIFTON-HADLEY und G. A. PAIBA  
Genetic diversity among *Escherichia coli* O157:H7 isolates from bovines living on farms in England and Wales  
*J. Clin. Microbiol.* 41, 3857 - 3860 (2003)
- LIESEGANG, A., U. SACHSE, R. PRAGER, H. CLAUS, H. STEINRÜCK, S. ALEKSIC, W. RABSCH, W. VOIGT, A. FRUTH, H. KARCH, J. BOCKEMÜHL und H. TSCHÄPE  
Clonal diversity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 in Germany - a ten-year study  
*Inf. J. Med. Microbiol.* 290, 269 - 278 (2000)

- LIN, J., M. P. SMITH, K. C. CHAPIN, H. S. BAIK, G. N. BENNETT und J. W. FOSTER  
Mechanisms of acid resistance in enterohemorrhagic *Escherichia coli*  
Appl. Environ. Microbiol. 62, 3094 - 3100 (1996)
- LGL (Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit)  
LGL Jahresbericht 2003  
<http://www.lgl.bayern.de/>, S. 172 (2004)
- LINDGREN, S. W., A. R. MELTON-CELSA und A. D. O'BRIEN  
Virulence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O91:H21 clinical isolates in an orally  
infected mouse model  
Infect. Immun. 61, 3832 - 3842 (1993)
- LINDSTEDT, B.-A., E. HEIR, E. GJERNES, T. VARDUND und G. KAPPERUD  
DNA fingerprinting of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* O157 based on multiple-locus  
variable-number tandem-repeats analysis (MLVA)  
Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob. 2, 12 (2003)
- LINDSTEDT, B.-A., T. VARDUND und G. KAPPERUD  
Multiple-locus variable-number tandem-repeats analysis of *Escherichia coli* O157 using  
PCR multiplexing and multi-colored capillary electrophoresis  
J. Microbiol. Methods 58, 213 - 222 (2004)
- LINGWOOD, C. A.  
Verotoxin-binding in human renal sections  
Nephron 66, 21 - 28 (1994)
- LINGWOOD, C. A., H. LAW, S. RICHARDSON, M. PETRIC, J. L. BRUNTON, S. DE  
GRANDIS und M. KARMALI  
Glycolipid binding of purified and recombinant *Escherichia coli* produced verotoxin *in vitro*  
J. Biol. Chem. 262, 8834 - 8839 (1987)
- LOCKING, M., L. ALLISON, L. RAE und M. HANSON  
VTEC in Scotland 2002: enhanced surveillance and reference laboratory data  
SCIEH Weekly Report 37, 304 - 307 (2003)
- LÜCKE, F.-K. und C. TEN BOSCH  
Möglichkeiten und Grenzen für den Einsatz der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zum  
Nachweis und zur Typisierung lebensmittelhygienisch relevanter Bakterien  
Dtsch. Lebensmittel-Rundsch. 94, 182 - 187 (1998)
- LUDWIG, K., V. SARKIM, M. BITZAN, M. A. KARMALI, C. BOBROWSKI, H. RUDER, R.  
LAUFS, I. SOBOTTKA, M. PETRIC, H. KARCH und D. E. MÜLLER-WIEFEL  
Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection and antibodies against Stx2 and Stx1 in  
household contacts of children with enteropathic hemolytic-uremic syndrome  
J. Clin. Microbiol. 40, 1773 - 1782 (2002)
- LUEDTKE, A. N. und D. A. POWELL  
A review of North American apple cider-associated *E coli* O157:H7 outbreaks, media  
coverage and a comparative analysis of Ontario apple cider producers' information sources  
and production practices  
Dairy Food Environ. Sanit. 22, 590 - 598 (2002)
- LUKÁŠOVÁ, J., B. ABRAHAM und Š. CUPÁKOVÁ  
Occurrence of *Escherichia coli* O157 in raw material and food in Czeck Republic  
J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health 51, 77 - 81 (2004)

- LUNG, A. J., C.-M. LIN, J. M. KIM, M. R. MARSHALL, R. NORDSTEDT, N. P. THOMPSON und C. I. WEI  
Destruction of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Enteritidis in cow manure composting  
J. Food Prot. 64, 1309 - 1314 (2001)
- LUO, Y., E. A. FREY, R. A. PFUETZNER, A. L. CREAGH, D. G. KNOECHEL, C. A. HAYNES, B. B. FINLAY und N. C. J. STRYNADKA  
Crystal structure of enteropathogenic *Escherichia coli* intimin-receptor complex  
Nature 405, 1073 - 1077 (2000)
- MACKENZIE, E. F. W., W. E. TAYLOR und W. E. GILBERT  
Recent experiments in the rapid identification of *Bacterium coli* type I  
J. Gen. Microbiol. 2, 197 - 204 (1948)
- MACKENZIE, A. M. R., P. LEBEL, E. ORRBINE, P. C. ROWE, L. HYDE, F. CHAN, W. JOHNSON, P. N. McLAINE und THE SYNSORB PK STUDY INVESTIGATORS  
Sensitivities and specificities of Premier *E. coli* O157 and Premier EHEC enzyme immunoassays for diagnosis of infection with verotoxin (Shiga-like toxin)-producing *Escherichia coli*  
J. Clin. Microbiol. 36, 1608 - 1611 (1998)
- MAGNUSON, B. A., M. DAVIS, S. HUBELE, P. R. AUSTIN, I. T. KUDVA, C. J. WILLIAMS, C. W. HUNT und C. J. HOVDE  
Ruminant gastrointestinal cell proliferation and clearance of *Escherichia coli* O157:H7  
Infect. Immun. 68, 3808 - 3814 (2000)
- MAKINO, K., K. YOKOYAMA, Y. KUBOTA, C. H. YUTSUDO, S. KIMURA, K. KUROKAWA, K. ISHII, M. HATTORI, I. TATSUNO, H. ABE, T. IIDA, K. YAMAMOTO, M. ONISHI, T. HAYASHI, T. YASUNGA, T. HONDA, C. SASAKAWA und H. SHINAGAWA  
Complete nucleotide sequence of the prophage VT2-Sakai carrying the verotoxin 2 genes of the enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 derived from the Sakai outbreak  
Genes Genet. Syst. 74, 227 - 239 (1999)
- MAKINO, S.-I., T. TOBE, H. ASAKURA, M. WATARAI, T. IKEDA, K. TAKESHI und C. SASAKAWA  
Distribution of the secondary type III secretion system locus found in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 isolates among Shiga toxin-producing *E. coli* strains  
J. Clin. Microbiol. 41, 2341 - 2347 (2003)
- MANAFI, M. und B. KREMSMAIER  
Comparative evaluation of different chromogenic/ fluorogenic media for detecting *Escherichia coli* O157:H7 in food  
Int. J. Food Microbiol. 71, 257 - 262 (2001)
- MARCH, S. B. und S. RATNAM  
Sorbitol-MacConkey medium for detection of *Escherichia coli* O157:H7 associated with hemorrhagic colitis  
J. Clin. Microbiol. 23, 869 - 872 (1986)
- MARCHÈS, O., T. N. LEDGER, M. BOURY, M. OHARA, X. TU, F. GOFFAUX, J. MAINIL, I. ROSENSHINE, M. SUGAI, J. DE RYCKE und E. OSWALD  
Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* deliver a novel effector called Cif, which blocks cell cycle G<sub>2</sub>/M transition  
Mol. Microbiol. 50, 1553 - 1567 (2003)

- MARQUES, L. R., M. A. MOORE, J. G. WELLS, I. K. WACHSMUTH und A. D. O'BRIEN  
Production of Shiga-like toxin by *Escherichia coli*  
J. Infect. Dis. 154, 338 - 341 (1986)
- MARQUES, L. R. M., C. M. ABE, P. M. GRIFFIN und T. A. T. GOMES  
Association between alpha-hemolysin production and HeLa cell-detaching activity in fecal isolates of *Escherichia coli*  
J. Clin. Microbiol. 33, 2707 - 2709 (1995)
- MARQUES, L. R. M., A. T. TAVECHIO, C. M. ABE und T. A. T. GOMES  
Search for cytolethal distending toxin production among fecal *Escherichia coli* isolates from Brazilian children with diarrhea and without diarrhea  
J. Clin. Microbiol. 41, 2206 - 2208 (2003)
- MARTIN, I. E., S. D. TYLER, K. D. TYLER, R. KHAKHRIA und W. M. JOHNSON  
Evaluation of ribotyping as epidemiologic tool for typing *Escherichia coli* serogroup O157 isolates  
J. Clin. Microbiol. 34, 720 - 723 (1996)
- McCONNACHIE, A. A. und W. T. A. TODD  
Potential therapeutic agents for the prevention and treatment of haemolytic uraemic syndrome in Shiga toxin producing *Escherichia coli* infection  
Curr. Opin. Infect. Dis. 17, 479 - 482 (2004)
- McDANIEL, T. K., K. G. JARVIS, M. S. DONNENBERG und J. B. KAPER  
A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 1664 - 1668 (1995)
- McDONALD, D. M., M. FYFE, A. PACCAGNELLA, A. TRINIDAD, K. LOUIE und D. PATRICK  
*Escherichia coli* O157:H7 outbreak linked to salami, British Columbia, Canada, 1999  
Epidemiol. Infect. 132, 283 - 289 (2004)
- McDONOUGH, M. A. und J. R. BUTTERTON  
Spontaneous tandem amplification and deletion of the Shiga toxin operon in *Shigella dysenteriae* 1  
Mol. Microbiol. 34, 1058 - 1069 (1999)
- McINGVALE, S. C., D. ELHANAFI und M. A. DRAKE  
Optimization of reverse transcriptase PCR to detect viable Shiga-toxin-producing *Escherichia coli*  
Appl. Environ. Microbiol. 68, 799 - 806 (2002)
- McNALLY, A., A. J. ROE, S. SIMPSON, F. M. THOMSON-CARTER, D. E. E. HOEY, C. CURRIE, T. CHAKRABORTY, D. G. E. SMITH und D. L. GALLY  
Differences in levels of secreted locus of enterocyte effacement proteins between human disease-associated and bovine *Escherichia coli* O157  
Infect. Immun. 69, 5107 - 5114 (2001)
- McNAMARA, B. P. und M. S. DONNENBERG  
A novel proline-rich protein, EspF, is secreted from enteropathogenic *Escherichia coli* via the type III export pathway  
FEMS Microbiol. Lett. 166, 71 - 78 (1998)
- McNAMARA, B. P., A. KOUTSOURIS, C. B. O'CONNELL, J. P. NOUGAYREDE, M. S. DONNENBERG und G. HECHT  
Translocated EspF protein from enteropathogenic *Escherichia coli* disrupts host intestinal barrier function  
J. Clin. Invest. 107, 621 - 629 (2001)

- McSWEENEY, C. S., R. A. GILBERT, D. O. KRAUSE, J. PADMANABHA und S. E. DENMAN  
Effect of diet on *E. coli* populations in the faeces of cattle  
Asia Pac. J. Clin. Nutr. 13, S27 (2004)
- MECSAS, J. und E. J. STRAUSS  
Molecular mechanisms of bacterial virulence: type III secretion and pathogenicity islands  
Emerg. Infect. Dis. 2, 271 - 288 (1996)
- MELLMANN, A., M. BIELASZEWSKA, J. BORELL, O. BÖHLER und H. KARCH  
Prävalenz und Strukturanalyse von Shiga Toxin 1- und 2-Varianten bei enterohämorrhagischen *Escherichia coli*  
EHEC-Workshop 2004, Wildbad Kreuth, 22.-24. Juli 2004 (2004)
- MELTON-CELSA, A. R. und A. D. O'BRIEN  
Structure, biology, and relative toxicity of Shiga toxin family members for cells and animals  
in: Kaper, J. B. und A. D. O'Brien (Hrsg.), *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* strains, American Society for Microbiology, Washington, D. C., 121 - 125 (1998)
- MELTON-CELSA, A. R., S. C. DARNELL und A. D. O'BRIEN  
Activation of Shiga-like toxins by mouse and human intestinal mucus correlates with virulence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O91:H21 isolates on orally infected, streptomycin-treated mice  
Infect. Immun. 64, 1569 - 1576 (1996)
- MELTON-CELSA, A. R., J. E. ROGERS, C. K. SCHMITT, S. C. DARNELL und A. D. O'BRIEN  
Virulence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in orally-infected mice correlates with the toxin produced by the infecting strain  
Jpn. J. Med. Sci. Biol. 51 (Suppl.), S108 - S114 (1998)
- MELTON-CELSA, A. R., J. F. KOKAI-KUN und A. D. O'BRIEN  
Activation of Shiga toxin type 2d (Stx2d) by elastase involves cleavage of the C-terminal two amino acids of the A<sub>2</sub> peptide in the context of the appropriate B pentamer  
Mol. Microbiol. 43, 207 - 215 (2002)
- MENARD, L. P., J. G. LUSSIER, F. LEPINE, C. PAIVA DE SOUSA und J. D. DUBREUIL  
Expression, purification, and biochemical characterization of enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1  
Protein Expr. Purif. 33, 223 - 231 (2004)
- MENG, J., S. ZHAO und M. P. DOYLE  
Virulence genes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from food, animals and humans  
Int. J. Food Microbiol. 45, 229 - 235 (1998)
- MENGE, C., I. STAMM, M. BLESSENHOHL, L. H. WIELER und G. BALJER  
Verotoxin 1 from *Escherichia coli* affects Gb<sub>3</sub>/CD77<sup>+</sup> bovine lymphocytes independent of interleukin-2, tumor necrosis factor- $\alpha$ , and interferon- $\alpha$   
Exp. Biol. Med. 228, 377 - 386 (2003)
- MEYER, T., H. KARCH, J. HACKER, H. BOCKLAGE und J. HESEMANN  
Cloning and sequencing of an Shiga-like toxin II-related gene from *Escherichia coli* O157:H7 strain 7279  
Zbl. Bakt. 276, 176 - 188 (1992)

- MILCH, H., H. PÁSZIT, I. GADÓ, K. GLATZ und M. JAKAB  
Comparison of traditional and molecular typing methods of *Escherichia coli* O157  
*Acta Microbiol. Immunol. Hung.* 50, 349 - 367 (2003)
- MIRANDA, A. G., K. V. SINGH und B. E. MURRAY  
DNA-fingerprinting of *Enterococcus faecium* by pulsed-field gel electrophoresis may be a useful epidemiologic tool  
*J. Clin. Microbiol.* 29, 2752 - 2757 (1991)
- MØLLER NIELSEN, E. und F. SCHEUTZ  
Characterisation of *Escherichia coli* O157 isolates from Danish cattle and human patients by genotyping and presence and variants of virulence genes  
*Vet. Microbiol.* 88, 259 - 273 (2002)
- MØLLER NIELSEN, E., C. TEGTMEIER, H. J. ANDERSEN, C. GRØNBÆK und J. S. ANDERSEN  
Influence of age, sex and herd characteristics on the occurrence of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in Danish dairy farms  
*Vet. Microbiol.* 88, 245 - 257 (2002)
- MONDAY, S. R., S. A. MINNICH und P. C. H. FENG  
A 12-base-pair deletion in the flagellar master control gene *flhC* causes nonmotility of the pathogenic German sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157:H<sup>-</sup>-strains  
*J. Bacteriol.* 186, 2319 - 2327 (2004)
- MOON, H. W., S. C. WHIPP, R. A. ARGENZIO, M. M. LEVINE und R. A. GIANNELLA  
Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbit intestines  
*Infect. Immun.* 41, 1340 - 1351 (1983)
- MORABITO, S., H. KARCH, P. MARIANI-KURKDJIAN, H. SCHMIDT, F. MINELLI, E. BINGEN und A. CAPRIOLI  
Enteraggregative, Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O111:H2 associated with an outbreak of hemolytic-uremic syndrome  
*J. Clin. Microbiol.* 36, 840 - 842 (1998)
- MORABITO, S., G. DELL'OMO, U. AGRIMI, H. SCHMIDT, H. KARCH, T. CHEASTY und A. CAPRIOLI  
Detection and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in feral pigeons  
*Vet. Microbiol.* 82, 275 - 283 (2001)
- MORABITO, S., R. TOZZOLI, E. OSWALD und A. CAPRIOLI  
A mosaic pathogenicity island made up of the locus of enterocyte effacement and a pathogenicity island of *Escherichia coli* O157:H7 is frequently present in attaching and effacing *E. coli*  
*Infect. Immun.* 71, 3343 - 3348 (2003)
- MORGAN, G. M., C. NEWMAN, S. R. PALMER, J. B. ALLEN, W. SHEPHERD, A. M. RAMPLING, R. E. WARREN, R. J. GROSS, S. M. SCOTLAND und H. R. SMITH  
First recognized community outbreak of haemorrhagic colitis due to verotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 in the UK  
*Epidemiol. Infect.* 101, 83 - 91 (1988)
- MORLOCK, G., A. HEISSENHUBER, C. SIGL, R. KUGLER, P. SCHINDLER, U. BUSCH, A. AMMON und M. WILDNER  
Nachweis von Shigatoxin bildenden *E. coli* (STEC) in Trink-, Oberflächengewässer- und Klärwasserproben in Südbayern  
EHEC-Workshop 2004, Wildbad Kreuth, 22.-24. Juli 2004 (2004)

- MORRIS, J. G. und M. POTTER  
Emergence of new pathogens as a function of changes in host susceptibility  
Emerg. Infect. Dis. 3, 435 - 441 (1997)
- MOSCHCOWITZ, E.  
Acute febrile pleiochromic anemia with hyaline thrombosis of a terminal arterioles and capillaries: an undescribed disease  
Arch. Intern. Med. 36, 89 - 93 (1925)
- MÜLLER, A. und M. BÜLTE  
Wachstumsverhalten von verotoxinogenen/enterohämorrhagischen *Escherichia coli*- (VTEC-/ EHEC-) Stämmen in verschiedenen Anreicherungen mit und ohne Antibiotikazusatz  
Proc. 38. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG), Eigenverlag der DVG, Gießen, 515 - 519 (1997)
- MÜLLER, A., M. BÜLTE und H. MACK  
Überlebenskinetik und Virulenzfaktoren von verotoxinogenen bzw. enterohämorrhagischen *Escherichia coli*- (VTEC-/EHEC-) Stämmen in Rohwurst  
Proc. 39. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG), Eigenverlag der DVG, Gießen, 495 - 499 (1998)
- MUNIESA, M., J. RECKTENWALD, M. BIELASZEWSKA, H. KARCH und H. SCHMIDT  
Characterization of a Shiga Toxin 2e-Converting Bacteriophage from an *Escherichia coli* Strain of Human Origin  
Infect. Immun. 68, 4850 - 4855 (2000)
- MURINDA, S. E., L. T. NGUYEN, S. J. IVEY, B. E. GILLESPIE, R. A. ALMEIDA, F. A. DRAUGHON und S. P. OLIVER  
Prevalence and molecular characterization of *Escherichia coli* O157:H7 in bulk tank milk and fecal samples from cull cows: a 12-month survey of dairy farms in east Tennessee  
J. Food Prot. 65, 752 - 759 (2002)
- NAGANO, H., T. OKUI, O. FUJIWARA, Y. UCHIYAMA, N. TAMATE, H. KUMADA, Y. MORIMOTO und S. YANO  
Clonal structure of Shiga toxin (Stx)-producing and beta-D-glucuronidase-positive *Escherichia coli* O157:H7 strains isolated from outbreaks and sporadic cases in Hokkaido, Japan  
J. Med. Microbiol. 51, 405 - 416 (2002)
- NAKAGAWA, H., Y. HARA-KUDO, T. KOJIMA, M. IKEDO, H. KODAKA, H. KONUMA und S. KUMAGAI  
Detection of freeze-injured *Escherichia coli* O157:H7 cells from foods by resuscitation prior to selective enrichment  
Int. J. Food Microbiol. 60, 107 - 110 (2000)
- NASPHV (National Association of State Public Health Veterinarians)  
Compendium of measures to prevent disease and injury associated with animals in public settings, 2004 (Stand: 18. Juni 2004)  
[www.health.state.ny.us/nysdoh/zoonoses/comp\\_animals\\_public\\_settings.pdf](http://www.health.state.ny.us/nysdoh/zoonoses/comp_animals_public_settings.pdf) (2004)
- NATARO, J. P. und J. B. KAPER  
Diarrheagenic *Escherichia coli*  
Clin. Microbiol. Rev. 11, 142 - 201 (1998)
- NATARO, J. P., J. B. KAPER, R. ROBINS-BROWNE, V. PRADO, P. VIAL und M. M. LEVINE  
Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells  
Pediatr. Infect. Dis. J. 6, 829 - 831 (1987)

- NATARO, J. P., T. STEINER und G. GUERRANT  
Enteroaggregative *Escherichia coli*  
Emerg. Infect. Dis. 4, 251 - 261 (1998)
- NAYLOR, S. W., J. C. LOW, T. E. BESSER, A. MAHAJAN, G. J. GUNN, M. C. PEARCE, I. J. MCKENDRICK, D. G. E. SMITH und D. L. GALLY  
Lymphoid follicle-dense mucosa at the terminal rectum is the principal site of colonization of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in the bovine host  
Infect. Immun. 71, 1505 - 1512 (2003)
- NEVES, B. C., R. MUNDY, L. PETROVSKA, G. DOUGAN, S. KNUTTON und G. FRANKEL  
CesD2 of enteropathogenic *Escherichia coli* is a second chaperone for the type III secretion translocator protein EspD  
Infect. Immun. 71, 2130 - 2141 (2003)
- NICHOLLS, L., T. H. GRANT und R. M. ROBINS-BROWNE  
Identification of a novel genetic locus that is required for *in vitro* adhesion of a clinical isolate of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* to epithelial cells  
Mol. Microbiol. 35, 275 - 288 (2000)
- NISHIKAWA, K., K. MATSUOKA, E. KITA, N. OKABE, M. MIZUGUCHI, K. HINO, S. MIYAZAWA, C. YAMASAKI, J. AOKI, S. TAKASHIMA, Y. YAMAKAWA, M. NISHIJIMA, D. TERUNUMA, H. KUZUHARA und Y. NATORI  
A therapeutic agent with oriented carbohydrates for treatment of infections by Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99, 7669 - 7674 (2002)
- NOLLER, A. C., M. C. McELLISTREM, A. G. F. PACHECO, D. J. BOXRUD und L. H. HARRISON  
Multilocus variable-number tandem repeat analysis distinguishes outbreak and sporadic *Escherichia coli* O157:H7 isolates  
J. Clin. Microbiol. 41, 5389 - 5397 (2003a)
- NOLLER, A. C., M. C. McELLISTREM, O. C. STINE, J. G. MORRIS, JR., D. J. BOXRUD, B. DIXON und L. H. HARRISON  
Multilocus sequence typing reveals a lack of diversity among *Escherichia coli* O157:H7 isolates that are distinct by pulsed-field gel electrophoresis  
J. Clin. Microbiol. 41, 675 - 679 (2003b)
- NOUGAYRÈDE, J.-P. und M. S. DONNENBERG  
Enteropathogenic *Escherichia coli* EspF is targeted to mitochondria and is required to initiate the mitochondrial death pathway  
Cell. Microbiol. 6, 1097 - 1111 (2004)
- O'BRIEN, A. D. und R. K. HOLMES  
Shiga and Shiga-like Toxins  
Microbiol. Rev. 51, 206 - 220 (1987)
- O'BRIEN, A. D. und G. D. LA VECK  
Purification and characterization of a *Shigella dysenteriae* 1-like toxin produced by *Escherichia coli*  
Infect. Immun. 40, 675 - 683 (1983)
- O'BRIEN, A. D., M. R. THOMPSON, J. R. CANTEY und S. B. FORMAL  
Production of a *Shigella dysenteriae*-like toxin by pathogenic *Escherichia coli*  
Abstr. Annu. Meet. Am. Soc. Microbiol. B-103, p. 32 (1977)

- O'BRIEN, A. D., G. D. LA VECK, M. R. THOMPSON und S. B. FORMAL  
Production of *Shigella dysenteriae* type 1-like cytotoxin by *Escherichia coli*  
J. Infect. Dis. 146, 763 - 769 (1982)
- O'BRIEN, A. D., T. A. LIVELY, M. E. CHEN, S. W. ROTHMAN und S. B. FORMAL  
*Escherichia coli* O157:H7 strains associated with haemorrhagic colitis in the United States  
produce a *Shigella dysenteriae* 1 (Shiga) like cytotoxin  
Lancet i, 702 (1983)
- O'BRIEN, A. D., M. A. KARMALI und S. M. SCOTLAND  
A proposal for rationalizing the nomenclature of the *Escherichia coli* cytotoxins  
2<sup>nd</sup> International Symposium and Workshop on "Verocytotoxin (Shiga-like toxin)-producing  
*Escherichia coli* infections"  
Bergamo, Italien, 27.-30.06.1994 (1994)
- O'BRIEN, S. J., K. G. ADAK und C. GILHAM  
Contact with farming environment as a major risk factor for Shiga toxin (vero cytotoxin)-  
producing *Escherichia coli* O157 infections in humans  
Emerg. Infect. Dis. 7, 1049 - 1051 (2001)
- O'LOUGHLIN, E. V. und R. M. ROBINS-BROWNE  
Effect of Shiga toxin and Shiga-like toxins on eukaryotic cells  
Microbes Infect. 3, 493 - 507 (2001)
- OBRIG, T. G., C. B. LOUISE, C. A. LINGWOOD, B. BOYD, L. BARLEY-MALONEY und T. O.  
DANIEL  
Endothelial heterogeneity in Shiga toxin receptors and responses  
J. Biol. Chem. 268, 15484 - 15488 (1993)
- OGDEN, I. D., N. F. HEPBURN und M. McRAE  
The optimization of isolation media used in immunomagnetic separation methods for the  
detection of *Escherichia coli* O157 in foods  
J. Appl. Microbiol. 91, 373 - 379 (2001)
- OGDEN, I. D., M. McRAE und N. J. C. STRACHAN  
Is the prevalence and shedding concentration of *E. coli* O157 in beef cattle in Scotland  
seasonal?  
FEMS Microbiol. Lett. 233, 297 - 300 (2004)
- OHMURA-HOSHINO, M., S.-T. HO, H. KURAZONO, K. IGARASHI, S. YAMASAKI und Y.  
TAKEDA  
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 (2003)
- OKEKE, I. N., O. OJO, A. LAMIKANRA und J. B. KAPER  
Etiology of acute diarrhea in adults in southwestern Nigeria  
J. Clin. Microbiol. 41, 4525 - 4530 (2003)
- OKREND, A. J. G., B. E. ROSE und B. BENNETT  
A screening method for the isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from ground beef  
J. Food Prot. 53, 249 - 252 (1990)
- OLSEN, J. E., S. AABO, W. HILL, S. NOTERMANS, K. WERNARS, P. E. GRANUM, T.  
POPOVIC, H. N. RASMUSSEN und Ø. OLSVIK  
Probes and polymerase chain reaction for detection of food-borne bacterial pathogens  
Int. J. Food Microbiol. 28, 1 - 78 (1995)

- ORDEN, J. A., J. A. RUIZ-SANTA-QUITERIA, D. CID, S. GARCÍA, R. SANZ und R. DE LA FUENTE  
Verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) and *eae*-positive non-VTEC in 1-30-days-old diarrhoeic dairy calves  
*Vet. Microbiol.* 63, 239 - 248 (1998)
- ORDEN, J. A., D. CID, J. A. RUIZ-SANTA-QUITERIA, S. GARCÍA, S. MARTÍNEZ und R. DE LA FUENTE  
Verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC), enteropathogenic *E. coli* (EPEC) and necrotoxicogenic *E. coli* (NTEC) isolated from healthy cattle in Spain  
*J. Appl. Microbiol.* 93, 29 - 35 (2002)
- ØRSKOV, F. und I. ØRSKOV  
Serotyping of *Escherichia coli*  
in: Bergan, T. (Hrsg.): *Methods in Microbiol.* 15, Academic Press, London, 43 - 112 (1984)
- ORTH, D., K. GRIF, M. P. DIERICH und R. WÜRZNER  
Erstbeschreibung einer dokumentierten Übertragung eines Sorbitol-fermentierenden, enterohämorrhagischen *E. coli* (EHEC) O157 durch Tierkontakt in Österreich  
EHEC-Workshop 2004, Wildbad Kreuth, 22.-24. Juli 2004 (2004)
- OSCARSSON, J., M. WESTERMARK, L. BEUTIN und B. E. UHLIN  
The bacteriophage-associated *ehly1* and *ehly2* determinants from *Escherichia coli* O26:H7 strains do not encode enterohemolysins per se but cause release of the ClyA cytolysin  
*Int. J. Med. Microbiol.* 291, 625 - 631 (2002)
- OSEK, J.  
Phenotypic and genotypic characterization of *Escherichia coli* O157 strains isolated from humans, cattle and pigs  
*Vet. Med. Czech.* 49, 317 - 326 (2004)
- OSTROFF, S. M., P. I. TARR, M. A. NEILL, J. H. LEWIS, N. HARGRETT-BEAN und J. M. KOBAYASHI  
Toxin genotypes and plasmid profiles as determinants of systemic sequelae in *Escherichia coli* O157:H7 infections  
*J. Infect. Dis.* 160, 994 - 998 (1989)
- OSWALD, E., H. SCHMIDT, S. MORABITO, H. KARCH, O. MARCHÈS und A. CAPRIOLI  
Typing of intimin genes in human and animal enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*: Characterization of a new intimin variant  
*Infect. Immun.* 68, 64 - 71 (2000)
- PABST, W. L., M. ALTWEGG, C. KIND, S. MIRJANIC, D. HARDEGGER und D. NADAL  
Prevalence of enteroaggregative *Escherichia coli* among children with and without diarrhea in Switzerland  
*J. Clin. Microbiol.* 41, 2289 - 2293 (2003)
- PADHYE, N. V. und M. P. DOYLE  
Rapid procedure for detecting enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in food  
*Appl. Environ. Microbiol.* 57, 2693 - 2698 (1991)
- PADOLA, N. L., M. E. SANZ, J. E. BLANCO, M. BLANCO, J. BLANCO, A. I. ETCHEVERRIA, G. H. ARROYO, M. A. USERA und A. E. PARMA  
Serotypes and virulence genes of bovine Shigatoxicogenic *Escherichia coli* (STEC) isolated from a feedlot in Argentina  
*Vet. Microbiol.* 100, 3 - 9 (2004)

- PAIVA DE SOUSA, C. und J. D. DUBREUIL  
Distribution and expression of the *astA* gene (EAST1 toxin) in *Escherichia coli* and *Salmonella*  
Int. J. Med. Microbiol. 291, 15 - 20 (2001)
- PARK, C. H., H. J. KIM, D. L. HIXON und A. BUBERT  
Evaluation of the Duopath Verotoxin test for detection of Shiga toxins in cultures of human stools  
J. Clin. Microbiol. 41, 2650 - 2653 (2003)
- PAROS, M., P. I. TARR, H. KIM, T. E. BESSER und D. D. HANCOCK  
A comparison of human and bovine *Escherichia coli* O157:H7 isolates by toxin genotype, plasmid profile, and bacteriophage lambda-restriction fragment length polymorphism profile  
J. Infect. Dis. 168, 1300 - 1303 (1993)
- PARREIRA, V. R. und C. L. GYLES  
Shiga toxin genes in avian *Escherichia coli*  
Vet. Microbiol. 87, 341 - 352 (2002)
- PARRY, S. M., R. L. SALMON, G. A. WILLSHAW und T. CHEASTY  
Risk factors for and prevention of sporadic infections with vero cytotoxin (Shiga toxin) producing *Escherichia coli* O157  
Lancet 351, 1019 - 1022 (1998)
- PATON, A. W. und J. C. PATON  
*Enterobacter cloacae* producing a Shiga-like toxin II-related cytotoxin associated with a case of hemolytic-uremic syndrome  
J. Clin. Microbiol. 34, 463 - 465 (1996)
- PATON, J. C. und A. W. PATON  
Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections  
Clin. Microbiol. Rev. 11, 450 - 479 (1998)
- PATON, A. W., J. C. PATON, M. W. HEUZENROEDER, P. N. GOLDWATER und P. A. MANNING  
Cloning and nucleotide sequence of a variant Shiga-like toxin II gene from *Escherichia coli* OX3:H21 isolated from a case of sudden infant death syndrome  
Microb. Pathog. 13, 225 - 236 (1992)
- PATON, A. W., J. C. PATON und P. A. MANNING  
Polymerase chain reaction amplification, cloning and sequencing of variant *Escherichia coli* Shiga-like toxin type II operons  
Microb. Pathog. 15, 77 - 82 (1993)
- PATON, A. W., L. BEUTIN und J. C. PATON  
Heterogeneity of the amino-acid sequences of *Escherichia coli* Shiga-like toxin type-I operons  
Gene 153, 71 - 74 (1995)
- PATON, A. W., R. M. RATCLIFF, R. M. DOYLE, J. SEYMOUR-MURRAY, D. DAVOS, J. A. LANSER und J. C. PATON  
Molecular microbiological investigation of an outbreak of hemolytic-uremic syndrome caused by dry fermented sausage contaminated with Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli*  
J. Clin. Microbiol. 34, 1622 - 1627 (1996)

- PATON, A. W., E. VOSS, P. A. MANNING und J. C. PATON  
Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from cases of human disease show enhanced adherence to intestinal epithelial (Henle 407) cells  
Infect. Immun. 65, 3799 - 3805 (1997)
- PATON, A. W., R. MORONA und J. C. PATON  
A new biological agent for treatment of Shiga toxigenic *Escherichia coli* infections and dysentery in humans  
Nat. Med. 6, 265 - 270 (2000)
- PATON, A. W., P. SRIMANOTE, M. C. WOODROW und J. C. PATON  
Characterization of Saa, a novel autoagglutinating adhesin produced by locus of enterocyte effacement-negative Shiga-toxigenic *Escherichia coli* strains that are virulent for humans  
Infect. Immun. 69, 6999 - 7009 (2001)
- PATON, A. W., P. SRIMANOTE, U. M. TALBOT, H. WANG und J. C. PATON  
A new family of potent AB(5) cytotoxins produced by Shiga toxigenic *Escherichia coli*  
J. Exp. Med. 200, 35 - 46 (2004)
- PAYNE, C. J. I., M. PETROVIC, R. J. ROBERTS, A. PAUL, E. LINNANE, M. WALKER, D. KIRBY, A. BURGESS, R. M. M. SMITH, T. CHEASTY, G. WILSHAW und R. SALMON  
Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 gastroenteritis in farm visitors, North Wales  
Emerg. Infect. Dis. 9, 526 - 530 (2003)
- PEITZ, R., H. WEBER, K. GLEIER, S. ZIMMERMANN und L. BEUTIN  
Nachweis von enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC) in Fleischproben und Rohwürsten  
Fleischwirtsch. 80, 71 - 74 (2000)
- PÉRÈS, S. Y., O. MARCHÈS, F. DAIGLE, J.-P. NOUGAYRÈDE, F. HÉRAULT, C. TASCA, J. DE RYCKE und E. OSWALD  
A new cytolethal distending toxin (CDT) from *Escherichia coli* producing CNF2 blocks HeLa cell division in G2/M phase  
Mol. Microbiol. 24, 1095 - 1107 (1997)
- PERNA, N. T., G. F. MAYHEW, G. PÓSFAL, S. ELLIOTT, M. S. DONNENBERG, J. B. KAPER und F. R. BLATTNER  
Molecular evolution of a pathogenicity island from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7  
Infect. Immun. 66, 3810 - 3817 (1998)
- PHILLIPS, A. D. und G. FRANKEL  
Intimin-mediated tissue specificity in enteropathogenic *Escherichia coli* interaction with human intestinal organ cultures  
J. Infect. Dis. 181, 1496 - 1500 (2000)
- PHILLIPS, A. D., S. NAVABPOUR, S. HICKS, G. DOUGAN, T. WALLIS und G. FRANKEL  
Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 target Peyer's patches in human and cause attaching/effacing lesions in both human and bovine intestine  
Gut 47, 377 - 381 (2000)
- PICHNER, R., H.-G. HECHELMANN, H. STEINRÜCK und M. GAREIS  
Verotoxinbildende *E. coli* (VTEC) und *E. coli*-Keimzahlen in frischen, streichfähigen Rohwürsten  
Fleischwirtsch. 81, 191 - 192 (2001)

- PHILLIPS, A. D., R. J. FITZHENRY, Y. CHONG, R. HEUSCKEL, S. MURCH, M. THOMSON und G. FRANKEL  
VTEC in human intestinal tissue tropism  
5<sup>th</sup> International Symposium on "Shiga Toxin (Verocytotoxin)-Producing *Escherichia coli* Infections", Edinburgh, Schottland, 08.-11.06.2003 (2003)
- PICKETT, C. L., D. L. COTTLE, E. C. PESCI und G. BIKAH  
Cloning, sequencing, and expression of the *Escherichia coli* cytolethal distending toxin genes  
Infect. Immun. 62, 1046 - 1051 (1994)
- PICKETT, C. L., R. B. LEE, A. EYIGOR, B. ELITZUR, E. M. FOX und N. A. STROCKBINE  
Patterns of variations in *Escherichia coli* strains that produce cytolethal distending toxin  
Infect. Immun. 72, 684 - 690 (2004)
- PIÉRARD, D., G. MUYLDERMANS, L. MORIAU, D. STEVENS und S. LAUWERS  
Identification of new verocytotoxin type 2 variant B-subunit genes in human and animal *Escherichia coli* isolates  
J. Clin. Microbiol. 36, 3317 – 3322 (1998)
- PINYON, R. A., J. C. PATON, A. W. PATON, J. A. BOTTEN und R. MORONA  
Refinement of a therapeutic Shiga toxin-binding probiotic for human trials  
J. Infect. Dis. 189, 1547 - 1555 (2004)
- PIVA, I. C., A. L. PEREIRA, L. R. FERRAZ, R. S. N. SILVA, A. C. VIEIRA, J. E. BLANCO, M. BLANCO, J. BLANCO und L. G. GIUGLIANO  
Virulence markers of enteroaggregative *Escherichia coli* isolated from children and adults with diarrhea in Brasília, Brazil  
J. Clin. Microbiol. 41, 1827 - 1832 (2003)
- POLLMANN, U. und A. FRANZKY  
Kenntnisstand zur Gewinnung von Stutenmilch unter Tierschutzgesichtspunkten  
Amtstierärztl. Dienst und Lebensmittelkontr. 11, 186 - 188 (2004)
- POTTER, A. A., S. KLASHINSKY, Y. LI, E. FREY, H. TOWNSEND, D. ROGAN, G. ERICKSON, S. HINKLEY, T. KLOPFENSTEIN, R. A. MOXLEY, D. R. SMITH und B. B. FINLAY  
Decreased shedding of *Escherichia coli* O157:H7 by cattle following vaccination with type III secreted proteins  
Vaccine 22, 362 - 369 (2004)
- PRADEL, N., V. LIVRELLI, C. DE CHAMPS, J.-B. PALCOUX, A. REYNAUD, F. SCHEUTZ, J. SIROT, B. JOLY und C. FORESTIER  
Prevalence and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle, food, and children during a one-year prospective study in France  
J. Clin. Microbiol. 38, 1023 – 1031 (2000)
- PRADEL, N., K. BOUKHORS, Y. BERTIN, C. FORESTIER, C. MARTIN und V. LIVRELLI  
Heterogeneity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from hemolytic-uremic syndrome patients, cattle, and food samples in central France  
Appl. Environ. Microbiol. 67, 2460 - 2468 (2001)
- PRAGER, R., R. REISSBRODT, H. HOLLER, B. GERICKE, S. ALEKSIC, H. CLAUS, H. WAGNER und H. TSCHÄPE  
Isolierung und Charakterisierung von Shigatoxin-produzierenden *E. coli*-Stämmen aus Stuhlproben: Ergebnisse einer Sentinel-Studie  
Bundesgesundhbl. 41, 6 - 13 (1998)

- PRAGER, R., U. STRUNZ, A. FRUTH und H. TSCHÄPE  
Subtyping of pathogenic *Escherichia coli* strains using flagellar (H)-antigens: serotyping versus *fliC* polymorphisms  
Int. J. Med. Microbiol. 292, 477 - 486 (2003)
- PRAGER, R., R. BAUERFEIND, E. TIETZE, J. BEHREND, A. FRUTH und H. TSCHÄPE  
Prevalence and deletion types of the pathogenicity island ETEC among *Escherichia coli* strains from oedema disease and colibacillosis in pigs  
Vet. Microbiol. 99, 287 - 294 (2004)
- PRESTON, M., A. BORCZYK, R. DAVIDSON, A. McGEER, J. BERTOLI, S. HARRIS, J. THUSUSKA, C. GOLDMAN, K. GREEN, D. LOW, P. PROCTOR, W. JOHNSON und R. KHAKHRIA  
Hospital outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 associated with a rare phage type - Ontario  
Can. Commun. Dis. Rep. 23, 33 - 37 (1997)
- PRITCHARD, G., S. WILLIAMSON, T. CARSON, J. BAILEY, L. WARNER, G. WILLSHAW und T. CHEASTY  
VTEC O157 infection from wild rabbits  
5<sup>th</sup> International Symposium on "Shiga Toxin (Verocytotoxin) - Producing *Escherichia coli* Infections", Edinburgh, Schottland, 08.-11.06.2003 (2003)
- PROULX, F., E. G. SEIDMAN und D. KARPMAN  
Pathogenesis of Shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome  
Pediatr. Res. 50, 163 - 171 (2001)
- PRUETT, W. P. JR., T. BIELA, C. P. LATTUADA, P. M. MROZINSKI, W. M. BARBOUR, R. S. FLOWERS, W. OSBORNE, J. O. REAGAN, D. THENO, V. COOK, A. M. McNAMARA und B. ROSE  
Incidence of *Escherichia coli* O157:H7 in frozen beef patties produced over an 8-hour shift  
J. Food Prot. 65, 1363 - 1370 (2002)
- QUINTERO BOTERO, C. L.  
Phäno- und Genotypisierung von *Escherichia coli* O157-Stämmen aus unterschiedlichen Habitaten  
Vet. Med. Diss., Justus-Liebig-Universität Gießen (2003)
- QUINTO, E. J. und A. CEPEDA  
Presence of CNF-producing *Escherichia coli* strains in soft cheese  
Arch. Lebensmittelhyg. 47, 81 - 104 (1996)
- RADU, S., O. W. LING, G. RUSUL, M. I. KARIM und M. NISHIBUCHI  
Detection of *Escherichia coli* O157:H7 by multiplex PCR and their characterization by plasmid profiling, antimicrobial resistance, RAPD and PFGE analyses  
J. Microbiol. Methods 46, 131 - 139 (2001)
- RAHN, K., S. A. RENWICK, R. P. JOHNSON, J. B. WILSON, R. C. CLARKE, D. ALVES, S. McEWEN, H. LIOR und J. SPIKA  
Persistence of *Escherichia coli* O157:H7 in dairy cattle and the dairy farm environment  
Epidemiol. Infect. 119, 251 - 259 (1997)
- RAMACHANDRAN, V., M. A. HORNITZKY, K. A. BETTELHEIM, M. J. WALKER und S. P. DJORDJEVIC  
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 (2001)

- RAMACHANDRAN, V., K. BRETT, M. A. HORNITZKY, M. DOWTON, K. A. BETTELHEIM, M. J. WALKER und S. P. DJORDEVIC  
Distribution of intimin subtypes among *Escherichia coli* isolates from ruminant and human sources  
J. Clin. Microbiol. 41, 5022 - 5032 (2003)
- RANGEL, J. M., P. H. SPARLING, C. CROWE, P. M. GRIFFIN und D. L. SWERDLOW  
Epidemiology of 283 outbreaks of *Escherichia coli* O157:H7 infections in the 20<sup>th</sup> century, United States  
5<sup>th</sup> International Symposium on "Shiga Toxin (Verocytotoxin)-Producing *Escherichia coli* Infections", Edinburgh, Schottland, 08.-11.06.2003 (2003)
- RATNAM, S., S. B. MARCH, R. AHMED, G. S. BEZANSON und S. KASATIYA  
Characterization of *Escherichia coli* serotype O157:H7  
J. Clin. Microbiol. 26, 2006 - 2012 (1988)
- REID, S. D., D. J. BETTING und T. S. WHITTAM  
Molecular detection and identification of intimin alleles in pathogenic *Escherichia coli* by multiplex PCR  
J. Clin. Microbiol. 37, 2719 - 2722 (1999)
- REIDA, P., M. WOLFF, H. W. POHLS, W. KUHLMANN, A. LEHMACHER, S. ALEKSIC, H. KARCH und J. BOCKEMÜHL  
An outbreak due to enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in a children day care centre characterized by person-to-person transmission and environmental contamination  
Zbl. Bakt. 281, 534 - 543 (1994)
- REINDERS, R. D., A. BARNA, L. J. LIPMAN und P. G. BIJKER  
Comparison of the sensitivity of manual and automated immunomagnetic separation methods for detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 in milk  
J. Appl. Microbiol. 92, 1015 - 1020 (2002)
- REISSBRODT, R., U. SACHSE, H. STEINRÜCK und H. TSCHÄPE  
Charakterisierung chromogener Nährmedien zum Nachweis von *E. coli* O157:H7/H<sup>-</sup>  
Bundesgesundhbl. 41, 36-39 (1998)
- REN, J., I. UTSUNOMIYA, K. TAGUCHI, T. ARIGA, T. TAI, Y. IHARA und T. MIYATAKE  
Localization of verotoxin receptors in nervous system  
Brain Res. 825, 183 - 188 (1999)
- REN, C. P., R. R. CHAUDHURI, A. FIVIAN, C. M. BAILEY, M. ANTONIO, W. M. BARNES und M. J. PALLAN  
The ETT2 gene cluster, encoding a second type III secretion system from *Escherichia coli*, is present in the majority of strains but has undergone widespread mutational attrition  
J. Bacteriol. 186, 3547 - 3560 (2004)
- RENTER, D. G., J. M. SARGEANT, R. D. OBERST und M. SAMADPOUR  
Diversity, frequency, and persistence of *Escherichia coli* O157 strains from range cattle environments  
Appl. Environ. Microbiol. 69, 542 - 547 (2003)
- REUBEN, A., H. TREMINIO, M. L. ARIAS und C. CHAVES  
Presence of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in food from animal origin in Costa Rica  
Arch. Latinoam. Nutr. 53, 389 - 392 (2003)

- REUTER, G.  
Mikrobiologie des Fleisches  
in: Weber, H. (Hrsg.), Mikrobiologie der Lebensmittel, Fleisch und Fleischerzeugnisse, 1. Aufl., Behr, Hamburg, 1 - 108 (1996)
- RICE, D. H., E. D. EBEL, D. D. HANCOCK, T. E. BESSER, D. E. HERRIOTT und L. V. CARPENTER  
*Escherichia coli* O157 in cull dairy cows on farm and at slaughter  
J. Food Prot. 60, 1386 – 1387 (1997)
- RICE, D. H., H. Q. SHENG, S. A. WYNIA und C. J. HOVDE  
Rectoanal mucosal swab culture is more sensitive than fecal culture and distinguishes *Escherichia coli* O157:H7-colonized cattle and those transiently shedding the same organism  
J. Clin. Microbiol. 41, 4924 - 4929 (2003)
- RICHTER, H., H. KLIE, M. TIMM, P. GALLIEN, H. STEINRÜCK, K.-W. PERLBERG und D. PROTZ  
Verotoxin-bildende *E. coli* (VTEC) im Kot von Schlachtrindern aus Deutschland  
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 110, 121 – 127 (1997)
- RILEY, L. W., R. S. REMIS, S. D. HELGERSON, H. B. MCGEE, J. G. WELLS, B. R. DAVIS, R. J. HERBERT, E. S. OLCOTT, L. M. JOHNSON, N. T. HARGRETT, P. A. BLAKE und M. L. COHEN  
Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype  
N. Engl. J. Med. 308, 681 – 685 (1983)
- RILEY, D. G., J. T. GRAY, G. H. LONERAGAN, K. S. BARLING und C. C. CHASE, JR.  
*Escherichia coli* O157:H7 prevalence in fecal samples of cattle from a southeastern beef cow-calf herd  
J. Food Prot. 66, 1778 - 1782 (2003)
- RITCHIE, J. M., P. L. WAGNER, D. W. K. ACHESON und M. K. WALDOR  
Comparison of Shiga toxin production by hemolytic-uremic syndrome-associated and bovine-associated Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates  
Appl. Environ. Microbiol. 69, 1059 - 1066 (2003)
- RIVAS, M., S. SOSA ESTANI, J. RANGEL, M. G. CALETTI, P. VALLES, P. MEAD und P. M. GRIFFIN  
Risk factors associated with Shiga toxin-producing *E. coli* infections, Argentina. A case control study  
5<sup>th</sup> International Symposium on "Shiga Toxin (Verocytotoxin)-Producing *Escherichia coli* Infections", Edinburgh, Schottland, 08.-11.06.2003 (2003)
- RIVERO, M. A., N. L. PADOLA, A. I. ETCHEVERRIA und A. E. PARMA  
Enterohemorrhagic *Escherichia coli* and hemolytic-uremic syndrome in Argentina  
Medicina (B. Aires) 64, 352 - 356 (2004)
- RKI (Robert Koch-Institut)  
Häufung von EHEC-Erkrankungen in Bayern - Vorläufige Ergebnisse einer Fallkontrollstudie  
Epid. Bull. 20, 137 - 138 (1996a)
- RKI (Robert Koch-Institut)  
Übersicht: Die Pathovaren von *Escherichia coli* beim Menschen  
Epid. Bull. 30, 205 – 206 (1996b)

- RKI (Robert Koch-Institut)  
Zum Auftreten von EHEC-Infektionen in Niedersachsen  
Epid. Bull. 46, 319 - 322 (1997)
- RKI (Robert Koch-Institut)  
Fallbericht: Inkomplettes HUS bei EHEC-Enteritis, übertragen durch Minipferde  
Epid. Bull. 37, 276 (1999)
- RKI (Robert Koch-Institut)  
Ratgeber Infektionskrankheiten, 6. Folge: Infektionen durch Enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC) - aktualisiert Oktober 2001  
[http://www.rki.de/cln\\_006/nn\\_225668/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Rat\\_EHEC.html\\_nnn=true](http://www.rki.de/cln_006/nn_225668/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Rat_EHEC.html_nnn=true) (2001a)
- RKI (Robert Koch-Institut)  
Überregionaler Ausbruch durch EHEC des EC-Serovars O26  
Epid. Bull. 7, 47 - 49 (2001b)
- RKI (Robert Koch-Institut)  
Häufung Sorbitol-fermentierender *E. coli* O157:H<sup>-</sup> in mehreren Bundesländern  
Epid. Bull. 15, 123 (2002a)
- RKI (Robert Koch-Institut)  
Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2001  
[http://www.rki.de/cln\\_006/nn\\_226928/DE/Content/Infekt/Jahrbuch/Jahrbuch\\_2001,templateId=raw,property=publicationFile.pdf/Jahrbuch\\_2001](http://www.rki.de/cln_006/nn_226928/DE/Content/Infekt/Jahrbuch/Jahrbuch_2001,templateId=raw,property=publicationFile.pdf/Jahrbuch_2001) (2002b)
- RKI (Robert Koch-Institut)  
Zur Situation bei wichtigen Infektionskrankheiten: Bakterielle Gastroenteritiden in Deutschland 2001  
Epid. Bull. 50, 417 – 422 (2002c)
- RKI (Robert Koch-Institut)  
Ein HUS-Ausbruch durch Sorbitol-fermentierende EHEC des Serovars O157:H<sup>-</sup>:  
Untersuchungsergebnisse und Lehren für die Surveillance  
Epid. Bull. 22, 171 - 175 (2003a)
- RKI (Robert Koch-Institut)  
Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2002  
[http://www.rki.de/cln\\_006/nn\\_226928/DE/Content/Infekt/Jahrbuch/Jahrbuch\\_2002,templateId=raw,property=publicationFile.pdf/Jahrbuch\\_2002](http://www.rki.de/cln_006/nn_226928/DE/Content/Infekt/Jahrbuch/Jahrbuch_2002,templateId=raw,property=publicationFile.pdf/Jahrbuch_2002) (2003b)
- RKI (Robert Koch-Institut)  
Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2003  
[http://www.rki.de/cln\\_006/nn\\_226928/DE/Content/Infekt/Jahrbuch/Jahrbuch\\_2003,templateId=raw,property=publicationFile.pdf/Jahrbuch\\_2003](http://www.rki.de/cln_006/nn_226928/DE/Content/Infekt/Jahrbuch/Jahrbuch_2003,templateId=raw,property=publicationFile.pdf/Jahrbuch_2003) (2004a)
- RKI (Robert Koch-Institut)  
Risikofaktoren für sporadische STEC (EHEC)-Erkrankungen - Ergebnisse einer bundesweiten Fall-Kontroll-Studie  
Epid. Bull. 50, 433 - 436 (2004b)
- RKI (Robert Koch-Institut)  
Risikofaktoren für sporadische STEC Infektionen in Bayern - Ergebnisse einer populationsbezogenen Fall-Kontroll-Studie  
Epid. Bull. 50, 436 - 439 (2004c)

- RKI (Robert Koch-Institut)  
Stellungnahme der ZKBS zu gentechnischen Arbeiten mit enterohämorrhagischen *E. coli*-Stämmen (EHEC)  
Bundesgesundhbl. 47, 584 - 586 (2004d)
- RKI (Robert Koch-Institut)  
Aktuelle Statistik meldepflichtiger Infektionskrankheiten  
Epid. Bull. 3, 18 - 20 (2005)
- RKI (Robert Koch-Institut) und BgVV (Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin)  
EHEC-Infektionen – Erkennung, Verhütung und Bekämpfung  
Bundesgesundhbl. 44, 1146 – 1148 (2001)
- ROBERTS, J. A., P. A. UPTON und G. AZENE  
*Escherichia coli* O157:H7; an economic assessment of an outbreak  
J. Public Health Med. 22, 99 - 107 (2000)
- ROGERIE, F., A. MARECAT, S. GAMBADE, F. DUPOND, P. BEAUBOIS und M. LANGE  
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 (2001)
- ROGERS, T. J., A. W. PATON, S. R. McCOLL und J. C. PATON  
Enhanced CXC chemokine responses of human colonic epithelial cells to locus of enterocyte effacement-negative Shiga-toxigenic *Escherichia coli*  
Infect. Immun. 71, 5623 - 5632 (2003)
- ROLDGAARD, B. B., F. SCHEUTZ, J. BOEL, S. AABO, A. C. SCHULTZ, T. CHEASTY, E. MØLLER NIELSEN, K. E. P. OLSEN und B. B. CHRISTENSEN  
VTEC O157 subtypes associated with the most severe clinical symptoms in humans constitute a minor part of VTEC O157 isolates from Danish cattle  
Int. J. Med. Microbiol. 294, 255 - 259 (2004)
- ROLLE, M. und A. MAYR  
Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre für Tierärzte, Biologen, Agrarwissenschaftler und Interessierte aus benachbarten Fachgebieten  
Enke-Verlag, Stuttgart, 6. Auflage, 579 - 593 (1993)
- ROSENSHINE, I., S. RUSCHKOWSKI, M. STEIN, D. J. REINSCHIED, S. D. MILLS und B. B. FINLAY  
A pathogenic bacterium triggers epithelial signals to form a functional bacterial receptor that mediates actin pseudopod formation  
EMBO J. 15, 2613 - 2624 (1996)
- RUGGENENTI, P., M. NORIS und G. REMUZZI  
Thrombotic microangiopathy, hemolytic uremic syndrome, and thrombotic thrombocytopenic purpura  
Kidney Int. 60, 831 - 846 (2001)
- RUMER, L., J. JORES, P. KIRSCH, Y. CAVIGNAC, K. ZEHMKE und L. H. WIELER  
Dissemination of *pheU*- and *pheV*-located genomic islands among enteropathogenic (EPEC) and enterohemorrhagic (EHEC) *E. coli* and their possible role in the horizontal transfer of the locus of enterocyte effacement (LEE)  
Int. J. Med. Microbiol. 292, 463 - 475 (2003)

- RÜSSMANN, H., H. SCHMIDT, J. HEESEMANN, A. CAPRIOLI und H. KARCH  
Variants of Shiga-like toxin II constitute a major toxin component in *Escherichia coli* O157 strains from patients with haemolytic uraemic syndrome  
J. Med. Microbiol. 40, 338 - 343 (1994)
- SAARI, M., T. CHEASTY, K. LEINO und A. SIITONEN  
Phage types and genotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 in Finland  
J. Clin. Microbiol. 39, 1140 - 1143 (2001)
- SAFDAR, N., A. SAID, R. E. GANGNON und D. G. MAKI  
Risk of hemolytic uremic syndrome after antibiotic treatment of *Escherichia coli* O157:H7 enteritis: a meta-analysis  
JAMA 288, 996 - 1001 (2002)
- SAMADPOUR, M.  
Molecular epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 by restriction fragment length polymorphism using Shiga-like toxin genes  
J. Clin. Microbiol. 33, 2150 - 2154 (1995)
- SAMADPOUR, M., M. KUBLER, F. C. BUCK, G. A. DEPAVIA, E. MAZENGA, J. STEWART, P. YANG und D. ALFI  
Prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in ground beef and cattle feces from King County, Washington  
J. Food Prot. 65, 1322 - 1325 (2002)
- SANCAK, A. A., H. C. RUTGERS, C. A. HART und R. M. BATT  
Prevalence of enteropathic *Escherichia coli* in dogs with acute and chronic diarrhoea  
Vet. Rec. 154, 101 - 106 (2004)
- SANDER, A.  
Untersuchungen zum Vorkommen von verotoxinogenen *Escherichia coli* (VTEC) und *Salmonella* spp. in Pferdefaeces und -fleischprodukten  
Vet. Med. Diss., Ludwig-Maximilians-Universität München (2002)
- SANDERSON, M. W., J. M. GAY, D. D. HANCOCK, C. C. GAY, L. K. FOX und T. E. BESSER  
Sensitivity of bacteriologic culture for detection of *Escherichia coli* O157:H7 in bovine feces  
J. Clin. Microbiol. 33, 2616 - 2619 (1995)
- SANDVIG, K. und B. VAN DEURS  
Endocytosis, intracellular transport, and cytotoxic action of Shiga toxin and ricin  
Physiol. Rev. 76, 949 - 966 (1996)
- SAVARINO, S. J., A. FASANO, D. C. ROBERTSON und M. M. LEVINE  
Enteraggregative *Escherichia coli* elaborate a heat-stable enterotoxin demonstrable in an *in-vitro* rabbit intestinal model  
J. Clin. Invest. 87, 1450 - 1455 (1991)
- SAVARINO, S. J., A. McVEIGH, J. WATSON, A. CRAVIOTO, J. MOLINA, P. ECHEVERRIA, M. K. BHAN, M. M. LEVINE und A. FASANO  
Enteraggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin is not restricted to enteraggregative *E. coli*  
J. Infect. Dis. 173, 1019 - 1022 (1996)
- SCALETSKY, I. C. A., S. H. FABBRICOTTI, R. L. B. CARVALHO, C. R. NUNES, H. S. MARANHAO, M. B. MORAIS und U. FAGUNDES-NETO  
Diffusely adherent *Escherichia coli* as a cause of acute diarrhea in young children in northeast Brazil: a case-control study  
J. Clin. Microbiol. 40, 645 - 648 (2002)

- SCHALCH, B, und A. STOLLE  
Einsatz des EiaFoss-Gerätes  
Fleischwirtsch. 80, 94 – 95 (2000)
- SCHMIDT, H.  
Shiga-toxin-converting bacteriophages  
Res. Microbiol. 152, 687 - 695 (2001)
- SCHMIDT, H. und H. KARCH  
Enterohemolytic phenotypes and genotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O111 strains from patients with diarrhea and hemolytic-uremic syndrome  
J. Clin. Microbiol. 34, 2364 - 2367 (1996)
- SCHMIDT, H., H. RÜSSMANN und H. KARCH  
Virulence determinants in nontoxigenic *Escherichia coli* O157 strains that cause infantile diarrhea  
Infect. Immun. 61, 4894 - 4898 (1993a)
- SCHMIDT, H., M. MONTAG, J. BOCKEMÜHL, J. HEESEMANN und H. KARCH  
Shiga-like toxin II-related cytotoxins in *Citrobacter freundii* strains from humans and beef samples  
Infect. Immun. 61, 534 - 543 (1993b)
- SCHMIDT, H., H. KARCH und L. BEUTIN  
The large-sized plasmids of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 strains encode hemolysins which are presumably members of the *E. coli* alpha-hemolysin family  
FEMS Microbiol. Lett. 117, 189 - 196 (1994a)
- SCHMIDT, H., H. RÜSSMANN, A. SCHWARZKOPF, S. ALEKSIC, J. HEESEMANN und H. KARCH  
Prevalence of attaching and effacing *Escherichia coli* in stool samples from patients and controls  
Zbl. Bakt. 281, 201 – 213 (1994b)
- SCHMIDT, H., L. BEUTIN und H. KARCH  
Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933  
Infect. Immun. 63, 1055 – 1061 (1995)
- SCHMIDT, H., B. HENKEL und H. KARCH  
A gene cluster closely related to type II secretion pathway operons of Gram-negative bacteria is located on the large plasmid of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 strains  
FEMS Microbiol. Lett. 148, 265 - 272 (1997a)
- SCHMIDT, H., J. SCHEEF, C. JANETZKI-MITTMANN, M. DATZ und H. KARCH  
An *ileX* tRNA gene is located close to the Shiga toxin II operon in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 and non-O157 strains  
FEMS Microbiol. Lett. 149, 39 – 44 (1997b)
- SCHMIDT, H., C. GEITZ, P. I. TARR, M. FROSCH und H. KARCH  
Non-O157:H7 pathogenic Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: Phenotypic and genetic profiling of virulence traits and evidence for clonality  
J. Infect. Dis. 179, 115 - 123 (1999a)
- SCHMIDT, H., J. SCHEEF, H. I. HUPPERTZ, M. FROSCH und H. KARCH  
*Escherichia coli* O157:H7 and O157:H<sup>-</sup> strains that do not produce Shiga toxin: phenotypic and genetic characterization of isolates associated with diarrhea and hemolytic-uremic syndrome  
J. Clin. Microbiol. 37, 3491 - 3496 (1999b)

- SCHMIDT, H., M. BIELASZEWSKA und H. KARCH  
Transduction of enteric *Escherichia coli* isolates with a derivate of Shiga toxin 2-encoding bacteriophage  $\phi$ 3538 isolated from *Escherichia coli* O157:H7  
Appl. Environ. Microbiol. 65, 3855 - 3861 (1999c)
- SCHMIDT, H., J. SCHEEF, S. MORABITO, A. CAPRIOLI, L. H. WIELER und H. KARCH  
A new Shiga toxin 2 variant (Stx2f) from *Escherichia coli* isolated from pigeons  
Appl. Environ. Microbiol. 66, 1205 – 1208 (2000)
- SCHMIDT, H., W.-L. ZHANG, U. HEMMRICH, S. JELACIC, W. BRUNDER, P. I. TARR, U. DOBRINDT, J. HACKER und H. KARCH  
Identification and characterization of a novel genomic island integrated at *sefC* in locus of enterocyte effacement-negative, Shiga toxin-producing *E. coli*  
Infect. Immun. 69, 6863 - 6873 (2001)
- SCHMITT, C. K., M. L. McKEE und A. D. O'BRIEN  
Two copies of Shiga-like toxin II-related genes common in enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains are responsible for the antigenic heterogeneity of the O157:H<sup>-</sup> strain E32511  
Infect. Immun. 59, 1065 - 1073 (1991)
- SCHÖNENBRÜCHER, H., A. ABDULMAWJOOD und M. BÜLTE  
Typisierung des Intimings enterohämorrhagischer und enteropathogener *Escherichia coli*  
Proc. 43. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG), Eigenverlag der DVG, Gießen, 568 - 571 (2002)
- SCHUBERT, S., A. RAKIN, H. KARCH, E. CARNIEL und J. HEESEMANN  
Prevalence of the "high-pathogenicity island" of *Yersinia* species among *Escherichia coli* strains that are pathogenic to humans  
Infect. Immun. 66, 480 - 485 (1998)
- SCHWARTZ, D. C. und C. R. CANTOR  
Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis  
Cell 37, 67 – 75 (1984)
- SCIEH (Scottish Centre for Infection and Environmental Health)  
Sorbitol-fermenting, verotoxigenic *E. coli* O157  
SCIEH Weekly Report 36, 281 (2002)
- SCOTLAND, S. M., H. R. SMITH, G. A. WILLSHAW und B. ROWE  
Vero cytotoxin production in strain of *Escherichia coli* is determined by genes carried on bacteriophage  
Lancet ii, 216 (1983)
- SCOTLAND, S. M., H. R. SMITH und B. ROWE  
Two Distinct Toxins Active on Vero Cells from *Escherichia coli* O157  
Lancet i, 885-886 (1985)
- SCOTT, D. A. und J. B. KAPER  
Cloning and sequencing of the genes encoding *Escherichia coli* cytolethal distending toxin  
Infect. Immun. 62, 244 - 251 (1994)
- SCOTTER, S., M. ALDRIDGE und K. CAPPS  
Validation of a method for the detection of *E. coli* O157:H7 in foods  
Food Control 11, 85 - 95 (2000)
- SCVPH (Scientific Committee on Veterinary Measures relating to Public Health)  
Opinion of the Scientific committee on veterinary measures relating to public health on verotoxigenic *E. coli* (VTEC) in foodstuffs, 21-22.01.2003  
[http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scv/outcome\\_en.html](http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scv/outcome_en.html) (2003)

- SHEORAN, A. S., S. CHAPMAN, P. SINGH, A. DONOHUE-ROLFE und S. TZIPORI  
Stx2-specific human monoclonal antibodies protect mice against lethal infection with  
*Escherichia coli* expressing Stx2 variants  
Infect. Immun. 71, 3125 - 3130 (2003)
- SHERE, J. A., K. J. BARTLETT und C. W. KASPAR  
Longitudinal study of *Escherichia coli* O157:H7 dissemination on four dairy farms in  
Wisconsin  
Appl. Environ. Microbiol. 64, 1390 – 1399 (1998)
- SHERIDAN, G. E., C. I. MASTERS, J. A. SHALLCROSS und B. M. McKEY  
Detection of mRNA by reverse transcription-PCR as an indicator of viability in *Escherichia coli* cells  
Appl. Environ. Microbiol. 64, 1313 - 1318 (1998)
- SIEGLER, R. L.  
The hemolytic uremic syndrome  
Pediatr. Clin. North. Am. 42, 1505 - 1529 (1995)
- SILVESTRO, L. M. CAPUTO, S. BLANCATO, L. DECASTELLI, A. FIORAVANTI, R.  
TOZZOLI, S. MORABITO und A. CAPRIOLI  
Asymptomatic carriage of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in farm workers in  
Northern Italy  
Epid. Infect. 132, 915 - 919 (2004)
- SIMMONS, N. A.  
Global perspectives on *Escherichia coli* O157:H7 and other verocytotoxic *E. coli* spp.: UK  
views  
J. Food Prot. 60, 1463 – 1465 (1997)
- SINGER, R. S., W. M. SISCHO und T. E. CARPENTER  
Exploration of biases that affect the interpretation of restriction fragment patterns produced  
by pulsed-field gel electrophoresis  
J. Clin. Microbiol. 42, 5502 - 5511 (2004)
- SLUTSKER, L., A. A. RIES, K. D. GREENE, J. G. WELLS, L. HUTWAGNER und P. M.  
GRIFFIN  
*Escherichia coli* O157:H7 diarrhea in the United States: Clinical and epidemiologic features  
Ann. Intern. Med. 126, 505 - 513 (1997)
- SLUTSKER, L., A. A. RIES, K. MALONEY, J. G. WELLS, K. D. GREENE und P. M. GRIFFIN  
A nationwide case-control-study of *Escherichia coli* O157:H7 infection in the United States  
J. Infect. Dis. 177, 962 - 966 (1998)
- SMALL, G., A. R. WATSON, J. H. EVANS und J. GALLAGHER  
Hemolytic uremic syndrome: defining the need for long-term follow-up  
Clin. Nephrol. 52, 352 - 356 (1999)
- SMITH, H. W., P. GREEN und Z. PARSELL  
Vero cell toxins in *Escherichia coli* and related bacteria: transfer by phage and conjugation  
and toxic action in laboratory animals, chickens and pigs  
J. Gen. Microbiol. 129, 3121 - 3137 (1983)
- SMITH, K. A., S. KRUTH, J. HAMMERMUELLER, C. GYLES und J. B. WILSON  
A case-control study of verocytotoxigenic *Escherichia coli* infection in cats with diarrhea  
Can. J. Vet. Res. 62, 87 - 92 (1998)

- SMITH, D., G. WILLSHAW, J. STANLEY und C. ARNOLD  
Genotyping of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157: Comparison of isolates of a prevalent phage type by fluorescent amplified-fragment length polymorphism and pulsed-field gel electrophoresis analyses  
J. Clin. Microbiol. 38, 4616 - 4620 (2000)
- SMITH, D., M. BLACKFORD, S. YOUNTS, R. MOXLEY, J. GRAY, L. HUNGERFORD, T. MILTON und T. KLOPFENSTEIN  
Ecological relationships between the prevalence of cattle shedding *Escherichia coli* O157:H7 and characteristics of the cattle or conditions of the feedlot pen  
J. Food Prot. 64, 1899 - 1903 (2001)
- SOLOMON, E. B., S. YARON und K. R. MATTHEWS  
Transmission of *Escherichia coli* O157:H7 from contaminated manure and irrigation water to lettuce plant tissue and its subsequent internalization  
Appl. Environ. Microbiol. 68, 397 - 400 (2002)
- SORDILLO, E. M., J. BELCH, M. BEMBRY, M. BEREZNEY, C. DESCHAMPS, P. GIGLIO, A. HADAWAY, B. O. HECTOR, B. HOEHL, R. KSHATRIYA, O. MURRAY, Z. NALEWEJSKI, M. PAGODA, A. POLKOWSKI, M. SHAW, C. SHELDON, V. PINCKSPERBER, C. SULIT, T. THOMAS und S. WEIZEL  
Adherence to testing criteria can minimize false-positive results for *Escherichia coli* O157  
J. Clin. Microbiol. 36, 3112 (1998)
- STAHL, A. und M. BÜLTE  
Enhancer zum verbesserten Nachweis von verotoxinbildenden *E. coli* (VTEC)  
Proc. 41. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG), Eigenverlag der DVG, Gießen, 412 - 415 (2000a)
- STAHL, A. und M. BÜLTE  
Verotoxin bildende *Escherichia coli* (VTEC) in Lebensmitteln - Untersuchungen zum quantitativen Nachweis mittels Koloniehybridisierung  
Fleischwirtsch. 80, 99 - 101 (2000b)
- STATENS SERUM INSTITUT  
Verotoxin-producing *E. coli* (VTEC) 2001-2002  
Epi-News 20/21 (2003)
- STATISTISCHES BUNDESAMT  
Fachserie 3, Reihe 4.3: Land- und Forstwirtschaft, Fischerei - Fleischuntersuchung - 2002  
SFG - Servicecenter Fachverlage GmbH, Reutlingen, S. 6 + 34 (2003)
- STATISTISCHES BUNDESAMT  
Land- und Forstwirtschaft, Fischerei - Viehbestand, Betriebe mit Pferden bzw. Geflügel sowie Pferde- und Geflügelbestand  
<http://www.destatis.de/basis/d/forst/forsttab31.php> (2004)
- STEINMANN, E. und D. KENEL  
Prävalenz von enteropathogenen und Shiga-like Toxin produzierenden *Escherichia coli* bei Rind, Schaf, Ziege, Pferd, Schwein, Huhn, Hund und Katze  
Vet. Med. Diss., Universität Zürich (1995)
- STENGER, K. O., F. WINDLER, H. KARCH, H. VON WULFFEN und J. HEESEMANN  
Hemolytic-uremic syndrome associated with an infection by verotoxin producing *Escherichia coli* O111 in a woman on oral contraceptives  
Clin. Nephrol. 29, 153 - 158 (1988)

- STEPHAN, R. und K. BUEHLER  
A survey of the prevalence of *Escherichia coli* O157 and other Shigatoxin-producing *Escherichia coli* in bulk-tank milk samples from north-east Switzerland  
Arch. Lebensmittelhyg. 52, 122 - 123 (2001)
- STEPHAN, R., S. RAGETTI und F. UNTERMANN  
Prevalence and characteristics of verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) in stool samples from asymptomatic human carriers working in the meat processing industry in Switzerland  
J. Appl. Microbiol. 88, 335 - 341 (2000)
- STEPHAN, R., N. BOREL, C. ZWEIFEL, M. BLANCO und J. E. BLANCO  
First isolation and further characterization of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) O157:H45 strains from cattle  
BMC Microbiol. 4, 10 (2004)
- STEVENS, M. P., P. M. VAN DIEMEN, G. FRANKEL, A. D. PHILLIPS und T. S. WALLIS  
Efa1 influences colonization of the bovine intestine by Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotypes O5 und O111  
Infect. Immun. 70, 5158 - 5166 (2002)
- STIEBING, A., N. VOGT, J. BAUMGART und K. PUTZFELD  
EHEC – Überlebensfähigkeit in Rohwurst - 1. Streichfähige Rohwurst  
Fleischwirtsch. 80, 87 - 90 (2000a)
- STIEBING, A., N. VOGT, J. BAUMGART, K. PUTZFELD und J. BERGT  
EHEC – Überlebensfähigkeit in Rohwurst - 2. Schnittfeste Rohwurst  
Fleischwirtsch. 80, 107 – 110 (2000b)
- STRACHAN, N. J. C., G. M. DUNN und I. D. OGDEN  
*Escherichia coli* O157: Burger bug of environmental pathogen?  
5<sup>th</sup> International Symposium on "Shiga Toxin (Verocytotoxin)-Producing *Escherichia coli* Infections", Edinburgh, Schottland, 08.-11.06.2003 (2003)
- STROCKBINE, N. A., L. R. M. MARQUES, J. W. NEWLAND, H. WILLIAMS SMITH, R. K. HOLMES und A. D. O'BRIEN  
Two toxin-converting phages from *Escherichia coli* O157:H7 strain 933 encode antigenically distinct toxins with similar biologic activities  
Infect. Immun. 53, 135 – 140 (1986)
- STROCKBINE, N. A., M. P. JACKSON, L. M. SUNG, R. K. HOLMES und A. D. O'BRIEN  
Cloning and sequencing of the genes for Shiga toxin from *Shigella dysenteriae* type 1  
J. Bacteriol. 170, 1116 - 1122 (1988)
- STROCKBINE, N. A., J. G. WELLS, C. A. BOPP und T. J. BARRETT  
Overview of detection and subtyping methods  
in: Kaper, J. B. und A. D. O'Brien (Hrsg.), *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* strains, American Society for Microbiology, Washington, D. C., 331 - 356 (1998)
- STROEHER, U. H., L. BODE, L. BEUTIN und P. A. MANNING  
Characterization and sequence of a 33-kDa enterohemolysin (Ehly 1)-associated protein in *Escherichia coli*  
Gene 132, 89 - 94 (1993)

- SUZUKI, M., F. KONDO, Y. ITO, M. MATSUMOTO, M. HATA, H. OKA, M. TAKAHASHI und K. SAKAE  
Identification of a Shiga-toxin type I variant containing an IS1203-like element, from Shiga-toxin producing *Escherichia coli* O157:H7  
FEMS Microbiol. Lett. 234, 63 - 67 (2004)
- SWAMINATHAN, B., T. J. BARRETT, S. B. HUNTER, R. V. TAUXE und CDC PULSENET TASK FORCE  
PulseNet: the molecular subtyping network for foodborne bacterial disease surveillance, United States  
Emerg. Infect. Dis. 7, 382 - 389 (2001)
- SYNGE, B. A., M. E. CHASE-TOPPING, G. F. HOPKINS, I. J. MCKENDRICK, F. THOMSON-CARTER, D. GRAY, S. M. RUSBRIDGE, F. I. MUNRO, G. FOSTER und G. J. GUNN  
Factors influencing the shedding of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 by beef suckler cows  
Epidemiol. Infect. 130, 301 - 312 (2003)
- SZABO, R. A., E. C. D. TODD und A. JEAN  
Method to isolate *Escherichia coli* O157:H7 from food  
J. Food Prot. 49, 768 - 772 (1986)
- TARR, P. I. und M. A. NEILL  
*Escherichia coli* O157:H7  
Gastroenterol. Clin. North Am. 30, 735 - 751 (2001)
- TARR, C. L. und T. S. WHITTAM  
Molecular evolution of the intimin gene in O111 clones of pathogenic *Escherichia coli*  
J. Bacteriol. 184, 479 - 487 (2002)
- TARR, P. I., T. E. BESSER, D. D. HANCOCK, W. E. KEENE und . GOLDOFT  
Verotoxinogenic *Escherichia coli* Infection: U.S. Overview  
J. Food Prot. 60, 1466 - 1471 (1997)
- TARR, P. I., S. S. BILGE, J. C. VARY JR., S. JELACIC, R. L. HABEEB, T. R. WARD, M. R. BAYLOR und T. E. BESSER  
Iha: a novel *E. coli* O157:H7 adherence-conferring molecule encoded on a recently acquired chromosomal island of conserved structure  
Infect. Immun. 68, 1400 - 1407 (2000)
- TATSUNO, I., M. HORIE, H. ABE, T. MIKI, K. MAKINO, H. SHINAGAWA, H. TAGUCHI, S. KAMIYA, T. HAYASHI und C. SASAKAWA  
*ToxB* gene on pO157 of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 is required for full epithelial cell adherence phenotype  
Infect. Immun. 69, 6660 - 6669 (2001)
- TAYLOR, K. A., P. W. LUTHER und M. S. DONNENBERG  
Expression of the EspB protein of enteropathogenic *Escherichia coli* within HeLa cells affects stress fibers and cellular morphology  
Infect. Immun. 67, 120 - 125 (1999)
- TE LOO, D. M. W. M., L. A. H. MONNENS, T. J. A. M. VAN DER VELDEN, M. A. VERMEER, F. PREYERS, P. N. M. DEMACKER, L. P. W. J. VAN DEN HEUVEL und V. W. M. VAN HINSBERGH  
Binding and transfer of verocytotoxin by polymorphonuclear leukocytes in hemolytic uremic syndrome  
Blood 95, 3396 - 3402 (2000)

- TEEL, L. D., A. R. MELTON-CELSA, C. K. SCHMITT und A. D. O'BRIEN  
One of two copies of the gene for the activatable Shiga toxin type 2d in *Escherichia coli* O91:H21 strain B2F1 is associated with an inducible bacteriophage  
*Infect. Immun.* 70, 4282 - 4291 (2002)
- TENOVER, F. C., R. D. ARBEIT, R. V. GOERING, P. A. MICKELSEN, B. E. MURRAY, D. H. PERSING und B. SWAMINATHAN  
Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing  
*J. Clin. Microbiol.* 33, 2233 - 2239 (1995)
- TEUFEL, P., E. BARTELT, J. BRÄUNIG, L. ELLERBROEK, A. TELO, H. WICHMANN-SCHAUER, P. GALLIEN, H. RICHTER, H. KLIE, M. TIMM und K.-W. PERLBERG  
Nachweis von Verotoxin-produzierenden *E.coli* (VTEC) in Rinderhackfleisch und Weichkäse  
*Bundesgesundhbl.* 41, 31 -36 (1998)
- TEUNIS, P., K. TAKUMI und K. SHINAGAWA  
Dose response for infection by *Escherichia coli* O157:H7 from outbreak data  
*Risk Analysis* 24, 401 - 407 (2004)
- THOMAS, A., T. CHEASTY, H. CHART und B. ROWE  
Isolation of vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* serotypes O9ab:H<sup>-</sup> and O101:H<sup>-</sup> carrying VT2 variant gene sequences from a patient with haemolytic uraemic syndrome  
*Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 13, 1074 - 1076 (1994)
- TILDEN, J., W. YOUNG, A. M. McNAMARA, C. CUSTER, B. BOESEL, M. A. LAMBERT-FAIR, J. MAJKOWSKI, D. VUGIA, S. B. WERNER, J. HOLLINGSWORTH und J. G. MORRIS  
A new route of transmission for *Escherichia coli*: infection from dry fermented salami  
*Am. J. Public Health* 86, 1142 - 1145 (1996)
- TIMM, M., H. KLIE, H. RICHTER und K.-W. PERLBERG  
Eine Methode zur gezielten Isolierung Verotoxin-bildender *Escherichia coli*-Kolonien  
*Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* 109, 270 – 272 (1996)
- TIMM, M., H. KLIE, H. RICHTER, P. GALLIEN, K.-W. PERLBERG, S. LEHMANN und D. PROTZ  
Verfahren zum qualitativen Nachweis von Verotoxin-produzierenden *Escherichia coli* (VTEC) in Lebensmitteln und Fäzes  
*Bundesgesundhbl.* 41, 20 – 25 (1998)
- TIMM, M., H. KLIE, H. RICHTER, P. GALLIEN, K. W. PERLBERG, S. LEHMANN und D. PROTZ  
Untersuchungen zum Nachweis und Vorkommen von Verotoxin-bildenden *Escherichia coli* (VTEC) in Rohwurst  
*Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* 112, 385 - 389 (1999)
- TKALCIC, S., D. A. BROWN, B. G. HARMON, A. V. JAIN, E. P. O. MUELLER, A. PARKS, K. L. JACOBSEN, S. A. MARTIN, T. ZHAO und M. P. DOYLE  
Effects of diet on rumen proliferation and fecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in calves  
*J. Food Prot.* 63, 1630 - 1636 (2000)
- TKALCIC, S., T. ZHAO, B. G. HARMON, M. P. DOYLE, C. A. BROWN und P. ZHAO  
Fecal shedding of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in weaned calves following treatment with probiotic *Escherichia coli*  
*J. Food Prot.* 66, 1184 - 1189 (2003)

- TÓTH, I., F. HÉRAULT, L. BEUTIN und E. OSWALD  
Production of cytolethal distending toxins by pathogenic *Escherichia coli* strains isolated from human and animal sources: establishment of the existence of a new *cdt* variant (type IV)  
J. Clin. Microbiol. 41, 4285 - 4291 (2003a)
- TÓTH, I., H. SCHMIDT, M. DOW, A. MALIK, E. OSWALD und B. NAGY  
Transduction of porcine enteropathogenic *Escherichia coli* with a derivative of a Shiga toxin 2-encoding bacteriophage in a porcine ligated ileal loop system  
Appl. Environ. Microbiol. 69, 7242 - 7247 (2003b)
- TOZZI, A. E., A. CAPRIOLI, F. MINELLI, A. GIANVITI, L. DE PETRIS, A. EDEFONTI, G. MONTINI, A. FERRETTI, T. DE PALO, M. GAIDO, G. RIZZONI und HEMOLYTIC UREMIC SYNDROME STUDY GROUP  
Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections associated with hemolytic uremic syndrome, Italy, 1988-2000  
Emerg. Infect. Dis. 9, 106 - 108 (2003)
- TRABULSI, L. R., R. KELLER und T. A. TARDELLI GOMES  
Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*  
Emerg. Infect. Dis. 8, 508 - 513 (2002)
- TRACHTMAN, H., A. CNAAN, E. CHRISTEN, K. GIBBS, S. ZHAO, D. W. K. ACHESON, R. WEISS, F. J. KASKEL, A. SPITZER, G. H. HIRSCHMANN und INVESTIGATORS OF THE HUS-SYNSORB PK MULTICENTER CLINICAL TRIAL  
Effect of an oral Shiga toxin-binding agent on diarrhea-associated hemolytic uremic syndrome in children  
JAMA 290, 1337 - 1344 (2003)
- TREVENA, W. B., R. S. HOOPER, C. WRAY, G. A. WILLSHAW, T. CHEASTY und G. DOMINGUE  
Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 associated with companion animals  
Vet. Rec. 138, 400 (1996)
- TRUMPF., T., A. HERZBERG, J. HIRSCH, A. JENTZEN, B. KRAHMER, W. ROHWER, B. VOGELANG und G. STENGEL  
Nachweis von Shiga-Toxin bildenden *Escherichia coli* (STEC)  
Amtstierärztl. Dienst und Lebensmittelkontr. 7, 18 - 21 (2000)
- TSAI, W.-L., C. E. MILLER und E. R. RICHTER  
Determination of the sensitivity of a rapid *Escherichia coli* O157:H7 assay for testing 375-gram composite samples  
Appl. Environ. Microbiol. 66, 4149 - 4151 (2000)
- TSCHÄPE, H., R. PRAGER, W. STRECKEL, A. FRUTH, E. TIETZE und G. BÖHME  
Verotoxinogenic *Citrobacter freundii* associated with severe gastroenteritis and cases of haemolytic uraemic syndrome in a nursery school: green butter as the infection source  
Epidemiol. Infect. 114, 441 - 450 (1995)
- TSUJI, H., T. OSHIBE, K. HAMADA, S. KAWANISHI, A. NAKAYAMA und H. NAKAJIMA  
An outbreak of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 caused by ingestion of contaminated beef at grilled meat-restaurant chain stores in the Kinki district in Japan: Epidemiological analysis by pulsed-field gel electrophoresis  
Jpn. J. Infect. Dis. 55, 91 - 92 (2002)
- TU, X., I. NISAN, C. YONA, E. HANSKI und I. ROSENSHINE  
EspH, a new cytoskeleton-modulating effector of enterohaemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*  
Mol. Microbiol. 47, 595 - 606 (2003)

- TUTTLE, J., T. GOMEZ, M. P. DOYLE, J. G. WELLS, T. ZHAO, R. V. TAUXE und P. M. GRIFFIN  
Lessons from a large outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections: insights into the infectious dose and method of widespread contamination of hamburger patties  
*Epidemiol. Infect.* 122, 185 - 192 (1999)
- UHITIL, S., S. JAKŠIĆ, T. PETRAK und K. BOTKA-PETRAK  
Presence of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef and ground baby beef meat  
*J. Food Prot.* 64, 862 - 864 (2001)
- UNKMEIR, A. und H. SCHMIDT  
Structural Analysis of Phage-Borne *stx* Genes and Their Flanking Sequences in Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* and *Shigella dysenteriae* Type 1 Strains  
*Infect. Immun.* 68, 4856 - 4864 (2000)
- URDAHL, A. M., K. CUDJOE, E. WAHL, E. HEIR und Y. WASTESON  
Isolation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O103 from sheep using automated immunomagnetic separation (AIMS) and AIMS-ELISA: sheep as the source of a clinical O103 case?  
*Let. Appl. Microbiol.* 35, 218 - 222 (2002a)
- URDAHL, A. M., L. BEUTIN, E. SKJERVE und Y. WASTESON  
Serotypes and virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from healthy Norwegian sheep  
*J. Appl. Microbiol.* 93, 1026 - 1033 (2002b)
- VALCOUR, J. E., P. MICHEL, S. A. McEWEN und J. B. WILSON  
Associations between indicators of livestock farming intensity and incidence of human Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection  
*Emerg. Infect. Dis.* 8, 252 - 257 (2002)
- VARMA, J. K., K. D. GREENE, M. E. RELLER, S. M. DeLONG, J. TROTTIER, S. F. NOWICKI, M. DiORIO, E. M. KOCH, T. L. BANNERMAN, S. T. YORK, M.-A. LAMBERT-FAIR, J. G. WELLS und P. S. MEAD  
An outbreak of *Escherichia coli* O157 infection following exposure to an contaminated building  
*JAMA* 290, 2709 - 2712 (2003)
- VILA, J., A. GENE, M. VARGAS, J. GASCON, C. LATORRE und M. T. JIMENEZ DE ANTA  
A case-control study of diarrhoea in children caused by *Escherichia coli* producing heat-stable enterotoxin (EAST-1)  
*J. Med. Microbiol.* 47, 889 - 891 (1998)
- VOITOUX, E., V. LAFARGE, C. COLLETTE und B. LOMBARD  
Applicability of the draft standard method for the detection of *Escherichia coli* O157 in dairy products  
*Int. J. Food Microbiol.* 77, 213 - 221 (2002)
- VOLD, L., A. HOLCK, Y. WASTESON und H. NISSEN  
High levels of background flora inhibits growth of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef  
*Int. J. Food Microbiol.* 56, 219 - 225 (2000)
- WAHLSTRÖM, H., E. TYSÉN, E. OLSSON ENGVALL, B. BRÄNDSTRÖM, E. ERIKSSON, T. MÖRNER und I. VÅGSHOLM  
Survey of *Campylobacter* species, VTEC O157 and *Salmonella* species in Swedish wildlife  
*Vet. Rec.* 153, 74 - 80 (2003)

- WAINWRIGHT, L. A. und J. B. KAPER  
EspB and EspD require a specific chaperone for proper secretion from enteropathogenic *Escherichia coli*  
Mol. Microbiol. 27, 1247 - 1260 (1998)
- WALTERSPIEL, J. N., S. ASHKENAZI, A. L. MORROW und T. G. CLEARY  
Effect of subinhibitory concentrations of antibiotics on extracellular Shiga-like toxin I  
Infection 20, 25 - 29 (1992)
- WANG, G. und M. P. DOYLE  
Survival of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in water  
J. Food Prot. 61, 662 - 667 (1998)
- WANG, G., T. ZHAO und M. P. DOYLE  
Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in bovine feces  
Appl. Environ. Microbiol. 62, 2567 - 2570 (1996)
- WANG, G., T. ZHAO und M. P. DOYLE  
Survival and growth of *Escherichia coli* O157:H7 in unpasteurized and pasteurized milk  
J. Food Prot. 60, 610 - 613 (1997)
- WANG, L., D. ROTHEMUND, H. CURD und P. R. REEVES  
Sequence diversity of the *Escherichia coli* H7 *fliC* genes: Implication for a DNA-based typing scheme for *E. coli* O157:H7  
J. Clin. Microbiol. 38, 1786 - 1790 (2000)
- WANG, M., L. RAN, Z. WANG und Z. LI  
Study on national active monitoring for food borne pathogens and antimicrobial resistance in China 2001  
Wei Sheng Yan Jiu 33, 49 - 54 (2004)
- WANI, S. A., M. A. BHAT, I. SAMANTA, Y. NISHIKAWA und A. S. BUCHH  
Isolation and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) from calves and lambs with diarrhoea in India  
Lett. Appl. Microbiol. 37, 121 - 126 (2003)
- WARBURTON, D. W., J. W. AUSTIN, B. H. HARRISON und G. SANDERS  
Survival and recovery of *Escherichia coli* O157:H7 in inoculated bottled water  
J. Food Prot. 61, 948 - 952 (1998)
- WATANABE, Y., K. OZASA, J. H. MERMIN, P. M. GRIFFIN, K. MASUDA, S. IMASHUKU und T. SAWADA  
Factory outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection in Japan  
Emerg. Infect. Dis. 5, 424 - 428 (1999)
- WATANABE, M., K. MATSUOKA, E. KITA, K. IGAI, N. HIGASHI, A. MIYAGAWA, T. WATANABE, R. YANOSHITA, Y. SAMEJIMA, D. TERUNUMA, Y. NATORI und K. NISHIKAWA  
Oral therapeutic agents with highly clustered globotriose for treatment of Shiga toxigenic *Escherichia coli* infections  
J. Infect. Dis. 189, 360 - 368 (2004)
- WEAGANT, S. D., J. L. BRYANT und K. G. JINNEMAN  
An improved rapid technique for isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from foods  
J. Food Prot. 58, 7 - 12 (1995)
- WEINSTEIN, D. L., M. P. JACKSON, J. E. SAMUEL, R. K. HOLMES und A. D. O'BRIEN  
Cloning and sequencing of a Shiga-like toxin type II variant from *Escherichia coli* strain responsible for edema disease of swine  
J. Bacteriol. 170, 4223 - 4230 (1988)

- WELINDER-OLSSON, C., K. STENQVIST, M. BADENFORS, Å. BRANDBERG, K. FLORÈN, M. HOLM, L. HOLMBERG, E. KJELLIN, S. MÅRILD, A. STUDAHL und B. KAIJSER  
EHEC outbreak among staff at a children's hospital - use of PCR for verocytotoxin detection and PFGE for epidemiological investigation  
*Epidemiol. Infect.* 132, 43 - 49 (2003)
- WELLS, J. G., B. R. DAVIS, I. K. WACHSMUTH, L. W. RILEY, R. S. REMIS, R. SOKOLOW und G. K. MORRIS  
Laboratory investigation of hemorrhagic colitis outbreaks associated with a rare *Escherichia coli* serotype  
*J. Clin. Microbiol.* 18, 512 - 520 (1983)
- WERBER, D., A. FRUTH, U. BUCHHOLZ, R. PRAGER, M. H. KRAMER, A. AMMON und H. TSCHÄPE  
Strong association between Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 and virulence genes *stx<sub>2</sub>* and *eae* as possible explanation for predominance of serogroup O157 in patients with haemolytic uraemic syndrome  
*Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 22, 726 - 730 (2003)
- WHITTAM, T. S., M. L. WOLFE, I. K. WACHSMUTH, F. ORSKOV, I. ORSKOV und R. A. WILSON  
Clonal relationships among *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic colitis and infantile diarrhea  
*Infect. Immun.* 61, 1619 - 1629 (1993)
- WHO (World Health Organization)  
Report of WHO consultation on "Shiga-like toxins" producing *Escherichia coli*, with special emphasis on zoonotic aspects, Gießen, 10.-12. Dezember 1991  
WHO/CDS/VPH/92.103 (1991)
- WHO (World Health Organization)  
Food safety - enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection  
*Wkly. Epidemiol. Rec.* 71, 267 - 268 (1996)
- WHO (World Health Organization)  
Prevention and control of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) infections. Report of a WHO consultation, Genf, Schweiz, 28. April-1. Mai 1997  
WHO/FSF/FOS/97.6 (1997)
- WHO (World Health Organization)  
Zoonotic non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC). Report of a WHO scientific working group meeting. Berlin, Deutschland, 23.-26. Juni 1998  
WHO/CSR/APH/98.8 (1998)
- WIELER, L. H.  
Multi locus sequence typing of enterohemorrhagic (EHEC) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC)  
EHEC-Workshop 2004, Wildbad Kreuth, 22.-24. Juli 2004 (2004)
- WIELER, L. H., R. BAUERFEIND und G. BALJER  
Characterization of Shiga-like toxin producing *Escherichia coli* (SLTEC) isolated from calves with and without diarrhoea  
*Zbl. Bakt.* 276, 243 - 253 (1992)
- WIELER, L. H., E. VIELER, C. ERPENSTEIN, T. SCHLAPP, H. STEINRÜCK, R. BAUERFEIND, A. BYOMI und G. BALJER  
Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from bovines: association of adhesion with carriage of *eae* and other genes  
*J. Clin. Microbiol.* 34, 2980 - 2984 (1996)

- WIELER, L. H., T. K. McDANIEL, T. S. WHITTAM und J. B. KAPER  
Insertion site of the locus of enterocyte effacement in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* differs in relation to the clonal phylogeny of the strains  
FEMS Microbiol. Lett. 156, 49 - 53 (1997)
- WIELER, L. H., B. BUSSE, H. STEINRÜCK, L. BEUTIN, A. WEBER, H. KARCH und G. BALJER  
Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) strains of serogroup O118 display three distinctive clonal groups of EHEC pathogens  
J. Clin. Microbiol. 38, 2162 - 2169 (2000)
- WILLSHAW, G. A., H. R. SMITH, S. M. SCOTLAND und B. ROWE  
Cloning of genes determining the production of vero cytotoxin by *Escherichia coli*  
J. Gen. Microbiol. 131, 3047 - 3053 (1985)
- WILLSHAW, G. A., H. R. SMITH, S. M. SCOTLAND, A. M. FIELD und B. ROWE  
Heterogeneity of *Escherichia coli* phages encoding vero cytotoxins: comparison of cloned sequences determining VT1 and VT2 and development of specific probes  
J. Gen. Microbiol. 133, 1309 - 1317 (1987)
- WILLSHAW, G. A., J. EWANS, T. CHEASTY, A. CUMMINS und G. C. PRITCHARD  
Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* infection and private farm visits  
Vet. Rec. 152, 365 - 366 (2003)
- WILSON, R. A. und D. H. FRANCIS  
Fimbriae and enterotoxins associated with *Escherichia coli* serogroups isolated from pigs with colibacillosis  
Am. J. Vet. Res. 47, 213 - 217 (1986)
- WONG, C. S., S. JELACIC, R. L. HABEED, S. L. WATKINS und P. I. TARR  
The risk of the hemolytic-uremic syndrome after antibiotic treatment of *Escherichia coli* O157:H7 infections  
N. Eng. J. Med. 342, 1930 - 1936 (2000)
- WRIGHT, D. J., P. A. CHAPMAN und C. A. SIDDON  
Immunomagnetic separation as a sensitive method for isolating *Escherichia coli* O157 from food samples  
Epidemiol. Infect. 113, 31 - 39 (1994)
- WUTHE, H. H.  
*Escherichia coli* O157:H7 bei hämorrhagischer Colitis  
Dtsch. Med. Wschr. 112, 1761 - 1762 (1987)
- WYSS, R. und P. HOCKENJOS  
Nachweis von enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC) auf Rinderschlachtkörpern  
Fleischwirtsch. 79, 84 - 86 (1999)
- ZADIK, P. M., P. A. CHAPMAN und C. A. SIDDON  
Use of tellurite for the selection of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157  
Med. Microbiol. 39, 155 - 158 (1993)
- ZAMBONI, A., S. H. FABBRICOTTI, U. FAGUNDES-NETO und I. C. SCALETSKY  
Enteroaggregative *Escherichia coli* virulence factors are found to be associated with infantile diarrhoea in Brazil  
J. Clin. Microbiol. 42, 1058 - 1063 (2004)

- ZHANG, X., A. D. McDANIEL, L. E. WOLF, G. T. KEUSCH, M. K. WALDOR und D. W. ACHESON  
Quinolone antibiotics induce Shiga toxin-encoding bacteriophages, toxin production, and death in mice  
J. Infect. Dis. 181, 664 - 670 (2000)
- ZHANG, J., S. XIA, G. SHEN, Z. CHEN, P. HUANG, B. FU und G. TU  
A study on acute renal failure after an outbreak of diarrhea in Suixian county, Henan province  
Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi 23, 105 - 107 (2002a)
- ZHANG, W. L., B. KÖHLER, E. OSWALD, L. BEUTIN, H. KARCH, S. MORABITO, A. CAPRIOLI, S. SUERBAUM und H. SCHMIDT  
Genetic diversity of intimin genes of attaching and effacing *Escherichia coli* strains  
J. Clin. Microbiol. 40, 4486 - 4492 (2002b)
- ZHANG, W., M. BIELASZEWSKA, T. KUCZIUS und H. KARCH  
Identification, characterization, and distribution of a Shiga toxin 1 gene variant (*stx<sub>1c</sub>*) in *Escherichia coli* strains isolated from humans  
J. Clin. Microbiol. 40, 1441 - 1446 (2002c)
- ZHANG, W., M. BIELASZEWSKA, A. W. FRIEDRICH, T. KUCZIUS und H. KARCH  
Transcriptional analysis of genes encoding Shiga toxin 2 and its variants in *Escherichia coli*  
Appl. Environ. Microbiol. 71, 558 - 561 (2005)
- ZHAO, T., M. P. DOYLE, J. SHERE und L. GARBER  
Prevalence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in a survey of dairy herds  
Appl. Environ. Microbiol. 61, 1290 - 1293 (1995)
- ZHAO, T., M. P. DOYLE, B. G. HARMON, C. A. BROWN, P. O. MUELLER und A. H. PARKS  
Reduction of carriage of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in cattle by inoculation with probiotic bacteria  
J. Clin. Microbiol. 36, 641 - 647 (1998)
- ZIESE, T., Y. ANDERSON, B. DE JONG, S. LÖFDAHL und M. RAMBERG  
Outbreak of *Escherichia coli* O157 in Sweden  
Eurosurveillance 1, 2 - 3 (1996)
- ZIMMERHACKL, L. B.  
Klinik beim Hämolytisch-urämischem Syndrom (HUS)  
EHEC-Workshop 2004, Wildbad Kreuth, 22.-24. Juli 2004 (2004)
- ZMP (Zentrale Markt- und Preisberichtsstelle für Erzeugnisse der Land-, Forst- und Ernährungswirtschaft GmbH)  
Agrarmärkte in Zahlen - Ausgabe Deutschland 2004  
ZMP - Zentrale Markt- und Preisberichtsstelle für Erzeugnisse der Land-, Forst- und Ernährungswirtschaft GmbH, Bonn, S. 4 (2004)
- ZSCHÖCK, M., A. A. AMR EL. SAYED und H.-P. HAMANN  
Zum Vorkommen verotoxinbildender *Escherichia coli* (VTEC) bei der Mastitis des Rindes  
Milchwissenschaft 53, 307 - 309 (1998)
- ZSCHÖCK, M., H. P. HAMANN, B. KLOPPERT und W. WOLTER  
Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* in faeces of healthy dairy cows, sheep and goats: prevalence and virulence properties  
Lett. Appl. Microbiol. 31, 203 - 208 (2000)

ZWEIFEL, C., J. E. BLANCO, M. BLANCO, J. BLANCO und R. STEPHAN  
Serotypes and virulence genes of ovine non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Switzerland  
Int. J. Food Microbiol. 95, 19 - 27 (2004)

## Rechtsvorschriften und Normen

AMTLICHE SAMMLUNG VON UNTERSUCHUNGSVERFAHREN NACH § 35 LMBG  
Untersuchung von Lebensmitteln - Bestimmung von *Escherichia coli* in Fleisch und Fleischerzeugnissen - Fluoreszenzoptisches Koloniezählverfahren unter Verwendung von Membranfiltern - Spatelverfahren (Referenzverfahren)  
L 06.00-36 (1996)

AMTLICHE SAMMLUNG VON UNTERSUCHUNGSVERFAHREN NACH § 35 LMBG  
Untersuchung von Lebensmitteln - Horizontales Verfahren für den Nachweis von *Escherichia coli* O157 in Lebensmitteln  
L 00.00-68 (2002a)

AMTLICHE SAMMLUNG VON UNTERSUCHUNGSVERFAHREN NACH § 35 LMBG  
Untersuchung von Lebensmitteln - Nachweis, Isolierung und Charakterisierung Verotoxin-bildender *Escherichia coli* (VTEC) in Hackfleisch mittels PCR und DNA-Hybridisierungstechnik  
L 07.18-1 (2002b)

AMTLICHE SAMMLUNG VON UNTERSUCHUNGSVERFAHREN NACH § 35 LMBG  
Untersuchung von Lebensmitteln - Nachweis von *Escherichia coli* O157 in Fleisch und Fleischerzeugnissen  
L 06.00-44 (2004a)

AMTLICHE SAMMLUNG VON UNTERSUCHUNGSVERFAHREN NACH § 35 LMBG  
Untersuchung von Lebensmitteln - Nachweis von *Escherichia coli* O157 in Fleischerzeugnissen  
L 07.00-54 (2004b)

AMTLICHE SAMMLUNG VON UNTERSUCHUNGSVERFAHREN NACH § 35 LMBG  
Untersuchung von Lebensmitteln - Nachweis von *Escherichia coli* O157 in Wurstwaren  
L 08.00-47 (2004c)

ANONYMOUS  
Gesetz zur Verhütung und Bekämpfung von Infektionskrankheiten beim Menschen (Infektionsschutzgesetz - IfSG), zuletzt geändert am 06.08.2002  
Bundesgesetzbl. Teil I, 1045 (2000a)

ANONYMOUS  
Verordnung über Hygiene- und Qualitätsanforderungen an Milch und Erzeugnisse auf Milchbasis (Milchverordnung), zuletzt geändert am 09.11.2004  
Bundesgesetzbl. Teil I, 1178 (2000b)

## ANONYMOUS

Verordnung über die hygienischen Anforderungen und amtlichen Untersuchungen beim Verkehr mit Fleisch (Fleischhygiene-Verordnung - FIHV), zuletzt geändert am 09.11.2004  
Bundesgesetzbl. Teil I, 1366 (2001a)

## ANONYMOUS

Verordnung über die Qualität von Wasser für den menschlichen Gebrauch  
(Trinkwasserverordnung - TrinkwV)  
Bundesgesetzbl. Teil I, 959 (2001b)

## ANONYMOUS

Verordnung zur Änderung tierseuchen- und lebensmittelrechtlicher Vorschriften zur Überwachung von Zoonosen und Zoonoseerregern  
Bundesgesetzbl. Teil I, 2791 (2004c)

## DIN (Deutsches Institut für Normung)

Untersuchung von Lebensmitteln und Futtermitteln - Horizontales Verfahren für den Nachweis von *Escherichia coli* O157  
DIN EN ISO 16654 (2001)

## DIN (Deutsches Institut für Normung)

Nachweis von *Escherichia coli* O157 in Fleisch und Fleischerzeugnissen  
DIN 10167 (2004a)

## DIN (Deutsches Institut für Normung)

Untersuchung von Lebensmitteln - Nachweis von Verotoxin-bildenden *Escherichia (E.) coli*-Stämmen (VTEC) in Lebensmitteln tierischer Herkunft  
DIN 10118 (2004b)

## 10 ANHANG

### 10.1 Puffer und Lösungen

#### 10.1.1 Puffer und Lösungen für die PCR

##### 10.1.1.1 dNTP-Mix (each 10 mM)

10 µl	Desoxy-CTP, Natriumsalzlösung PCR Grade (100 mM, Fa. Roche Applied Science, 1 934 520)
10 µl	Desoxy-GTP, Natriumsalzlösung PCR Grade (100 mM, Fa. Roche Applied Science, 1 934 538)
10 µl	Desoxy-TTP, Natriumsalzlösung PCR Grade (100 mM, Fa. Roche Applied Science, 1 934 546)
10 µl	Desoxy-ATP, Natriumsalzlösung PCR Grade (100 mM, Fa. Roche Applied Science, 1 934 520)
60 µl	Aqua bidest.

##### 10.1.1.2 TBE-Puffer

###### 10 x TBE-Puffer

0,5 M	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan (Fa. Roth, 5429.3)
0,5 M	Borat (Fa. Merck, 1.00165.1000)
0,01 M	EDTA (Titriplex II) (Fa. Merck, 1.08417)

Die Einwaage wird zunächst in 800 ml Aqua bidest. unter Rühren (Magnetrührer RCT B, Fa. Jahnke & Kunkel, IKA Labortechnik, 823484) für ca. 30 min aufgelöst. Nach vollständiger Auflösung wird mit Aqua bidest. auf 1 l aufgefüllt.

###### 1 x TBE-Puffer

10 x TBE-Puffer wird im Verhältnis 1:10 mit Aqua bidest. verdünnt.

##### 10.1.1.3 Gel-Loading-Buffer

###### 15 %ige Ficoll-Lösung

1,5 g	Ficoll (Fa. Sigma, Type 70, F-2878)
10 ml	Aqua bidest.

###### 5 %ige Bromphenolblau-Lösung

50 mg	Bromphenolblau (Fa. Merck, 8122)
1 ml	Aqua bidest.

**Stamm-Lösung (Gel-Loading-Buffer)**

10 ml 15 %ige Ficoll-Lösung

0,25 ml 5 %ige Bromphenolblau-Lösung

**Gebrauchslösung**

Mischung von Stamm-Lösung und Amplifikat im Verhältnis 1:4

**10.1.1.4 Ethidiumbromid-Färbebad****Ethidiumbromid-Stammlösung**

0,1 g Ethidiumbromid (Fa. Merck, 1.11608.0030)

10 ml Aqua bidest.

**Ethidiumbromid-Färbebad**

50 µl Ethidiumbromid-Stammlösung

1,5 l Aqua dest.

**10.1.2 Puffer und Lösungen für die PFGE****10.1.2.1 TE-Puffer**

10 mM Tris-(hydroxymethyl)aminomethan (Fa. Roth, 5429.3)

1 mM EDTA (TitriplexIII) (Fa. Merck, 112029)

Die Reagenzien werden in Aqua bidest. gelöst und der pH-Wert auf 7,6 eingestellt.

**10.1.2.2 Lysispuffer**

1 M NaCl (Fa. Merck, 1.06404.5000)

6 mM Tris-(hydroxymethyl)aminomethan (Fa. Roth, 5429.3)

100 mM EDTA (Titriplex III) (Fa. Merck, 112029)

0,5 % Brij (Polyoxyethylenlaurylether) (Fa. Merck, 801962)

0,5 % Laurylsarkosin (Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, L5777)

0,2 % Desoxycholsäure-Natriumsalz (Fa Roth, 3484.1)

Zunächst wird EDTA in Aqua bidest. bei einem pH-Wert von 8,0 auf einem Magnetrührer (RCT B, Fa. Jahnke & Kunkel, IKA Labortechnik, 823484) in Lösung gebracht. Nach Zugabe aller Reagenzien wird der pH-Wert auf 7,6 eingestellt.

**10.1.2.3 Phenylmethylsulfonylfluorid-Lösung**

100 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) (Fa. Sigma, P 7626)

Die Lösung erfolgt in Isopropanol (Fa. Merck, 9634).

**10.1.2.4 0,5 x TBE-Puffer**

10 x TBE-Puffer (siehe Punkt 10.1.1.1) wird im Verhältnis 1:20 mit Aqua bidest. verdünnt.

## 10.2 *E. coli* O157-Nachweis

**Tabelle 45:** *E. coli* O157-Nachweis aus Pferdekotproben der ersten Versuchsphase (n = 51) mittels Direktausstrich und unterschiedlicher Anreicherungsverfahren, Angaben zu den beprobten Tieren sowie biochemische Eigenschaften der gewonnenen Isolate

Proben-Nr.	Tiere			Geschlecht	<i>E. coli</i> O157-Isolate							
	Ort <sup>1)</sup>	Rasse <sup>2)</sup>	Alter (Jahre)		Anreicherung <sup>3)</sup>	Gesamtzahl	biochemische Eigenschaften <sup>4)</sup>					
				ohne IMS/AR	GN	mTSB	S <sup>+</sup>	S <sup>-</sup>	I <sup>+</sup>	I <sup>-</sup>		
1	Klinik (MGVK)	Wblt.	20	Wallach	1	0	1	1	1	2	0	
2	Klinik (MGVK)	Traber	10	Wallach	0	0	1	1	0	1	0	
3	Klinik (MGVK)	Wblt.	13	Stute	0	0	0	0	0	0	0	
4	Klinik (MGVK)	Wblt.	16	Wallach	0	0	0	0	0	0	0	
5	Klinik (MGVK)	Araber	6	Stute	0	1	0	1	0	1	0	
6	Klinik (MGVK)	Wblt.	4	Wallach	0	4	4	8	0	8	0	
7	Klinik (MGVK)	Traber	10	Wallach	0	0	0	0	0	0	0	
8	Klinik (MGVK)	Isländer	9	Wallach	0	0	0	0	0	0	0	
9	Klinik (MGVK)	Pony	15	Stute	0	0	1	1	0	1	0	
10	Klinik (MGVK)	k. A.	3	Stute	0	10	10	20	18	2	13	7
11	Klinik (MGVK)	Haflinger-Mix	30	Wallach	0	3	5	8	6	2	8	0
12	Klinik (MGVK)	Wblt.	7	Stute	0	0	2	2	2	0	1	1
13	Klinik (MGVK)	Wblt.	5	Stute	0	1	5	6	6	0	6	0
14	Klinik (MGVK)	Isländer	16	Stute	0	12	12	24	11	13	24	0

<sup>1)</sup> MGVK: Medizinische und Gerichtliche Veterinärklinik, Justus-Liebig-Universität Gießen

<sup>2)</sup> Wblt.: Warmblut; k. A.: keine Angabe

<sup>3)</sup> ohne IMS/AR: Direktausstrich ohne immunomagnetische Separation und Anreicherung; GN: gram negative broth;

mTSB: modifizierte Trypton-Soja-Bouillon

<sup>4)</sup> S<sup>+</sup>/S<sup>-</sup>: Sorbit-positiv/-negativ; I<sup>+</sup>/I<sup>-</sup>: Indol-positiv/-negativ

Fortsetzung Tabelle 45: *E. coli* O157-Nachweis aus Pferdekotproben der ersten Versuchsphase (n = 51) mittels Direktausstrich und unterschiedlicher Anreicherungsverfahren, Angaben zu den beprobten Tieren sowie biochemische Eigenschaften der gewonnenen Isolate

Proben-Nr.	Tiere			<i>E. coli</i> O157-Isolate				biochemische Eigenschaften <sup>5)</sup>				
	Ort <sup>1)</sup>	Rasse <sup>2)</sup>	Alter <sup>3)</sup> (Jahre)	Geschlecht	Anreicherung <sup>4)</sup> ohne IMS/AR	GN	mTSB	Gesamtzahl	S <sup>+</sup>	S <sup>-</sup>	I <sup>+</sup>	I <sup>-</sup>
15	Klinik (MGVK)	Isländer	9	Wallach	0	1	1	2	0	2	0	0
16	Klinik (MGVK)	Appaloosa	10	Wallach	0	0	0	0	0	0	0	0
17	Schlachthof	Wblt.	15	Wallach	0	5	4	9	0	0	9	0
18	Schlachthof	Haflinger	2	Stute	0	0	0	0	0	0	0	0
19	Schlachthof	Wblt.	18	Stute	0	0	1	1	1	0	1	0
20	Schlachthof	Kaltblt.	14	Stute	0	5	7	12	0	0	6	6
21	Schlachthof	Pony	20	Stute	0	0	0	0	0	0	0	0
22	Schlachthof	Wblt.	2	Stute	0	0	0	0	0	0	0	0
23	Klinik (CVK)	Dt. Reitpony	19	Wallach	0	0	0	0	0	0	0	0
24	Klinik (CVK)	Wblt.	k. A.	Wallach	0	0	7	7	0	7	7	0
25	Klinik (CVK)	Wblt.	k. a.	Wallach	0	2	5	7	2	5	7	0
26	Klinik (CVK)	Wblt.	15	Hengst	0	2	5	7	4	3	7	0
27	Klinik (CVK)	Wblt.	10	Stute	0	7	4	11	5	6	11	0
28	Klinik (CVK)	Wblt.	10	Stute	0	1	0	1	0	1	1	0

<sup>1)</sup> MGVK: Medizinische und Gerichtliche Veterinärklinik; CVK: Chirurgische Veterinärklinik; beide Justus-Liebig-Universität Gießen

<sup>2)</sup> Wblt.: Warmblut; Kaltblt.: Kaltblut; Dt. Reitpony: Deutsches Reitpony

<sup>3)</sup> k. A.: keine Angabe

<sup>4)</sup> ohne IMS/AR: Direktausstrich ohne immunomagnetische Separation und Anreicherung; GN: gram negative broth; mTSB: modifizierte Trypton-Soja-Bouillon

<sup>5)</sup> S<sup>+</sup>/S<sup>-</sup>: Sorbit-positiv/-negativ; I<sup>+</sup>/I<sup>-</sup>: Indol-positiv/-negativ

**Fortsetzung Tabelle 45:** *E. coli* O157-Nachweis aus Pferdekotproben der ersten Versuchsphase (n = 51) mittels Direktausstrich und unterschiedlicher Anreicherungsverfahren, Angaben zu den beprobten Tieren sowie biochemische Eigenschaften der gewonnenen Isolate

Proben-Nr.	Tiere			Geschlecht	<i>E. coli</i> O157-Isolate							
	Ort <sup>1)</sup>	Rasse <sup>2)</sup>	Alter <sup>3)</sup> (Jahre)		Anreicherung <sup>4)</sup>	Gesamtzahl	biochemische Eigenschaften <sup>5)</sup>					
					ohne IMS/AR	GN	mTSB		S <sup>+</sup>	S <sup>-</sup>	I <sup>+</sup>	I <sup>-</sup>
29	Schlachthof	Haflinger	23	Stute	0	0	0	0	0	0	0	0
30	Schlachthof	Wblt.	16	Wallach	0	0	0	0	0	0	0	0
31	Schlachthof	Wblt.	30	Stute	0	0	0	0	0	0	0	0
32	Schlachthof	Pony	30	Stute	0	0	0	0	0	0	0	0
33	Schlachthof	Haflinger	20	Stute	0	8	7	15	14	1	15	0
34	Klinik (CVK)	Wblt.	10	Stute	0	10	4	14	6	8	14	0
35	Klinik (CVK)	Wblt.	10	Stute	0	2	3	5	0	5	5	0
36	Klinik (CVK)	Wblt.	1/4	Stute	0	1	5	6	6	0	6	0
37	Klinik (CVK)	Wblt.	8	Stute	0	1	1	2	2	0	2	0
38	Klinik (CVK)	Wblt.	k. A.	Wallach	0	0	0	0	0	0	0	0
39	Klinik (CVK)	Wblt.	4	Wallach	0	3	1	4	4	0	3	1
40	Klinik (CVK)	Wblt.	5	Wallach	0	2	2	4	3	1	4	0
41	Klinik (CVK)	Wblt.	2	Stute	0	0	0	0	0	0	0	0
42	Reitstall (Rh.-Pf.)	Wblt.	15	Wallach	0	4	2	6	6	0	6	0

<sup>1)</sup> CVK: Chirurgische Veterinärklinik, Justus-Liebig-Universität Gießen; Rh.-Pf.: Rheinland-Pfalz

<sup>2)</sup> Wblt.: Warmblut

<sup>3)</sup> k. A.: keine Angabe

<sup>4)</sup> ohne IMS/AR: Direktausstrich ohne immunomagnetische Separation und Anreicherung; GN: gram negative broth; mTSB: modifizierte Trypton-Soja-Bouillon

<sup>5)</sup> S<sup>+</sup>/S<sup>-</sup>: Sorbit-positiv/-negativ; I<sup>+</sup>/I<sup>-</sup>: Indol-positiv/-negativ

**Fortsetzung Tabelle 45:** *E. coli* O157-Nachweis aus Pferdekotproben der ersten Versuchsphase (n = 51) mittels Direktausstrich und unterschiedlicher Anreicherungsverfahren, Angaben zu den beprobten Tieren sowie biochemische Eigenschaften der gewonnenen Isolate

Proben-Nr.	Tiere			<i>E. coli</i> O157-Isolate							
	Ort <sup>1)</sup>	Rasse <sup>2)</sup>	Alter <sup>3)</sup> (Jahre)	Geschlecht	Anreicherung <sup>4)</sup>	Gesamtzahl	biochemische Eigenschaften <sup>5)</sup>				
					ohne IMS/AR	GN	mTSB	S <sup>+</sup>	S <sup>-</sup>	I <sup>+</sup>	I <sup>-</sup>
43	Reitstall (Rh.-Pf.)	Wblt.	11	Stute	0	0	0	0	0	0	0
44	Reitstall (Rh.-Pf.)	Wblt.	k. A.	Stute	0	3	2	5	0	5	0
45	Reitstall (Rh.-Pf.)	Wblt.	k. A.	Stute	0	3	4	7	0	7	0
46	Reitstall (Rh.-Pf.)	Wblt.	8	Stute	0	2	1	3	0	3	0
47	Reitstall (Rh.-Pf.)	Wblt.	22	Wallach	0	7	2	9	0	9	0
48	Reitstall (Rh.-Pf.)	Wblt.	11	Wallach	0	3	1	4	0	4	0
49	Reitstall (Rh.-Pf.)	Wblt.	k. A.	Wallach	0	0	0	0	0	0	0
50	Reitstall (Rh.-Pf.)	Norweger	5	Wallach	0	4	5	9	4	5	9
51	Reitstall (Rh.-Pf.)	Wblt.	k. A.	Wallach	0	3	2	5	0	5	0

<sup>1)</sup> Rh.-Pf.: Rheinland-Pfalz

<sup>2)</sup> Wblt.: Warmblut

<sup>3)</sup> k. A.: keine Angabe

<sup>4)</sup> ohne IMS/AR: Direktausstrich ohne immunomagnetische Separation und Anreicherung; GN: gram negative broth;

mTSB: modifizierte Trypton-Soja-Bouillon

<sup>5)</sup> S<sup>+</sup>/S<sup>-</sup>: Sorbit-positiv/-negativ; I<sup>+</sup>/I<sup>-</sup>: Indol-positiv/-negativ

**Tabelle 46:** *E. coli* O157-Nachweis aus Pferdekotproben der zweiten Versuchsphase (n = 49), Angaben zu den beprobten Tieren sowie biochemische Eigenschaften der gewonnenen Isolate

Proben-Nr.	Tiere				<i>E. coli</i> O157-Isolate <sup>4)</sup>				
	Ort <sup>1)</sup>	Rasse <sup>2)</sup>	Alter <sup>3)</sup> (Jahre)	Geschlecht	Gesamt-zahl	S <sup>+</sup>	S <sup>-</sup>	I <sup>+</sup>	I <sup>-</sup>
52	Klinik (CVK)	Wblt.	12	Stute	5	1	4	4	1
53	Klinik (CVK)	Shetland-Pony	4	Stute	0	0	0	0	0
54	Klinik (CVK)	Wblt.	3	Hengst	0	0	0	0	0
55	Klinik (CVK)	Wblt.	9	Stute	0	0	0	0	0
56	Klinik (CVK)	Wblt.	2	Stute	3	1	2	3	0
57	Klinik (CVK)	Wblt.	3	Wallach	1	0	1	1	0
58	Klinik (CVK)	Dt. Reitpony	6	Wallach	0	0	0	0	0
59	Klinik (CVK)	Araber	3	Wallach	1	0	1	1	0
60	Klinik (CVK)	Araber-Mix	8	Wallach	4	0	4	4	0
61	Klinik (CVK)	Vollblut	6	Stute	4	0	4	4	0
62	Klinik (CVK)	Thüringer Kaltblt.	5	Stute	6	0	6	6	0
63	Schlachthof	Kaltblt.	4	Wallach	7	2	5	7	0
64	Schlachthof	Wblt.	18	Stute	0	0	0	0	0
65	Schlachthof	Haflinger-Mix	14	Stute	5	5	0	3	2
66	Schlachthof	Haflinger	15	Stute	0	0	0	0	0
67	Schlachthof	Kaltblt.	10	Stute	0	0	0	0	0
68	Schlachthof	Half-Point	7	Wallach	8	2	6	8	0
69	Schlachthof	Wblt.	7	Wallach	2	2	0	2	0
70	Schlachthof	Dt. Reitpony	11	Wallach	0	0	0	0	0
71	Schlachthof	Pony	18	Stute	1	1	0	0	1
72	Klinik (CVK)	Wblt.	4	Wallach	2	1	1	2	0
73	Klinik (CVK)	Wblt.	15	Stute	0	0	0	0	0
74	Klinik (CVK)	Wblt.	8	Hengst	2	2	0	2	0
75	Klinik (CVK)	Wblt.	20	Stute	1	0	1	1	0
76	Klinik (CVK)	Wblt.	k. A.	Stute	1	0	1	1	0
77	Reitstall (Hessen)	Wblt.	8	Wallach	0	0	0	0	0

<sup>1)</sup> CVK: Chirurgische Veterinärklinik, Justus-Liebig-Universität Gießen

<sup>2)</sup> Wblt.: Warmblut; Dt. Reitpony: Deutsches Reitpony; Kaltblt.: Kaltblut

<sup>3)</sup> k. A.: keine Angabe

<sup>4)</sup> S<sup>+</sup>/S<sup>-</sup>: Sorbit-positiv/-negativ; I<sup>+</sup>/I<sup>-</sup>: Indol-positiv/-negativ

Fortsetzung Tabelle 46: *E. coli* O157-Nachweis aus Pferdekotproben der zweiten Versuchsphase (n = 49), Angaben zu den beprobten Tieren sowie biochemische Eigenschaften der gewonnenen Isolate

Proben-Nr.	Tiere				<i>E. coli</i> O157-Isolate <sup>4)</sup>				
	Ort <sup>1)</sup>	Rasse <sup>2) 3)</sup>	Alter <sup>3)</sup> (Jahre)	Geschlecht <sup>3)</sup>	Gesamt-zahl	S <sup>+</sup>	S <sup>-</sup>	I <sup>+</sup>	I <sup>-</sup>
78	Reitstall (Hessen)	Quarter-Horse	7	Stute	0	0	0	0	0
79	Reitstall (Hessen)	Wblt.	16	Wallach	0	0	0	0	0
80	Reitstall (Hessen)	Wblt.	8	Stute	2	2	0	1	1
81	Reitstall (Hessen)	Wblt.	17	Stute	1	1	0	1	0
82	Reitstall (Hessen)	Wblt.	5	Stute	3	3	0	3	0
83	Reitstall (Hessen)	Wblt.	12	Wallach	0	0	0	0	0
84	Reitstall (Hessen)	Connemara x Vollblt.	13	Stute	0	0	0	0	0
85	Reitstall (Hessen)	Wblt.	15	Wallach	0	0	0	0	0
86	Reitstall (Hessen)	Wblt.	10	k. A.	0	0	0	0	0
87	Reitstall (Hessen)	Wblt.	17	Wallach	0	0	0	0	0
88	Schlachthof	Wblt.	17	Stute	1	0	1	1	0
89	Schlachthof	Wblt.	13	Stute	0	0	0	0	0
90	Schlachthof	Wblt.	14	Stute	4	2	2	3	1
91	Schlachthof	Wblt.	16	Stute	2	0	2	2	0
92	Schlachthof	Wblt.	24	Wallach	0	0	0	0	0
93	Schlachthof	Pony	20	Stute	0	0	0	0	0
94	Schlachthof	Norweger	20	Stute	7	0	7	7	0
95	Schlachthof	Wblt.	7	Wallach	13	5	8	11	2
96	Schlachthof	Fjordpferd	26	Stute	0	0	0	0	0
97	Schlachthof	Wblt.	20	Stute	4	2	2	4	0
98	Schlachthof	Wblt.	13	Wallach	5	2	3	5	0
99	Schlachthof	Wblt.	8	Stute	6	4	2	5	1
100	Klinik (MGVK)	k. A.	k. A.	Stute	0	0	0	0	0

<sup>1)</sup> MGVK: Medizinische und Gerichtliche Veterinärklinik, Justus-Liebig-Universität Gießen

<sup>2)</sup> Wblt.: Warmblut; Vollblt.: Vollblut

<sup>3)</sup> k. A.: keine Angabe

<sup>4)</sup> S<sup>+</sup>/S<sup>-</sup>: Sorbit-positiv/-negativ; I<sup>+</sup>/I<sup>-</sup>: Indol-positiv/-negativ

## Danksagung

Zum Abschluß möchte ich allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, meinen herzlichen Dank aussprechen.

Herrn Prof. Dr. M. Bülte gilt mein besonderer Dank für die Überlassung des Themas, für die vielen Stunden seiner Zeit, die er mir bei der Betreuung dieser Arbeit gewidmet hat, für die jederzeit unverzüglich gewährte Unterstützung sowie für die gute Förderung.

Frau Dr. Claudia Quintero Botero danke ich sehr herzlich für die Unterstützung bei der Durchführung der Pulsfeldgelelektrophorese und wünsche ihr und ihrer Familie alles Gute für die Zukunft.

Weiterhin möchte ich mich bei allen jetzigen und ehemaligen Kolleginnen und Kollegen des Institutes für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde bedanken, die mir sowohl durch Hilfestellung im Labor und am Schreibtisch, als auch durch die angenehme Arbeitsatmosphäre sehr geholfen haben. Insbesondere danke ich Frau Angelika Stahl, Frau Cornelia Dürschmidt und Frau Claudia Walter für die Einarbeitung in die Untersuchungstechniken sowie Frau Brigitte Marx für die Vermittlung von Probanden.

Für die Bereitstellung von Untersuchungsmaterial sei Herrn Prof. Dr. H. Sasse und Herrn Prof. Dr. L.-F. Litzke mit ihren Mitarbeitern ebenso gedankt wie den Mitarbeitern des Schlachthofes Gießen, Herrn Harald Simon sowie den beteiligten Pferdebesitzern.

Herrn Prof. Dr. H. Karch danke ich für die Überlassung der Referenzstämme.

Bei meiner Familie und meinen Freunden möchte ich mich herzlich für ihr Verständnis bedanken, daß sie insbesondere in der Schlußphase dieser Arbeit bei vielen Gelegenheiten auf mich verzichten mußten.

Dominik danke ich sehr herzlich für das unermüdliche Korrekturlesen, für die Hilfestellung am Computer und für die Geduld, die er für mich in den stressigen Phasen aufgebracht hat.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern, deren Unterstützung mir die Anfertigung dieser Arbeit - nicht nur in finanzieller Hinsicht - erst ermöglicht hat.

édition scientifique  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
GLEIBERGER WEG 4  
D-35435 WETTENBERG

Tel: +49-(0)6406-4413 Fax: -72757  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN 3-89687-033-5

