

Untersuchungen zum Vorkommen von Verotoxin-bildenden *Escherichia coli* (VTEC) bei Rehwild in Hessen



Andrea Christine Bartels

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Bibliografische Informationen der Deutschen Bibliothek

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der
Deutschen Nationalbibliografie;
Detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

1. Auflage 2014

© 2014 by Verlag: **Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH**,
Gießen
Printed in Germany

ISBN 978-3-86345-204-9

Verlag: DVG Service GmbH
Friedrichstraße 17
35392 Gießen
0641/24466
info@dvf.de
www.dvf.de

Aus dem Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Professur für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde
Betreuer: Prof. Dr. M. Bülte

**Untersuchungen zum Vorkommen
von Verotoxin-bildenden *Escherichia coli* (VTEC)
bei Rehwild in Hessen**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

ANDREA CHRISTINE BARTELS
Dipl.-Biol. und Tierärztin aus Offenbach am Main

Gießen 2013

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

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer

Gutachter: Prof. Dr. Michael Bülte
Prof. Dr. Christa Ewers

Tag der Disputation: 19.02.2014

Die Dissertation wurde durch das Hessische Ministerium für Umwelt, Energie, Landwirtschaft und Verbraucherschutz gefördert (Referenznummer: 895 1400 10 62 18 301).

Für meine Familie

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Buchbeitrag

BARTELS A. AND M. BÜLTE (2011)

Verocytotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) in wild ruminants in Germany. In: Game meat hygiene in focus. Microbiology, epidemiology, risk analysis and quality assurance. Edited by: Paulsen P, Bauer A, Vodnansky M, Winkelmayr R, Smulders FJM. Wageningen Academic Publishers. The Netherlands, 2011.

Vortrag

BARTELS, A. UND M. BÜLTE (2011)

Untersuchungen zum Vorkommen von Verotoxin-bildenden *Escherichia coli* (VTEC) bei Rehwild in Hessen. 52. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG), 27. bis 30. September 2011, Garmisch-Partenkirchen.

Poster

BARTELS, A. UND M. BÜLTE (2012)

Untersuchungen zum Vorkommen von Verotoxin-bildenden *Escherichia coli* (VTEC) bei Rehwild in Hessen. 53. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG), 25. bis 28. September 2012, Garmisch-Partenkirchen.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Tabellenverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis und Sonderzeichen	VIII
1. Einleitung	1
2. Literaturübersicht	2
2.1 Das Rehwild	2
2.1.1 Verbreitung und Habitat	2
2.1.2 Aktionsraum und Sozialverhalten	3
2.1.3 Rehwild als potentieller Überträger von VTEC in der Gehegehaltung	4
2.1.4 Jagd und Verzehr	5
2.2 Verotoxin-bildende <i>Escherichia coli</i> (VTEC)	8
2.2.1 Eigenschaften von <i>E. coli</i>	8
2.2.2 Verotoxin	10
2.2.3 Weitere Virulenzgene	21
2.2.4 Serovare	23
2.2.4.1 Serovare beim Menschen	24
2.2.4.2 Serovare bei den Hauswiederkäuern	25
2.2.5 Nachweismethoden	30
2.3 Reservoir für VTEC	31
2.3.1 Landwirtschaftliche Nutztiere	31
2.3.2 Wildwiederkäuer	33
2.3.2.1 Eintrag von VTEC in Wildbret	37
2.3.2.1.1 Kontaminationswege: Jagdart, Zustand des Tieres vor und nach dem Schuss	37
2.3.2.1.2 Kontaminationsweg: Versorgen des Wildes	38
2.4 VTEC beim Menschen	39
2.5 Infektionswege	41
2.6 Rechtliche Grundlagen	44
2.6.1 Wildbrethygiene	44
2.6.2 Europäisches und nationales Recht beim Vorliegen des Zoonoseerregers VTEC	46

3.	Material und Methoden	50
3.1	Untersuchungsmaterial.....	50
3.1.1	Probenentnahme und -lagerung.....	50
3.1.2	Alters- und Geschlechtsbestimmung.....	50
3.1.3	Beprobungszeitraum und -orte	52
3.1.4	Saisonale Verteilung der Proben	57
3.2	Labormaterial	58
3.2.1	Referenz- und Kontrollstämme	58
3.2.2	Medien und Lösungen	59
3.2.3	Geräte und Labormaterialien.....	60
3.3	Methoden.....	64
3.3.1	Immunologischer Nachweis von Verotoxin-bildenden <i>E. coli</i>	64
3.3.1.1	Übersicht über den Versuchsaufbau.....	64
3.3.1.2	Anreicherungsverfahren.....	66
3.3.1.3	Immunologischer Nachweis mit dem NOVITEC® Verotoxin Test	66
3.3.1.4	Nachweis mit dem Duopath® Verotoxin-Test.....	67
3.3.2	Kulturelle Untersuchung der präsumtiven VTEC-Isolate	67
3.3.2.1	Spezies-Bestätigung	68
3.3.3	Molekularbiologische Untersuchung der VTEC-Isolate.....	70
3.3.3.1	Gewinnung und Aufbereitung der Proben-DNS	71
3.3.3.2	PCR-Ansatz.....	71
3.3.3.2.1	Darstellung der Amplifikate	72
3.3.3.3	Nachweis des Verotoxin-Gens <i>vtx</i> 1	72
3.3.3.4	Nachweis des Verotoxin-Gens <i>vtx</i> 2	73
3.3.3.4.1	Restriktionsverdau	74
3.3.3.5	Nachweis des Verotoxin-Gens <i>vtx</i> 2d	75
3.3.3.6	Nachweis des Verotoxin-Gens <i>vtx</i> 2d _{activatable}	76
3.3.3.6.1	DNS-Extraktion mit dem QIAquick Gel Extraction Kit	77
3.3.3.6.2	Datenauswertung	78
3.3.3.7	Nachweis des Verotoxin-Gens <i>vtx</i> 2e.....	78
3.3.3.8	Nachweis des <i>E. coli</i> attaching and effacing-Gen.....	79
3.3.4	Archivierung der VTEC-Isolate	80
3.3.5	Serotypisierung der VTEC-Isolate	80

3.3.6 Statistik.....	80
4. Ergebnisse	82
4.1 Mikrobiologischer und molekularbiologischer Nachweis von VTEC bei Rehen .82	82
4.1.1 Prävalenzen	82
4.1.1.1 Prävalenzdaten auf Ebene des Bundeslandes Hessen	82
4.1.1.2 Prävalenzdaten auf Ebene der Regierungsbezirke Darmstadt, Gießen und Kassel..	82
4.1.1.3 Prävalenzdaten auf Ebene der Landkreise	85
4.1.2 Vorkommen von VTEC in Abhängigkeit von der Altersstufe und des Geschlechts.....	87
4.1.3 Vorkommen von VTEC in Abhängigkeit des Probennahmejahres	88
4.1.4 Vorkommen von VTEC in Abhängigkeit von der Jahreszeit	89
4.1.5 Vorkommen von VTEC in Abhängigkeit von der Wald- bzw. landwirtschaftlich genutzten Fläche.....	90
4.1.6 Vorkommen von VTEC in Abhängigkeit von der Anzahl Tiere pro Hektar landwirtschaftliche Nutzfläche.....	90
4.1.7 Ergebnisse der Varianzanalyse.....	91
4.1.8 Untersuchung der VTEC-Isolate	92
4.1.8.1 Biochemische Eigenschaften	92
4.1.8.2 Verteilung der Virulenzgene	93
4.1.9 Ergebnisse der <i>vtx 2</i> _{activatable} PCR	99
4.1.9.1 Ergebnisse der Sequenzierung	104
4.2 Serotypisierung	109
4.3 Kultureller Nachweis von VTEC	111
4.3.1 Vergleich der eingesetzten Anreicherungsmedien der ersten Versuchsphase .	111
4.4 Nachweis von VTEC mit den immunologischen Testsystemen.....	111
4.4.1 Immunochromatographischer Duopath® Verotoxin-Test	111
4.4.1.1 Wachstum auf SMAC-Agar	112
4.4.1.3 Übereinstimmung der Ergebnisse für die beiden Verotoxine <i>vtx 1</i> und <i>vtx 2</i> im Duopath® Verotoxin Testsystem und der molekularbiologischen Untersuchung...	113
4.4.2 NOVITEC® Verotoxin-Test	115
4.4.3 Übereinstimmung der beiden Testsysteme	116
5. Diskussion.....	117
5.1 Prävalenzdaten	117
5.1.1 Prävalenzdaten für das Bundesland Hessen	117

5.1.2	Prävalenzdaten auf Ebene der Regierungsbezirke	123
5.1.3	Prävalenzdaten auf Ebene der Landkreise und der Einfluss der Anzahl Tiere pro Hektar landwirtschaftliche Nutzfläche	124
5.2	Alters- und Geschlechtsverteilung	130
5.3	Der Einfluss des Probennahmjahres	132
5.4	Der Einfluss der Jahreszeit	133
5.5	Charakterisierung der VTEC-Isolate	135
5.5.1	Biochemische Eigenschaften	135
5.5.2	Virulenzgenprofile	136
5.5.3	Serovare	141
5.6	Ist eine wechselseitige Übertragung von VTEC zwischen Rehwild und den Hauswiederkäuern Rind, Schaf und Ziege in Hessen denkbar?	143
5.7	Methodische Aspekte	144
5.7.1	Anreicherungsverfahren	144
5.7.2	Immunologische Testsysteme	144
6.	Schlussfolgerungen	149
7.	Zusammenfassung	150
8.	Summary	152
9.	Literaturverzeichnis	153
10.	Rechtsvorschriften und Normen	189
11.	Anhang	191
11.1	Reagenzien für die Mikrobiologie	191
11.1.1	Oxidase-Reagenz	191
11.2	Puffer und Lösungen für die PCR	191
11.2.1	TBE-Puffer	191
11.2.2	Gel-Loading-Buffer	191
11.2.3	Ethidiumbromid-Färbebad	192
11.3	Kenndaten zu den VTEC-ausscheidenden Rehen (n = 68)	193
11.4	Ergebnisse der immunologischen Untersuchungen der VTEC-ausscheidenden Rehe	196
11.5	Molekularbiologische und biochemische Ergebnisse der Einzelisolate	201
11.6	Rohdaten zur statistischen Berechnung	205
11.7	Sequenzen	207

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Zusammenstellung der Bezeichnungen der Prototypen für das vtx 1-Toxin und ehemalige Bezeichnungen für die Gene und/oder Toxine in Anlehnung an SCHEUTZ ET AL., 2012.	13
Tabelle 2:	Zusammenstellung der Bezeichnungen der Prototypen für das vtx 2-Toxin und ehemalige Bezeichnungen für die Gene und/oder Toxine in Anlehnung an SCHEUTZ ET AL., 2012.	14
Tabelle 3:	Übersicht über die Serotypen von VTEC, die bisher bei Wildwiederkäuern isoliert werden konnten.	27
Tabelle 4:	Übersicht über die Serotypen von VTEC, die bisher bei Rindern isoliert werden konnten.	28
Tabelle 5:	Übersicht über die Serotypen von VTEC, die bisher bei Schafen isoliert werden konnten.	29
Tabelle 6:	Übersicht über die Serotypen von VTEC, die bisher bei Ziegen isoliert werden konnten.	30
Tabelle 7:	Nachweis von Verotoxin-bildenden <i>E. coli</i> (VTEC) bei Wildwiederkäuern in Deutschland bzw. deutschsprachigen Raum.	36
Tabelle 8:	Übersicht über die Anzahl der untersuchten weiblichen und männlichen Rehe.	51
Tabelle 9:	Einteilung der untersuchten Rehe nach Geschlecht und Alter.	52
Tabelle 10:	Übersicht über die Anzahl der untersuchten Rehe für jedes Forstamt.	54
Tabelle 11:	Übersicht über die Revierförstereien der einzelnen Forstämter, in denen die Proben genommen wurden.	55
Tabelle 12:	Auflistung der neu zugeordneten Landkreise mit der Anzahl der beprobten Rehe.	56
Tabelle 13:	Übersicht über die saisonale Verteilung der Probennahme.	57
Tabelle 14:	Verwendete Referenz- und Kontrollstämme.	58
Tabelle 15:	Medien und Lösungen.	59
Tabelle 16:	Geräte und Labormaterialien.	60
Tabelle 17:	Verwendetes Material.	62
Tabelle 18:	Übersicht über die verwendeten Primersysteme.	70
Tabelle 19:	Prävalenzdaten in den hessischen Regierungsbezirken.	83
Tabelle 20:	Prävalenzdaten in den Landkreisen.	85
Tabelle 21:	Anzahl positiver und negativer Tiere bei den beiden Geschlechtern.	88
Tabelle 22:	Anzahl positiver und negativer Tiere hinsichtlich Geschlecht und Alter.	88
Tabelle 23:	Vorkommen von VTEC in Abhängigkeit des Probennahmejahres.	88
Tabelle 24:	Übersicht über die saisonale Verteilung VTEC-positiver und -negativer Proben für die Klassen 1, 5, 10, 11 und 12.	89
Tabelle 25:	Verhältnis der Anzahl an Rindern, Schafen und Ziegen pro Hektar landwirtschaftliche Nutzfläche für das Vorkommen von VTEC bei Rehwild.	91
Tabelle 26:	Ergebnisse der Varianzanalyse.	92
Tabelle 27:	Phänotypische Eigenschaften der 79 VTEC-Isolate.	93
Tabelle 28:	Häufigkeit der VT 1-Subtypen sowie des <i>eae</i> - und Enterohämolysin-Gens bei VTEC-ausscheidenden Rehen.	94
Tabelle 29:	Häufigkeit der vtx 2-Virulenzgene bei VTEC-ausscheidenden Rehen.	94

Tabelle 30:	Genkombinationen bei den 79 VTEC-Isolaten.	96
Tabelle 31:	Änderungen der vtx 2d _{activatable} PCR in Anlehnung an ZHENG ET AL. (2008).	99
Tabelle 32:	Übersicht über die Virulenzprofile der einzelnen Serovare.	110
Tabelle 33:	Vergleichende Übersicht über die Ergebnisse des Duopath® Verotoxin-Tests und des molekularbiologischen Screenings mithilfe der MK-Primer.	112
Tabelle 34:	Koloniewachstum auf SMAC-Agar aus Kotproben, einschließlich Ergebnis im Duopath® Verotoxin-Test	113
Tabelle 35:	Übersicht über die Übereinstimmungen der Ergebnisse für das Verotoxin 1 im Duopath® Verotoxin-Test und in der molekularbiologischen Untersuchung	114
Tabelle 36:	Übersicht über die Übereinstimmungen der Ergebnisse für das Verotoxin 2 im Duopath® Verotoxin-Test und in der molekularbiologischen Untersuchung	114
Tabelle 37:	Vergleichende Übersicht über die Ergebnisse des NOVITEC® Verotoxin-Tests und des molekularbiologischen Screenings mithilfe der MK-Primer.	115
Tabelle 38:	Übersicht über die Virulenzprofile der zehn positiv getesteten Rehe.	116
Tabelle 39:	Übereinstimmungsmatrix der beiden Testsysteme	116
Tabelle 40:	Kenndaten zu den VTEC-ausscheidenden Rehen (n = 68) mit Angaben zu der Herkunft der Proben, dem genauen Beprobungszeitpunkt, dem Geschlecht und Alter der Rehe	193
Tabelle 41:	Ergebnisse der immunologischen Untersuchungen der VTEC-ausscheidenden Rehe (n = 68)	196
Tabelle 42:	Ergebnisse der eigenen molekularbiologischen und biochemischen Untersuchungen der Einzelisolate sowie der Untersuchungen aus den Referenzzentren	201
Tabelle 43:	Häufigkeit der untersuchten Virulenzgene in den untersuchten Landkreisen ..	204
Tabelle 44:	Auflistung der beteiligten Landkreise mit der Anzahl der beprobten Rehe	205
Tabelle 45:	Übersicht über die landwirtschaftliche Fläche sowie die Waldfläche der jeweiligen Landkreise	206
Tabelle 46:	Übersicht über die Tierzahlen der einzelnen Landkreise, die landwirtschaftliche Fläche und das Verhältnis Gesamt-Tierzahl zu landwirtschaftlicher Fläche für jeden Landkreis bzw. den entsprechenden Regierungsbezirk	206

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Übersicht über die Jahresstrecken des Rehwildes (erlegtes Wild + Fallwild) in Deutschland in den Jahren 1991 bis 2011.	7
Abbildung 2:	Übersicht über Meldewege auf bundeseinheitlicher und europäischer Ebene bei einem lebensmittelbedingten Ausbruch durch EHEC in Anlehnung an BfR (2013) und EFSA (2012).	49
Abbildung 3:	Kotprobenentnahme.	50
Abbildung 4:	Übersichtskarte der Hessischen Forstämter.	53
Abbildung 5:	Versuchsaufbau für den Nachweis von Verotoxin-bildenden <i>E. coli</i> (VTEC).	65
Abbildung 6:	Geographische Übersicht über die Prävalenzen in den Regierungsbezirken in Bezug zu der geographischen Verteilung der beprobten hessischen Forstämter.	84
Abbildung 7:	Geographische Übersicht über die Prävalenzen der beteiligten Landkreise.	86
Abbildung 8:	Übersicht über das Verhältnis positiver und negativer Rehe innerhalb einer Altersstufe.	87
Abbildung 9:	Saisonale Verteilung VTEC-positiver und –negativer Proben für die Klasseneinteilung Sommer und Winter.	90
Abbildung 10:	Sequenzunterschiede (grau hinterlegt) zwischen den Verotoxin-Subtypen VT 2d _{activatable} und VT 2g.	101
Abbildung 11:	Alignment der Sequenzierungsergebnisse der in der molekularbiologischen Untersuchung vtx 2d _{activatable} positiven Isolate.	106
Abbildung 12:	Alignment der abgeleiteten AS-Sequenzen des C-terminalen Ende der Subunit A sowie der Subunit B der analysierten vtx 2g-Sequenzen.	108
Abbildung 13:	Duopath [®] Verotoxin-Test.	199
Abbildung 14:	Duopath [®] Verotoxin-Test der Kotprobe Re 203.	200
Abbildung 15:	Duopath [®] Verotoxin-Test der Kotprobe Re 200.	200
Abbildung 16:	Duopath [®] Verotoxin-Test der Kotprobe Re 335.	200
Abbildung 17:	Duopath [®] Verotoxin-Test der Kotprobe Re 195.	200
Abbildung 18:	Sequenzunterschiede (grau hinterlegt) zwischen den Verotoxin-Subtypen VT 2b und VT 2d.	207
Abbildung 19:	Sequenzunterschiede (grau hinterlegt) zwischen den Verotoxin-Subtypen VT 2 klassisch und VT 2g.	208
Abbildung 20:	Alignment der Sequenzierungsergebnisse aller in der molekularbiologischen Untersuchung vtx 2d _{activatable} -positiven Isolate.	211
Abbildung 21:	Beispielhafte Darstellung eines Elektropherogramms der Probe Re 48.	215
Abbildung 22:	Alignment der abgeleiteten AS-Sequenzen des C-terminalen Ende der Subunit A sowie der Subunit B aller analysierten vtx 2g Sequenzen.	216

Abkürzungsverzeichnis und Sonderzeichen

®	geschütztes Warenzeichen
TM	geschütztes Warenzeichen (engl. trademark)
µl	<u>Mikro</u> liter
µM	<u>Mikro</u> molar
µm	<u>Mikro</u> meter
° C	Grad Celsius
%	Prozent
=	gleich
+	positiv, plus
-	negativ, minus
>	größer als
<	kleiner als
Σ	Summe
Ø	Durchschnitt
&	und
§	Paragraph
A	Alanin (Ein-Buchstaben-Code für AS); <u>A</u> denin
Acc. No.	<u>A</u> ccession <u>N</u> umber
AID	Land- und Hauswirtschaftlicher <u>A</u> uswertung- und <u>I</u> nformations <u>d</u> ienst
a. M.	<u>a</u> m <u>M</u> ain
Aqua bidest.	<u>A</u> qua <u>b</u> idestillata
Aqua dest.	<u>A</u> qua <u>d</u> estillata
AS	<u>A</u> minosäure
ATCC	<u>A</u> merican <u>T</u> ype <u>C</u> ulture <u>C</u> ollection, Manassas, USA
AVV	<u>A</u> llgemeine <u>V</u> erwaltungs <u>v</u> orschrift
B	Asparagin oder Asparaginsäure (Ein-Buchstaben-Code für AS)
bp	<u>B</u> asen <u>p</u> aar(e)
BELA	<u>B</u> undesweites System zur <u>E</u> rfassung von Daten zu <u>L</u> ebensmitteln, die an lebensmittelbedingten Krankheitsausbrüchen beteiligt sind
BfR	<u>B</u> undesinstitut für <u>R</u> isikobewertung, Berlin
BGBI	<u>B</u> undesgesetz <u>b</u> latt
BHI	Hirn-Herz-Bouillon (engl.: <u>b</u> rain- <u>h</u> eart- <u>i</u> nfusion broth)
BJG	<u>B</u> undesjagdgesetz
BMELV	<u>B</u> undes <u>m</u> inisterium für <u>E</u> rnährung, <u>L</u> andwirtschaft und <u>V</u> erbraucherschutz
BPW	<u>B</u> uffered <u>P</u> eptone <u>W</u> ater (Peptonwasser, gepuffert)
bzw.	<u>b</u> eziehungs <u>w</u> eise
C	Cystein (Ein-Buchstaben-Code für AS); <u>C</u> ytosin
ca.	circa
CDC	<u>C</u> enters for <u>D</u> isease <u>C</u> ontrol and Prevention
D	Asparaginsäure (Ein-Buchstaben-Code für AS)
DAEC	<u>D</u> iffus-adhärenente <u>E. coli</u>
DIN	<u>D</u> eutsches <u>I</u> nstitut für <u>N</u> ormung, Berlin

DJV	<u>D</u> eutscher <u>J</u> agdschutz <u>v</u> erband
DNS	<u>D</u> esoxyribo <u>n</u> ukleinsäure
dNTP	<u>D</u> esoxyribo <u>n</u> ukleosid <u>t</u> riphosphat
E	Glutaminsäure (Ein-Buchstaben-Code für AS)
eae-Gen	<i>E. coli</i> <u>a</u> ttaching and <u>e</u> ffacing-Gen
EAEC	<u>E</u> ntero <u>a</u> ggregative <i>E. coli</i>
<i>E. coli</i>	<i>E</i> scherichia <i>c</i> oli
ECD-Agar	<i>E</i> scherichia <i>c</i> oli- <u>D</u> irekt-Agar
ECDC	<u>E</u> uropean <u>C</u> entre for <u>D</u> isease Prevention and <u>C</u> ontrol
EDTA	<u>E</u> thylendiamintetra <u>a</u> cetate
EG	<u>E</u> uropäische <u>G</u> emeinschaft
EFSA	<u>E</u> uropean <u>F</u> ood <u>S</u> afety <u>A</u> uthority (Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit)
EHEC	<u>E</u> ntero <u>h</u> ämorrhagische <i>E</i> scherichia <i>c</i> oli
<i>e-hly</i>	EHEC-Enterohämolysin-Gen
EIA	<u>E</u> nzym <u>i</u> mmuno <u>a</u> ssay
EIEC	<u>E</u> ntero <u>i</u> nvasive <i>E. coli</i>
ELISA	<u>E</u> nzyme <u>L</u> inked Immuno <u>s</u> orbent <u>A</u> ssay
EN	<u>E</u> uropäische <u>N</u> orm
EPEC	<u>E</u> nteropathogene <i>E. coli</i>
Esp (<i>esp</i>)	<u>E</u> xtrazelluläre <u>S</u> erinprotease (kursiv: Genbezeichnung)
et al.	und andere (lateinisch: <u>e</u> t <u>a</u> lii (Maskulinum), <u>e</u> t <u>a</u> liae (Femininum), <u>e</u> t <u>a</u> lia (Neutrum))
etc.	und so weiter (lateinisch: <u>e</u> t <u>c</u> etera)
ETEC	<u>E</u> ntero <u>t</u> oxin-bildende <i>E. coli</i>
EU	<u>E</u> uropäische <u>U</u> nion
EWG	<u>E</u> uropäische <u>W</u> irtschaftsgemeinschaft
F	Phenylalanin (Ein-Buchstaben-Code für AS)
Fa.	<u>F</u> irma
FLI	<u>F</u> riedrich- <u>L</u> öffler- <u>I</u> nstitut
G	Glycin (Ein-Buchstaben-Code für AS); <u>G</u> uanin
g	<u>G</u> ramm
Gb ₃	<u>G</u> lobotri <u>s</u> ylceramid
Gb ₄	<u>G</u> lobotetra <u>s</u> ylceramid
GmbH	<u>G</u> esellschaft <u>m</u> it <u>b</u> eschränkter <u>H</u> aftung
GVBl	<u>G</u> esetz- und <u>V</u> erordnungs <u>b</u> latt
H	Histidin (Ein-Buchstaben-Code für AS)
h	Stunde(n)
H-Antigen	Geißel-Antigen (H: von Hauch)
ha	<u>H</u> ektar
HC	<u>H</u> ämorrhagische <u>C</u> olitis
HC-Agar	<u>H</u> emorrhagic <u>C</u> olitis-Agar nach SZABO
HNM	<u>H</u> <u>n</u> on- <u>m</u> otile (unbeweglich) = H ⁻
HNT	<u>H</u> <u>n</u> on- <u>t</u> ypeable (H-Antigen nicht typisierbar)
HUS	<u>H</u> ämolytisch- <u>u</u> rämisches <u>S</u> yndrom

I	Isoleucin (Ein-Buchstaben-Code für AS)
IfSG	<u>I</u> n <u>f</u> ektion <u>s</u> <u>s</u> chutz <u>g</u> esetz
K	Lysin (Ein-Buchstaben-Code für AS)
Kap.	<u>K</u> ap <u>i</u> tel
kb	<u>K</u> ilo <u>b</u> ase
KbE/g	<u>K</u> olonie- <u>b</u> ildende <u>E</u> inheiten pro <u>G</u> ramm
kDa	<u>K</u> ilo <u>d</u> alton
kg	<u>K</u> ilo <u>g</u> ramm
L	Leucin (Ein-Buchstaben-Code für AS)
LEE	<u>l</u> ocus of <u>e</u> nterocyte <u>e</u> ffacement
LFGB	<u>L</u> ebensmittel- und <u>F</u> uttermittelgesetz <u>b</u> uch
M	Methionin (Ein-Buchstaben-Code für AS)
mg	<u>M</u> illigramm
mind.	<u>m</u> in <u>d</u> estens
min.	<u>M</u> in <u>u</u> te
ml	<u>M</u> illi <u>l</u> iter
mM	<u>m</u> illi <u>m</u> olar
mTSB	<u>m</u> odifizierte <u>T</u> rypton- <u>S</u> oja- <u>B</u> ouillon
mTSB+N	<u>m</u> odifizierte <u>T</u> rypton- <u>S</u> oja- <u>B</u> ouillon mit <u>N</u> ovobiocin
n	Anzahl
N	Asparagin (Ein-Buchstaben-Code für AS)
NASPHV	<u>N</u> ational <u>A</u> ssociation of <u>S</u> tate <u>P</u> ublic <u>H</u> ealth <u>V</u> eterinarians
nm	<u>N</u> ano <u>m</u> eter
Nr.	<u>N</u> um <u>m</u> er
O-Antigen	somatisches Antigen
OD	<u>o</u> ptical <u>d</u> ensity
ONT	<u>O</u> <u>n</u> on-typeable (O-Antigen nicht typisierbar)
P	Prolin (Ein-Buchstaben-Code für AS)
p	probability
pas	Protein associated with <u>s</u> ecretion (Gen)
PC-Agar	<u>P</u> late- <u>C</u> ount-Agar
PCR	<u>P</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PEN	<u>P</u> athogenic <u>E</u> scherichia coli <u>N</u> etwork
pH	Stärke des Wasserstoffs (lateinisch.: potentia <u>h</u> ydrogenii)
Q	Glutamin (Ein-Buchstaben-Code für AS)
R	Arginin (Ein-Buchstaben-Code für AS)
RKI	<u>R</u> obert- <u>K</u> och- <u>I</u> nstitut, Berlin
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure (engl.: <u>r</u> ibon <u>u</u> cleic <u>a</u> cid)
RT	<u>R</u> aum <u>t</u> emperatur
S	Serin (Ein-Buchstaben-Code für AS)
s	Sekunden
s.	<u>s</u> iehe
Saa (saa)	<u>S</u> TEC <u>a</u> utoagglutination <u>a</u> dhesion (kursiv: Genbezeichnung)
sep	<u>S</u> ecretion of <u>E</u> . coli <u>p</u> roteins (Gen)
ser.	<u>S</u> erovar

SLT (<i>slt</i>)	<u>S</u> higa- <u>l</u> ike- <u>T</u> oxin (kursiv: Genbezeichnung)
SMAC-Agar	<u>S</u> orbit- <u>M</u> acConkey-Agar
sog.	<u>s</u> ogenannt
ST	<u>S</u> higa <u>t</u> oxin
t	<u>T</u> onne(n)
T	Threonin (Ein-Buchstaben-Code für AS); <u>T</u> hymine
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)
TTP	<u>T</u> hrombotisch-thrombozytopenische <u>P</u> urpura
U	<u>U</u> nit
u. a.	<u>u</u> nter <u>a</u> nderem
u. U.	<u>u</u> nter <u>U</u> mständen
Upm	<u>U</u> nits <u>p</u> er <u>m</u> inute
UV	<u>U</u> ltraviolett
V	Valin (Ein-Buchstaben-Code für AS); <u>V</u> olt
VO	<u>V</u> er <u>o</u> rdnung
VTEC	<u>V</u> erotoxin-bildende <u>E</u> scherichia <u>c</u> oli
VT (<i>vtx</i>)	<u>V</u> erotoxin (kursiv: Genbezeichnung)
W	Tryptophan (Ein-Buchstaben-Code für AS)
X	nicht bekannt (Ein-Buchstaben-Code für AS)
Y	Tyrosin (Ein-Buchstaben-Code für AS)
YOPIS	<u>y</u> oung, <u>o</u> ld, <u>p</u> regnant, <u>i</u> mmunocompromised <u>s</u> egments of the public
Z	Glutaminsäure oder Glutamin (Ein-Buchstaben-Code für AS)
z. B.	<u>z</u> um <u>B</u> eispiel

1. Einleitung

Verotoxin-bildende *Escherichia coli*-Stämme (VTEC) können beim Menschen schwerwiegende Erkrankungen verursachen. Insbesondere bei Kindern kann es bei einer Verkomplizierung eines zunächst blutigen Durchfalls zu einer Schädigung der Nieren mit Ausprägung eines hämolytisch-urämisches Syndroms (HUS) kommen. Solche Stämme werden als enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC) bezeichnet. Der Mensch kann sich über entsprechend kontaminierte Lebensmittel, aber auch durch den direkten Kontakt mit Tieren, die VTEC-Stämme ausscheiden, infizieren. Als eigentliches Reservoir solcher Stämme stehen landwirtschaftliche Nutztiere wie Rinder, Schafe und Ziegen im Mittelpunkt.

In den Jahren zwischen 2002 und 2006 wurden in Wildfleischproben am Referenzlabor für Epidemiologie der Zoonosen am Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) vermehrt VTEC nachgewiesen. Dabei lag der Anteil der kontaminierten Proben deutlich höher als bei Rindfleisch. Unter den Isolaten befanden sich auch bekannte EHEC-Serovare wie O26:H11, O128:H2 und O103:H2, die im Zusammenhang mit Erkrankungen des Menschen isoliert worden waren (BfR, 2007). Diese Untersuchung ebenso wie aktuelle Studien (LEHMANN ET AL., 2006; BfR, 2012; EGGERT ET AL., 2012; HOFER ET AL., 2012) zeigen, dass Wildwiederkäuer ein mögliches Reservoir hinsichtlich der Übertragung von VTEC auf Hauswiederkäuer und den Menschen darstellen können.

Insgesamt ist die Datenlage für eine Risiko-basierte Bewertung der Situation bei Wildtieren noch nicht ausreichend. In diesem Zusammenhang sollte in den eigenen Untersuchungen ein Beitrag zur Prävalenz von VTEC-Stämmen, unter Berücksichtigung darunter befindlicher potentieller virulenter Stammformen, bei Rehwild im Bundesland Hessen geleistet werden. Rehwild als einer der häufigsten Vertreter der Wildwiederkäuer stellt in Deutschland einen sehr hohen Anteil des Wildbretaufkommens. Zusätzlich gilt Rehwild aufgrund seines lockeren Bindegewebes als besonders „schussweich“ (DEUTZ, 2000) – bei Weichschüssen wird das Eindringen von Mikroorganismen in die Muskulatur erleichtert. Diese beiden Aspekte begründeten die Auswahl der Tierart Reh für die eigenen Untersuchungen.

Das vorrangige Ziel dieser Studie sollte einen Beitrag zu folgenden Fragestellungen liefern: Stellt Rehwild in Hessen ein ursprüngliches VTEC-Reservoir dar und gehören die beim Rehwild möglicherweise nachgewiesenen VTEC-Stämme Serovaren an, die schon mit Erkrankungen beim Menschen kausal in Verbindung gebracht werden konnten. Zusätzlich sollte der Zusammenhang der gegenseitigen horizontalen Infektion von Haus- und Wildwiederkäuern durch die Nutzung gleicher Weideflächen berücksichtigt werden.

2. Literaturübersicht

2.1 Das Rehwild

Das europäische Reh (*Capreolus capreolus*, Linné 1758) gehört innerhalb der Ordnung der Paarhufer (Artiodactyla) zu der Unterordnung der Wiederkäuer (Ruminantia). Innerhalb der Familie der Hirsche (*Cervidae*) ist das Reh der Unterfamilie der Trughirsche (*Odocoilinae*) zugeordnet. Neben dem europäischen Reh kommt Rehwild in mehreren Unterarten auch in Asien, Sibirien, in der Mongolei und in China vor (ANONYMOUS, 2013A).

2.1.1 Verbreitung und Habitat

Das Rehwild ist die kleinste und in Deutschland am häufigsten vorkommende Hirschart. Es besiedelt weite Teile Europas und Asiens und kommt in Europa von der Küste bis ins Hochgebirge, von Flussauen bis hin zu Bergwäldern, in Agrarsteppen und Parklandschaften vor. Optimale Lebensbedingungen findet Rehwild im Übergangsbereich zwischen Wald und Feld und damit in Landschaften, die durch den Wechsel zwischen Wald, Feld und Wiesen geprägt werden. Als Kulturfolger hat sich das Reh aber auch an offene Feldflure, menschliche Siedlungen sowie Parklandschaften angepasst (WÖLFEL, 2005; DJV, 2012A).

Hinsichtlich ihres Ernährungsverhaltens gehört das Rehwild zu den Konzentratselktierern. Im Vergleich zu den beiden anderen Ernährungstypen – den sog. Gras- und Raufutterfressern sowie den Mischäsern – weist der Magentrakt des Rehwildes ein geringeres Fassungsvermögen, weniger Unterteilungen und größere Öffnungen auf. Dies führt im Gegensatz zu den anderen Typen von Wiederkäuern zu schnelleren Passageraten des Futterbreis, wodurch faserreiche Kost nur schlecht verwertet werden kann. Zusätzlich benötigt das Reh durch dieses geringe Fassungsvermögen mehrere Äsungsperioden, die relativ gleichmäßig über 24 Stunden verteilt sind. Hierdurch und aufgrund des kleinen Magens ist das Reh auf nährstoffreiche, leicht verdauliche Nahrung angewiesen. Dies führt dazu, dass das Reh im Gegensatz zum Rotwild – ein Mischäser – wählerisch ist und sich u. a. von Knospen, Kräutern, Blüten, jungen Blättern und Gräsern ernährt. Ab Herbst werden dabei zunehmend auch Beeren, Obst, Pilze, Kastanien, Eicheln, Bucheckern sowie auch Brombeer- und Himbeerblätter und Flechten aufgenommen (DEUTZ ET AL., 2009; ANONYMOUS, 2012). Neben einem Tagesrhythmus der Äsungsaufnahme besitzen sie zusätzlich einen Jahresrhythmus hinsichtlich ihres Energiebedarfes. So hat das Rehwild in den Monaten Oktober bis Dezember einen erhöhten Nahrungsbedarf. Dieser geht in den Monaten ab Mitte Dezember bis Mitte Februar wieder zurück. Parallel zu dieser Entwicklung findet zusätzlich

eine Rückbildung der Pansenzotten statt. In den darauffolgenden Monaten bis etwa Juni ist der Nahrungsbedarf wieder erhöht, was erneut dazu führt, dass das Rehwild – bevorzugt die Böcke – einen Feistansatz bildet. Diese jahreszeitlichen Schwankungen des Gewichts sind hauptsächlich durch den Fellwechsel, das unterschiedliche Nahrungsangebot im Jahresverlauf, Witterung sowie besondere Belastungen wie der Brunft, der Trächtigkeit und Milchbildung bedingt. Hierbei erreichen Böcke ihr Höchstgewicht im Juni/Juli vor der Blattzeit. Hingegen zeigen führende Ricken in diesen Monaten aufgrund der Milchbildung eine Reduktion ihres Gewichts (DEUTZ ET AL., 2009).

2.1.2 Aktionsraum und Sozialverhalten

Rehwild gilt als außerordentlich standorttreu. Jedoch ist dies, wie auch einige andere vermeintliche charakteristische Verhaltensweisen, als nicht festgeschrieben zu betrachten. Denn zu unterschiedlich sind die Lebensräume der Rehe samt aller ökologischen Parameter wie die Wilddichte, das Geschlechterverhältnis, das Äsungs- und Deckungsangebot, Störfaktoren und Klimaeinflüsse, die Form der Forst- und Landwirtschaft sowie der Zugriff von Beutegreifern und einiges anderes mehr (DAVID, 2012).

Prinzipiell unterscheidet man bei Rehen Sommer- und Winterstreifgebiete, die auch als Jahresstreifgebiete zusammengefasst werden, sowie Tages- und Nachteinstände, Ruhe- und Äsungszonen, von territorialen Böcken besetzte Areale und von Ricken besetzte Aufzuchtzonen (STUBBE, 1996). Dabei lebt das Reh an sich als Einzelgänger, schließt sich jedoch in den Wintermonaten bis zum Frühjahr zu sozialen Verbänden, den sog. Sprüngen, zusammen (ANONYMOUS, 2012; ANONYMOUS 2012A).

Auch hinsichtlich ihres territorialen Verhaltens gehen die Meinungen auseinander. Neue Erkenntnisse belegen, dass das territoriale Verhalten von einigen Faktoren abhängig zu sein scheint. So umfasst die Größe eines Territoriums eines Rehbockes zumindest in Waldgebieten oder gut strukturierten Feld-Wald-Revieren selten mehr als etwa 25 ha, im Kern sind sie sogar oftmals noch wesentlich kleiner (DAVID, 2012, ANONYMOUS, 2013). Jedoch zeigen sie nicht über den gesamten Jahresverlauf territoriales Verhalten, sondern scheinen nach der Brunft aufgrund hormoneller Umstellungen ihre Territorialität aufzugeben (ANONYMOUS, 2012A). Aber auch hier belegen neuere Untersuchungen, dass das Reh als sog. Kulturfolger, in seinem Verhalten unglaublich anpassungsfähig ist und die früher oftmals festehende Territorialität je nach Lebenssituation einer vorhandenen Rehwildpopulation völlig variabel sein kann (ANONYMOUS, 2012; DAVID, 2012). So leben ältere Rehböcke, abhängig von der Wilddichte, oftmals nicht mehr territorial, bleiben aber dennoch in ihren alten Aktionsräumen und nehmen

sogar weiterhin an der Brunft teil. Trotz dieser Verhaltensänderung werden sie von anderen Rehböcken der Region toleriert und nicht attackiert. Man geht davon aus, dass sich die Böcke untereinander kennen und aufgrund dessen den „Altmeister“ respektieren (DAVID, 2012). Ebenso kann der Ökotyp „Feldreh“, welcher dauerhaft im Offenland lebt, teilweise oder gänzlich sein territoriales Verhalten aufgeben (DAVID, 2012).

Ganz anders sieht es beim weiblichen Rehwild aus. Zwar sind sie standorttreu, aber sie scheinen prinzipiell kein territoriales Verhalten an den Tag zu legen. Aber auch hier gehen, je nach Autor, die Meinungen auseinander. So wird beschrieben, dass Ricken vor dem Setzen etwa im April territorial werden und sie das Gebiet gegen andere weibliche Rehe verteidigen, um den bestmöglichen Lebensraum zur Aufzucht der Kitze zu sichern (ANONYMOUS, 2013; ANONYMOUS, 2012A). DAVID (2012) hingegen stellt dieses Verhalten in Frage. Denn Territorialverhalten kostet Kraft und Energie und gerade zu der Setzzeit müssen Ricken auf ihren Energiehaushalt achten, um nicht unnötig Kraft und Energie zu verschwenden. Somit wäre das Besetzen und Verteidigen eines Reviers zu dieser Zeit nicht sinnvoll. Zudem scheint es Beobachtungen zu geben, bei denen Ricken fast unmittelbar nebeneinander setzen. Zugleich kennen sie den Abliegeplatz eines Kitzes nur ungefähr, manchmal sogar gar nicht, da die Kitze diesen selbst wählen. Auch nehmen die Kitze selbstständig Ortswechsel vor, die nach STUBBE (1997) sogar mehrere hundert Meter betragen. In Waldgebieten mit hoher Wildddichte leben die Rehe oft sehr kleinräumig in verwandschaftlich organisierten Sippen. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass verwaiste Kitze innerhalb solcher Gruppen von älteren Schwestern, Tanten usw. relativ problemlos adoptiert werden können. All diese Verhaltensweisen und Fakten sprechen laut DAVID (2012) gegen eine echte Territorialität der Ricken sowohl zur Setzzeit als auch darüber hinaus. Stattdessen scheinen sich die Setz- und Streifgebiete der weiblichen Rehe, je nach Wildddichte mehr oder weniger zu überschneiden, ohne dass es dabei zu ernsthaften Auseinandersetzungen kommt oder kommen muss (DAVID, 2012).

2.1.3 Rehwild als potentieller Überträger von VTEC in der Gehegehaltung

Das Rehwild wird zwar im Gegensatz zum Rot- und Damwild eher selten als klassisches Zoo- und Gehegetier gehalten, jedoch gibt es gerade in Wildparks oftmals eine kleine Population „freilebender Rehe“, die u. a. durch ihre Losung im Falle der Ausscheidung von VTEC, diesen Erreger im gesamten Gelände der Wildparks verteilen können. Die Tatsache, dass VTEC-Stämme von Rindern, Schafen und Ziegen Gemeinsamkeiten zu Stämmen von Wildwiederkäuern aufweisen (MIKO ET AL., 2009), zeigt, dass es zu einer wechselseitigen

Übertragung nicht nur in freier Wildbahn kommen kann, sondern dies auch in Gehegehaltung möglich ist – natürlich nicht nur durch das Tier an sich, sondern im Falle von Streichelzoos oder freilaufenden Rehen auf dem Gelände eines Parks auch durch die Besucher bzw. das entsprechende Personal. In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage nach den Konsequenzen, die sich aus diesem Sachverhalt ergeben. Aufgrund immer wieder auftretender Erkrankungsfälle mit VTEC durch den Besuch von Streichelzoos bzw. den direkten Kontakt mit Tieren in Zoos oder anderen Einrichtungen (CDC, 2005; CDC, 2007; CHAPMAN ET AL., 2000; HEUVELINK ET AL., 2002; McMILLAN ET AL., 2007; PRITCHARD ET AL., 2009) haben Behörden und Verbände reagiert und Richtlinien bzw. Verbrauchertipps erarbeitet, wodurch das von Tieren ausgehende Infektionsrisiko minimiert werden soll. Das Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) beispielsweise rät zur Vorbeugung einer EHEC-Infektion durch direkten Kontakt mit infizierten Tieren, kleine Kinder – eine besonders gefährdete Altersgruppe – beim Umgang mit den Tieren zu beaufsichtigen. Des Weiteren sollen laut BfR nach dem Kontakt zu Tieren oder auch der Erde sowie vor dem Konsum von Speisen und Getränken die Hände gründlich mit Wasser und Seife gewaschen werden. Außerdem sollten die Speisen und Getränke nur außerhalb der Tierställe und Gehege verzehrt werden (BfR, 2012). Das amerikanische CDC (Centers for Disease Control and Prevention) hingegen setzt auf Personalschulung und Besucherinformation. Hier wird empfohlen, den Tierkontakt auf spezielle Bereiche zu beschränken, in welchen keine Lebensmittel und Getränke ausgegeben oder verzehrt werden dürfen. Große Bedeutung wird von der CDC (2011) auch der ausreichenden Anzahl und Ausstattung von Handwascheinrichtungen beigemessen. Die Ausgabe von Rohmilch wird ebenfalls nicht empfohlen (CDC, 2011). Ausführlichere Informationen des CDC stellt das „Compendium of measures to prevent disease associated with animals in public settings, 2011“ der National Association of State Public Health Veterinarians, Inc., zur Verfügung (NASPHV, 2011).

2.1.4 Jagd und Verzehr

Die Jagd an sich ist geregelt durch das Bundesjagdgesetz (BJG) in der Fassung der Bekanntmachung vom 29. September 1976 (BGBl. I S. 2849), das zuletzt durch Artikel 1 des Gesetzes vom 29. Mai 2013 (BGBl. I S. 2557) geändert worden ist. In § 2 Absatz 1 sind alle Tierarten aufgelistet, die in Deutschland dem Jagdrecht unterliegen. Nach § 22 Absatz 1 werden durch Rechtsverordnungen die Zeiten, in denen die Jagd auf Wild ausgeübt werden darf, bestimmt. Diese so genannten Jagdzeiten sind in der Verordnung über die Jagdzeiten vom 2. April 1977 in der jeweils geltenden Fassung festgelegt. Außerhalb der Jagdzeiten gilt es jedoch, das Wild zu verschonen (Schonzeiten). Zusätzlich können die einzelnen Länder,

die Jagdzeiten abkürzen oder aber auch aufheben und können somit, in einem gewissen Rahmen angepasst, eigenständig agieren. In Hessen sind die Jagdzeiten für das Reh gemäß der Bundesjagdzeiten-Verordnung und der Verordnung über die Änderung der Jagdzeiten vom 09.06.2011 wie folgt geregelt:

- **Böcke** 1. Mai bis 15. Oktober
- **Ricken und Kitze** 1. September bis 31. Januar
- **Schmalrehe** 1. Mai bis 31. Januar

Das männliche adulte Reh wird generell als Rehbock oder auch einfach nur als Bock bezeichnet. Die Ricke hingegen ist das adulte weibliche Reh. Jungtiere werden in ihrem ersten Lebensjahr als Kitze bezeichnet, wobei zwischen Bock- und Rehkitz unterschieden wird. In seinem zweiten Lebensjahr wird das weibliche Reh, solange es noch kein Kitz führt, Schmalreh genannt und das männliche dagegen als Jährling bzw. Jährlingsbock bezeichnet.

Im Gegensatz zur Regelung des Bundes, wo Kitze bis zum 28. Februar geschossen werden dürfen, ist in Hessen das Erlegen von Kitzen nach dem 31. Januar nicht mehr erlaubt. Im Bundesland Thüringen endet die Jagdzeit für Ricken, Kitze und Schmalrehe derzeit sogar am 15.01. sowie in Mecklenburg-Vorpommern bereits am 10. Januar. Diese Regelungen werden der Tatsache gerecht, dass auch für Rehwild ab Dezember die „Winterruhe“ beginnt, und somit der Stoffwechsel auf Sparflamme gestellt wird (DAVID, 2012). Auch die Äsungsaufnahme und Bewegungsaktivität werden reduziert, so dass Begegnungen mit Rehen seltener werden und die Bejagung immer schwieriger wird (DAVID, 2012). In diesen Monaten ist die Jagd auf das Wild mit einem enormen Energieverlust verbunden, der oftmals mit abnormem Ernährungsverhalten und der Provokation von Wildschäden einhergeht (FIALA-KÖCK, 2012). Zudem kann permanenter Jagddruck dazu führen, dass offene und beste Äsungsflächen nicht genutzt werden. Stattdessen zieht sich das Rehwild in die angrenzenden Waldgebiete zurück, wo es wiederum zu einer verstärkten Verbissbelastung kommt (FIALA-KÖCK, 2012). Somit wird die Einschränkung der Jagdzeit auf Kitze auch der Tatsache gerecht, die Ungestörtheit des Lebensrythmus der Wildtiere zu erhalten (FIALA-KÖCK, 2012), gerade in der sensiblen Phase der späten Wintermonate sowie dem Frühjahr, wo es heißt, sich wieder ein Polster anzueignen, um z. B. der Aufgabe einer führenden Ricke gerecht zu werden. Aber nicht nur die Jagdzeiten sind ausschlaggebend für das Wild, sondern auch die Methoden, wie die Jagd durchgeführt wird. So führt permanente Ansitzjagd beispielsweise beim Rotwild zu einem Jagddruck, der diese Wildart dazu veranlasst, den Lebensraum zu verlassen. Als Alternative können zur Verminderung des Jagddruckes Ansitzjagden in Intervallen oder aber

auch in Intervallen durchgeführte Bewegungsjagden wie der Gemeinschaftsansitz mit Anrühren des Wildes, die Drückjagd oder die Stöberjagd durchgeführt werden (FIALA-KÖCK, 2012).

Bei Durchführung von Bewegungsjagden auf Rehwild kann zwar in kurzer Zeit viel Wild erlegt werden, jedoch sind zur erfolgreichen Durchführung einschlägige Kenntnisse über die Verhaltensweisen von Rehen elementar (DAVID, 2012). Aber auch eine umsichtige und akribische Organisation und Planung sowie geübte Schützen mit entsprechender Schussdisziplin sind erforderlich, um eine tierschutz- und weidgerechte Erlegung des Wildes zu gewährleisten (DAVID, 2012; FIALA-KÖCK, 2012). In Hessen muss zudem seit 2009 jeder Jäger bei Teilnahme einer Jagd einen aktuellen Schießnachweis vorlegen.

Das Rehwild als häufigste einheimische Hirschart, macht in Deutschland zahlenmäßig den größten Anteil an jagdbarem Wild aus (AID, 2009). In den letzten Jahren hat sich die Jagdstrecke des Rehwildes konstant bei über einer Millionen erlegter Rehe gehalten (s. Abbildung 1). So wurden in den Jahren zwischen 2008 und 2011 jedes Jahr im Durchschnitt 5.612 t Wildbret von Rehen gewonnen (DJV, 2012 C/D/E). Zudem handelt es sich um die kleinste einheimische Hirschart mit einem Lebendgewicht zwischen 15-32 kg, wobei hinsichtlich des Gewichtes die Angaben schwanken.

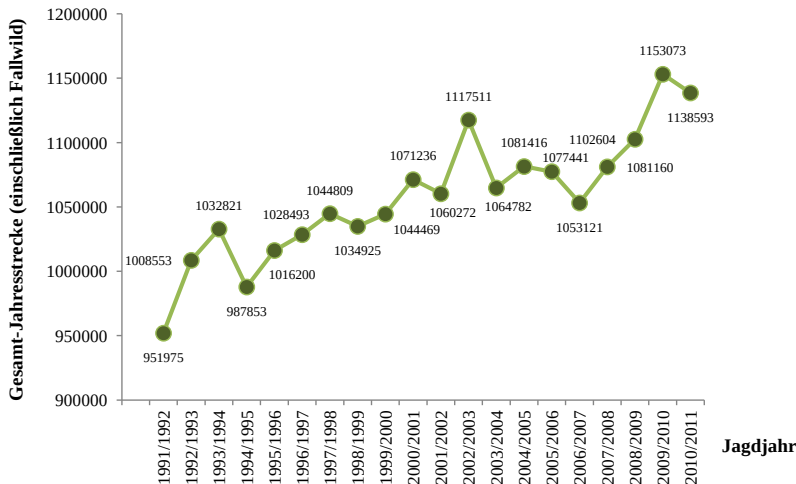


Abbildung 1: Übersicht über die Jahresstrecken des Rehwildes (erlegtes Wild + Fallwild) in Deutschland in den Jahren 1991 bis 2011 (DJV, 2012B).

Laut Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV) verzehrt der Bundesbürger pro Jahr 450 g Wildfleisch (KUJAWSKI, 2009). Diese 450 g entsprechen weniger als 1 % des gesamten Fleischkonsums eines Bundesbürgers pro Jahr (KUJAWSKI, 2009). Hierbei kommen schätzungsweise 60 % des bei uns nachgefragten Wildes aus Deutschland – entweder als Wildbret von der Jagd oder aus der landwirtschaftlichen Gehegewildhaltung (AID, 2009). Der Verbrauch an Wildfleisch ist über die letzten Jahre sehr stabil geblieben (BMELV, 2012). Im Vergleich hierzu liegt der Pro-Kopf-Verbrauch bei Schweinefleisch bei rund 39 kg pro Jahr. Für Rindfleisch ist der Verbrauch laut Bundesministerium massiv zurückgegangen und liegt in einem Bereich von nun mehr 12 kg pro Kopf und Jahr. Hingegen ist beim Geflügelfleisch ein starker Anstieg zu verzeichnen und beträgt aktuell 18 kg im Jahresverbrauch (BMELV, 2012).

2.2 Verotoxin-bildende *Escherichia coli* (VTEC)

2.2.1 Eigenschaften von *E. coli*

Erstmals wurde *Escherichia coli* (*E. coli*) von dem deutschen Kinderarzt Theodor Escherich 1885 aus dem Stuhl von Säuglingen isoliert und als *Bacterium coli commune* bezeichnet. Zu seinen Ehren wurde dieser Spezies im Jahr 1919 der Dedikationsname *Escherichia coli* verliehen. Taxonomisch wird *E. coli* der Familie der *Enterobacteriaceae* zugeordnet (HOLT ET AL., 1994). Es handelt sich um ein plumpes, gramnegatives, fakultativ anaerobes, sporenloses, Oxidase-negatives stäbchenförmiges Bakterium mit abgerundeten Enden. Es ist etwa 2-6 µm lang und 1-1,5 µm breit. Die meisten Stämme bilden eine Kapsel und sind durch peritriche Begeißelung beweglich – unbewegliche Stämme kommen jedoch auch vor. Ihr Wachstumsoptimum liegt bei 37 °C, so dass sie den mesophilen Bakterien zuzuordnen sind (ROLLE UND MAYR, 1993; HOLT ET AL., 1994). D-Glucose sowie zahlreiche andere Kohlenhydrate wie Laktose und D-Sorbit werden unter Bildung von Gas und Säure verstoffwechselt (HOLT ET AL., 1994).

E. coli-Stämme gehören der physiologischen Darmflora von Mensch, Vögeln und nahezu aller Säugetiere an, wobei Meerschweinchen und Chinchilla eine Ausnahme bilden. Mit Keimzahlen von 10^4 – 10^9 KbE/g stellt *E. coli* in der Eubiose max. 1 % der Darmflora dar und wird somit der Begleitflora zugeordnet (ROLLE UND MAYR, 1993). In der Darmflora als Kommensalen vorkommende Stämme können jedoch auch als fakultativ pathogene Krankheitserreger in Erscheinung treten. Es handelt sich hierbei einmal um die sogenannten extraintestinalen pathogenen *E. coli* sowie um die intestinal pathogenen *E. coli*. Dabei ist die Bedeutung von *E. coli* als Verursacher von Infektionen beim Menschen schon seit den 1920er

Jahren bekannt. Bei den extraintestinalen pathogenen *E. coli* handelt sich um Erreger, die als häufige Ursache von bakteriellen Harnwegsinfektionen gefunden werden sowie als Erreger von Bakteriämien/Septikämien und Krankenhausinfektionen gefürchtet sind (BfR, 2012A). In den 1940er Jahren wurde *E. coli* zunehmend bekannt als Verursacher von Erkrankungen des Magen-Darm-Traktes, weshalb man diese auch als intestinal pathogenen *E. coli* bezeichnete (BfR, 2012A). Diese werden aufgrund unterschiedlicher Virulenzprofile und der damit einhergehenden klinischen Symptomatik in folgende Pathogruppen eingeteilt (KAPER ET AL., 2004; BÜLTE UND GOLL, 2006):

- Verotoxin-bildende *E. coli* (VTEC)
- Enterotoxin-bildende *E. coli* (ETEC)
- Enteroinvasive *E. coli* (EIEC)
- Enteropathogene *E. coli* (EPEC)
- Enteroaggregative *E. coli* (EAEC oder EAggEC)
- Diffuse-adhärenz *E. coli* (DAEC)

Der Hauptvirulenzfaktor für VTEC/EHEC ist das Verotoxin (NATARO UND KAPER, 1998; KAPER ET AL., 2004). Parallele Untersuchungen von Cytotoxin-produzierenden *E. coli* von verschiedenen Arbeitsgruppen resultierten im Gebrauch von zwei unterschiedlichen Bezeichnungen für die Toxine, dem Verotoxin (VT) und dem Shiga-like Toxin (SLT) (SCHEUTZ ET AL., 2012). KONOWALCHUK ET AL. (1977) konnten als erste Arbeitsgruppe bei einigen *E. coli*-Stämmen ein Toxin nachweisen, welches zytotoxisch auf Verozellen (Nierenzellen von afrikanischen grünen Meerkatzen) wirkt und dementsprechend als Verotoxin (VT) charakterisiert wurde. Die Arbeitsgruppe um O'Brien berichtete parallel von einem Toxin in *E. coli*-Stämmen, welches große biologische, immunologische und strukturelle Ähnlichkeit zum Shiga-Toxin von *Shigella dysenteriae* Typ 1 aufwies, und sie es deshalb als Shiga-like-Toxin (SLT) bezeichneten (O'BRIEN ET AL., 1977; O'BRIEN ET AL., 1982; O'BRIEN UND LA VECK, 1983). 1994 schlugen O'BRIEN ET AL. vor, die beiden Bezeichnungen „Verotoxin“ und „Shiga-like Toxin“ als alternative, austauschbare Bezeichnungen beizubehalten. Zwei Jahre später schlugen CALDERWOOD ET AL. (1996) hingegen vor, das „like“ wegzulassen und die bisherigen parallel verwendeten Toxinbezeichnungen VT und SLT zu vereinheitlichen. Diesem Vorschlag widersprachen jedoch KARMALI ET AL. (1996). Zwar wurde allgemein wissenschaftlich akzeptiert das Wort „like“ nicht mehr zu verwenden, jedoch werden die beiden Nomenklaturen bis heute noch in der Literatur parallel und synonym verwendet. In der vorliegenden Arbeit wird der Begriff „Verotoxin-bildende *E. coli*“ verwendet.

Die Bedeutung solcher Stämme, insbesondere auch als Lebensmittelinfektionserreger, wurde erst 1982 erkannt, als es über den Verzehr nicht ausreichend erhitzter „Hamburger“ in den Vereinigten Staaten zu schwerwiegenden Erkrankungen mit Todesfällen kam (RILEY, 1983). In diesem Zusammenhang wurden die enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC) erstmals als eine neue Gruppe darmpathogener Bakterien beschrieben (KARCH ET AL., 2005). *E. coli*-Stämme des Serotyps O157:H7 gelten hierbei als Prototyp der enterohämorrhagischen *E. coli*, die beim Menschen verschiedene Krankheitsbilder wie hämorrhagische Colitis (HC), hämolytisch-urämisches Syndrom (HUS) oder auch eine thrombotisch-thrombozytopenische Purpura (TTP) hervorrufen können. Die Produktion von Verotoxinen gilt – wie bereits erwähnt – als primärer Virulenzfaktor dieser Erregergruppe. Im Gegensatz zu dieser Virulenzfaktor-geprägten Bezeichnung basiert der Begriff „EHEC“ auf den durch dieses Pathovar verursachten klinischen Erscheinungen. Diese Unterscheidung der Begriffe „EHEC“ und „VTEC/STEC“ rührt von der Beobachtung her, dass nicht alle *E. coli*-Stämme, die Verotoxine bilden können, zu Erkrankungen bei Menschen führen. Jedoch bestehen über die exakte Definition von „EHEC“ in Abgrenzung zu den Begriffen „VTEC“ oder „STEC“ weiterhin kontroverse Ansichten.

2.2.2 Verotoxin

Bei den Verotoxinen handelt es sich entsprechend ihrer biologischen Aktivität um potente Inhibitoren der Proteinbiosynthese eukaryotischer Zellen. Sie stellen zusammengesetzte Toxine, sog. Holotoxine, dar, die aus einer enzymatisch-aktiven A-Untereinheit sowie fünf B-Untereinheiten zur spezifischen Bindung an die Oberfläche der Zielzelle bestehen (KARCH UND KÖHLER, 1999). Die A-Untereinheit stellt die rRNA-N-Glykosidase dar, die nach Translokation in die eukaryotische Zelle aktiv wird. Die B-Untereinheiten hingegen sind für die Bindung des Holotoxins an einen Glykolipid-Rezeptor wie dem Globotriosylceramid (Gb₃) auf der Oberfläche von eukaryotischen Zellen verantwortlich (KARCH UND KÖHLER, 1999, FRASER ET AL., 2004). Das vtx 2e, welches die Ödemkrankheit beim Schwein verursacht, stellt hingegen eine Ausnahme dar. Dieses Verotoxin bindet bevorzugt an Globotetraosyl (Gb₄), ist aber dennoch in der Lage an den Gb₃-Rezeptor zu binden (GYLES, 2007; NATARO UND KAPER, 1998).

Die Aufnahme des Verotoxins in die eukaryotischen Zielzellen erfolgt durch Rezeptor-vermittelte Endozytose. Hierbei sind Gb₃-reiche Gewebe wie Endothelien, das ZNS und die Nierenzellen die Zielzellen des Toxins (OBRIG ET AL., 1993; KARMALI, 2004) – dies spiegelt sich auch im klinischen Bild wider. Die Zellen werden vom Toxin erreicht, indem es die

Darmschranke passiert und sich gebunden an Leukozyten vom Blut zu den Zielorganen transportieren lässt (TE LOO ET AL., 2001). Dort angekommen wird nach Rezeptor-vermittelter Endozytose der A-Untereinheit das A₁-Fragment – eine N-Glykosidase – freigesetzt, welches spezifisch N-glykosidische Bindungen in der 28S rRNA spaltet. Infolge dieses Mechanismus kommt die Proteinbiosynthese zum Erliegen, was schließlich zum Tod der Zelle führt (GYLES, 2007; PATON UND PATON, 1998).

Die Gene, welche für Verotoxine codieren, sind auf temperenten lambdoiden Bakteriophagen lokalisiert (STROCKBINE ET AL., 1986; STROCKBINE ET AL., 1988; MUNIESA ET AL., 2000; MUNIESA ET AL., 2004; MUNIESA ET AL., 2004A). Aufgrund dieser genetischen Lokalisation ergeben sich Konsequenzen für die Epidemiologie sowie die Labordiagnostik. Denn die Phagen sind unterschiedliche mobile genetische Elemente, die die Verotoxin-Gene nicht nur auf die kommensalen und pathogenen *E. coli* übertragen, sondern sie tun dies ebenso auf andere Mitglieder der Familie der *Enterobacteriaceae* (ACHESON ET AL., 1998; JAMES ET AL., 2001; MUNIESA ET AL., 2004; MUNIESA ET AL., 2004A; SCHMIDT ET AL., 1999; TÓTH ET AL., 2003). Neben der Entstehung neuer VTEC-Stämme muss jedoch auch mit einem Verlust der Verotoxin-Gene gerechnet werden – dies konnte in einigen Studien gezeigt werden (MELLMANN ET AL., 2005; BIELASZEWSKA ET AL., 2007). Innerhalb einer Studie von KARCH ET AL. (1992) verloren die Isolate von 15 der 45 einbezogenen Patienten nach Subkultivierung ihr Verotoxinbildungsvermögen. Dieser Umstand zeigt einmal mehr die Notwendigkeit direkter Screening-Nachweisverfahren in der Labordiagnostik.

Die Verotoxine lassen sich prinzipiell in die zwei Hauptgruppen, Verotoxin 1 (VT1) und Verotoxin 2 (VT2) unterteilen, da eine serologische Kreuzneutralisation ausbleibt (SCOTLAND ET AL., 1985; STROCKBINE ET AL., 1986; SCHEUTZ ET AL., 2012).

Aufgrund fortlaufender Entdeckungen neuer Toxinvarianten, wurde es nötig diese in Subtypen zu unterteilen. Oftmals wurden die Toxine trotz biologischer Unterschiede und Differenzen in der Sequenz einfach dem Prototyp VT 1 bzw. VT 2 zugeordnet. Andere Arbeitsgruppen hingegen gaben den Toxinen, die vom sog. Prototyp abwichen, eine eigene beliebige Bezeichnung des Subtypen (SCHEUTZ ET AL., 2012). Hierbei kam es vor, dass Subtypen zwar dieselbe Bezeichnung erhielten, auch serologisch eine Kreuzneutralisation zeigten, aber sie dennoch signifikante Unterschiede in ihren biologischen Aktivitäten, wie z. B. der Fähigkeit durch Elastase in der intestinalen Mucosa aktiviert zu werden, aufwiesen. Aufgrund des Mangels einer Vereinheitlichung der Nomenklatur sowie signifikanten Unterschieden innerhalb der Sequenzen eines Subtyps kam es immer wieder zu

Verwechslungen und Verwirrungen. Bereits 1994 schlug die Arbeitsgruppe von O'BRIEN vor, die Mitglieder der Shiga Toxin-Familie nach ihren phänotypischen Unterschieden, ihrer biologischen Aktivität sowie ihren Hybridisierungseigenschaften zu klassifizieren; jedoch wurden bei weitem nicht alle Varianten auf diese Eigenschaften hin untersucht. Aber gerade diese Eigenschaften von Toxinen können von klinischer Relevanz sein, da den verschiedenen Subtypen (VT 1a, VT 1c, VT 1d und VT 2a, VT 2b, VT 2c, VT 2d, VT 2d_{activatable}, VT 2e, VT 2f, VT 2g) teilweise eine unterschiedliche Virulenz zugesprochen wird. So wird VT 1 im Vergleich zu VT 2 allgemein eine geringere Virulenz bescheinigt, da es relativ häufiger bei Enteritiden nachgewiesen wird als beim HUS (BOCKEMÜHL ET AL., 1997; FRUTH ET AL., 2002). Bestimmte Subtypen von VT 2 werden hingegen häufiger bei klinischen Isolaten nachgewiesen, die mit schweren Krankheitsverläufen wie dem HUS assoziiert sind (BIELASZEWSKA ET AL., 2006; FRIEDRICH ET AL., 2002; PERSSON ET AL., 2007). Andere Subtypen von VT 2 scheinen andererseits mit mildereren Krankheitsverläufen in Verbindung zu stehen. *E. coli*, die VT 2e produzieren, sind sogar wahrscheinlich nicht, allenfalls nur ausnahmsweise, pathogen für den Menschen (SCHEUTZ UND ETHELBERG, 2008). Eine einheitliche Nomenklatur und die Bestimmung des Verotoxintyps sind essentiell für Überwachungsprogramme und können somit zur Abschätzung möglicher Komplikationen bei einer Erkrankung beitragen (FRIEDRICH ET AL., 2002, SCHEUTZ ET AL., 2012), aber auch die Identifizierung der Infektionsquelle erleichtern (ZHANG ET AL., 2002).

Eine detaillierte Zusammenstellung der Bezeichnungen der Prototypen sowohl für das VT 1- sowie das VT 2-Toxin und in der Literatur zu findende Bezeichnungen für die Gene und/oder Toxine in Anlehnung an SCHEUTZ ET AL. (2012) geben Tabelle 1 und Tabelle 2 wieder.

Tabelle 1: Zusammenstellung der Bezeichnungen der Prototypen für das vtx 1-Toxin und ehemalige Bezeichnungen für die Gene und/oder Toxine in Anlehnung an SCHEUTZ ET AL., 2012.

Toxin-Subtyp ¹⁽²⁾	Referenzstamm bzw. Prototyp-Organismus	Serotyp des Prototyp Organismus	Frühere Bezeichnung oder Synonym des Toxin-Gens ³⁾	Frühere Bezeichnung oder Synonym des Toxin ³⁾	GenBank Accession No.	Quelle	Bemerkungen
ST 1	3818T	<i>Shigella dysenteriae</i>	stx 1	Stx 1	M19437	STROCKBINE ET AL., 1988	--
VT 1a	EDL 933	O157:H7	slt-1; vtx 1	SLT-1; VT1	M19473	O'BRIEN ET AL., 1984; JACKSON ET AL., 1987	--
VT 1c	DG131/3	O174:H8	vtx _{10X3} ; vtx 1c	Stx (1c)	Z36901	KOCH ET AL., 2001; PATON ET AL., 1995	--
VT 1d	MHI813	O8:k85ab:HR	vtx 1d	VT 1v51, VT 1v52	AY170851	BÜRK ET AL., 2003	Aminosäuresequenz identisch mit VT 1v51 und VT 1v52 nach OHMURA-HOSHINO ET AL., 2003

¹⁾ Toxintypen wurden traditionell aufgrund ihrer immunologischen Variabilität, den Unterschieden in der Toxizität für Zellkulturen und/oder Tieren, ihrer Fähigkeit durch Mauselastase aktiviert zu werden sowie den Unterschieden in den DNS- oder Aminosäuresequenzen, definiert. In der vorliegenden Tabelle hingegen liegt die Definition nach SCHEUTZ ET AL., 2012 vor. Diese basiert auf phylogenetischen Analysen.

²⁾ Aufgrund seines historischen Hintergrundes ist die Stx/stx Nomenklatur (ohne arabische Zahl) für das Shiga Toxin und die codierende Gene von *Shigella* spp. vorbehalten. Bezeichnungen für das Shiga Toxin oder die codierenden Gene dieser Toxine, wenn sie bei *E. coli* oder anderen Bakterien vorkommen, beinhalten eine arabische Nummer nach „Vtx“ oder „vtx“. Im Zuge dessen sollte Vtx 1 und Vtx 2 nur dann verwendet werden, wenn der Subtyp unbekannt ist (SCHEUTZ ET AL., 2012).

³⁾ Stx = Shigatoxin; SLT = Shiga-like Toxin; Vtx (VT) = Verotoxin; stx = Shigatoxin-Gen; slt = Shiga-like Toxin-Gen; vtx = Verotoxin-Gen

Tabelle 2: Zusammenstellung der Bezeichnungen der Prototypen für das vtx 2-Toxin und ehemalige Bezeichnungen für die Gene und/oder Toxine in Anlehnung an SCHEUTZ ET AL., 2012.

Toxin-Subtyp ^{1,2)}	Referenzstamm bzw. Prototyp-Organismus	Serotyp des Prototyp Organismus	Frühere Bezeichnung oder Synonym für das Toxin-Gen ³⁾	Frühere Bezeichnung oder Synonym für das Toxin ³⁾	GenBank Accession No.	Quelle	Bemerkungen
VT 2a	EDL 933	O157:H7	vtx 2; <i>slt</i> -II	SLT-II Vtx 2vhd	X07865	O'BRIEN ET AL., 1984	--
VT 2b	EH250	O118:H12	vtx 2d <i>vtx</i> _{2c} OX392 <i>vtx</i> _{2c} O111	SLT-II/OX3a VT 2d- OX3a Vtx 2d VT2d-Ount VT 2d-O111	AF043627	PATON ET AL., 1992 PIERARD ET AL., 1998	wurde früher auch <i>vtx</i> _{2c} O118 oder <i>vtx</i> _{2d} non-activatable genannt; nicht identisch mit VT 2d nach MELTON-CELSA ET AL., 1998
VT 2c	E32511	O157:[H7]	<i>vtx</i> 2/ <i>vtx</i> 2c <i>slt</i> -IIc <i>vtx</i> _{2c} OX393 <i>vtx</i> 2 <i>vtx</i> _{2c} vhd	Stx 2v/VT 2v SLT IIc Vtx 2vhd SLT-II/OX3b/2 Vtx2-OX3b	M59432	SCHMITT ET AL., 1991	--
VT 2d	B2F1	O91:H21	<i>vtx</i> 2vha <i>vtx</i> _{2d1} / <i>vtx</i> 2d1 <i>vtx</i> 2ha <i>vtx</i> 2d ₆ <i>vtx</i> 2v-ha	SLT-IIvh/SLT-IIvha Vtx 2vha/Vt 2vha Vtx 2d1/VT 2d1 Vtx 2vh-a/VT 2vh-a VT 2v-a	AF479828 (VT 2d1)	ITO ET AL., 1990	nicht identisch mit VT 2d nach PIERARD ET AL., 1998

¹⁾ Toxintypen wurden traditionell aufgrund ihrer immunologischen Variabilität, den Unterschieden in der Toxizität für Zellkulturen und/oder Tieren, ihrer Fähigkeit durch Mauselastase aktiviert zu werden sowie den Unterschieden in den DNS- oder Aminosäuresequenzen, definiert. In der vorliegenden Tabelle hingegen liegt die Definition nach SCHEUTZ ET AL., 2012 vor. Diese basiert auf phylogenetischen Analysen.

²⁾ Aufgrund seines historischen Hintergrundes ist die Stx/stx Nomenklatur (ohne arabische Zahl) für das Shiga Toxin und die codierende Gene von *Shigella* spp. vorbehalten. Bezeichnungen für das Shiga Toxin oder die codierenden Gene dieser Toxine, wenn sie bei *E. coli* oder anderen Bakterien vorkommen, beinhalten eine arabische Nummer nach „Vtx“ oder „vtx“. Im Zuge dessen sollte Vtx 1 und Vtx 2 nur dann verwendet werden, wenn der Subtyp unbekannt ist (SCHEUTZ ET AL., 2012).

³⁾ Stx = Shigatoxin; SLT = Shiga-like Toxin; Vtx (VT) = Verotoxin; stx = Shigatoxin-Gen; *slt* = Shiga-like Toxin-Gen; *vtx* = Verotoxin-Gen

Tabelle 2: Fortsetzung.

Toxin-Subtyp ⁽²⁾	Referenzstamm bzw. Prototyp-Organismus	Serotyp des Prototyp Organismus	Frühere Bezeichnung oder Synonym für das Toxin-Gen ⁽³⁾	Frühere Bezeichnung oder Synonym für das Toxin ⁽³⁾	GenBank Accession No.	Quelle	Bemerkungen
VT 2d	B2F1	O91:H21	vtx 2vhb vtx _{2d} /vtx 2d2 vtx 2hb vtx 2d ₆ vtx 2v-hb	Vtx 2vhb/VT 2vhb Vtx 2vh-b/vt 2vh-b Vtx 2d2/VT 2d2 VT 2v-b SLT-IIvhb	AF479829 (VT 2d2)	ITO ET AL., 1990	nicht identisch mit VT 2d nach PIERARD ET AL., 1998
VT 2e	S1191	O139:K12:H1	vtx 2e slt-IIv slt-IIva slt-IIe	SLT-IIv SLT-IIva SLT-IIe/VTe VT 2vp	M21534	WEINSTEIN ET AL., 1988	--
VT 2f	T4/97	O128ac:[H2]	vtx 2f vtx _{2f} /vtx2ev slt-IIvhc slt-IId	SLT IIva Vtx 2ev/VT 2ev/VTev Stx 2vp2/VT 2vp2 Stx 2va/Stx 2v SLT IIvhc SLT-IId/VT 2d	AJ010730	SCHMIDT ET AL., 2000	--
VT 2g	7v	O2:H25	vtx 2g	---	AY286000	LEUNG ET AL., 2003	--

¹⁾ Toxintypen wurden traditionell aufgrund ihrer immunologischen Variabilität, den Unterschieden in der Toxizität für Zellkulturen und/oder Tieren, ihrer Fähigkeit durch Mauselastase aktiviert zu werden sowie den Unterschieden in den DNS- oder Aminosäuresequenzen, definiert. In der vorliegenden Tabelle hingegen liegt die Definition nach SCHEUTZ ET AL., 2012 vor. Diese basiert auf phylogenetischen Analysen.

²⁾ Aufgrund seines historischen Hintergrundes ist die Stx/stx Nomenklatur (ohne arabische Zahl) für das Shiga Toxin und die codierende Gene von *Shigella* spp. vorbehalten. Bezeichnungen für das Shiga Toxin oder die codierenden Gene dieser Toxine, wenn sie bei *E. coli* oder anderen Bakterien vorkommen, beinhalten eine arabische Nummer nach „Vtx-“ oder „vtx-“. Im Zuge dessen sollte Vtx 1 und Vtx 2 nur dann verwendet werden, wenn der Subtyp unbekannt ist (SCHEUTZ ET AL., 2012).

³⁾ Stx = Shigatoxin; SLT = Shiga-like Toxin; Vtx (VT) = Verotoxin; stx = Shigatoxin-Gen; slt = Shiga-like Toxin-Gen; vtx = Verotoxin-Gen

Die Verwendung der Akronyme „Stx“/„stx“ (ohne arabische Zahl) sind für das Shiga-Toxin bzw. die codierende Gene von *Shigella* spp. vorbehalten. Bezeichnungen für das Shiga-Toxin oder die codierenden Gene dieser Toxine, wenn sie bei *E. coli* oder anderen Bakterien vorkommen, beinhalten nach „VT“ oder „vtx“ eine arabische Nummer. Im Zuge dessen sollte VT 1 und VT 2 nur dann verwendet werden, wenn der Subtyp unbekannt ist (SCHEUTZ ET AL., 2012). Vor diesem Hintergrund wird das früher als vtx 1 bezeichnete Gen bei *E. coli* nach den Nomenklatur-Empfehlungen von SCHEUTZ ET AL. (2012) als **vtx 1a** deklariert.

Es wurde lange Zeit angenommen, dass vtx 1 ein hochkonserviertes Gen darstellt und Sequenzvariationen nur bei der vtx 2-Gruppe existieren (NATARO UND KAPER, 1998). Bereits PATON ET AL. (1995) berichteten jedoch über die Variante VT 1-OX3, welche später von ZHANG ET AL. (2002) gemäß den Nomenklatur-Empfehlungen von CALDERWOOD ET AL. (1996) in **VT 1c** umbenannt wurde. Der Subtyp VT 1c ist unter den humanen wie auch den ovinen, caprinen und cerviden Isolaten häufig zu finden (ISHII ET AL., 2007; HORCAJO ET AL., 2010; MARTIN UND BEUTIN, 2011). Aus bovinen Isolaten hingegen wird er nur selten gewonnen (ZHANG ET AL., 2002; BRETT ET AL., 2003; FRIEDRICH ET AL., 2003; HORCAJO ET AL., 2010). Keiner der vtx 1c-positiven Stämme gehörte bisher zu den klassischen EHEC-Serogruppen O26, O103, O111, O113, O145 oder O157 – ebenso fehlte all diesen Stämmen das *eae*-Gen. BRETT ET AL. (2003) konnte jedoch bei fünf mit HUS assoziierten Isolaten, das vtx 1c-Gen nachweisen. Trotz dieses Nachweises ist festzuhalten, dass VT 1c-positive Stämme hauptsächlich von asymptomatischen Patienten und solchen mit unkomplizierter Diarrhö isoliert werden, nicht jedoch von HUS-Patienten – dieses konnte in einigen Studien wiederholt nachgewiesen werden (KOCH ET AL., 2001; ZHANG ET AL., 2002; BRETT ET AL., 2003; FRIEDRICH ET AL., 2003). Eine weitere Besonderheit ist, dass vtx 1c gewöhnlicherweise mit VTEC-Stämmen assoziiert ist, von denen ebenfalls das vtx 2b isoliert werden konnte (BRETT ET AL., 2003; BÜRK ET AL., 2003) – beides Gene, die regelmäßig in VTEC von Schaf, Ziege und Hirschen nachgewiesen werden können (ISHII ET AL., 2007; MARTIN UND BEUTIN, 2011).

VT 1d wurde von BÜRK ET AL. (2003) erstmalig beschrieben. Zur selben Zeit berichtete die Arbeitsgruppe von OHMURA-HOSHINO ET AL. (2003) von den Varianten VT 1v51 und VT 1v52, die sie in bovinen Isolaten identifizierten. Zwar differieren die codierenden Gene der erwähnten Subtypen um 2 Basenpaare, die abgeleitete Aminosäuresequenz entspricht jedoch der Aminosäuresequenz von VT 1d aus BÜRK ET AL. (2003). Im Gegensatz zu vtx 1c besitzt vtx 1d keine zusätzlichen Nukleotidabweichungen zu dem Prototyp vtx 1. Des Weiteren zeigt dieser Subtyp sowohl homologe Sequenzabschnitte zu vtx 1c als auch zu vtx 1 (92 %

Nukleotidsequenz-Homologie zu *vtx* 1c, 91 % Nukleotidsequenz-Homologie zu *vtx* 1) – ein Hinweis, so die Autoren, dass sich die beiden Subtypen aus einer Vorläuferzelle entwickelt haben könnten (BÜRK ET AL., 2003). Ähnlich wie VT 1c wird der Subtyp VT 1d aus ovinen, bovinen, caprinen wie auch cerviden VTEC-Stämmen isoliert (ISHII ET AL., 2007).

Mittlerweile unterscheidet man bei VT 2 sieben verschiedene Subtypen. Zwei der Subtypen, VT 2a und VT 2b, sind erst seit kurzem in der Studie von SCHEUTZ ET AL. (2012) definiert worden. So stellt der Subtyp **VT 2a** den Prototyp der *vtx* 2-Sequenz bei *E. coli* dar, welcher erstmalig von STROCKBINE ET AL. (1986) beschrieben wurde. Hierbei sind Infektionen mit VTEC, die das Gen *vtx* 2a in sich tragen, häufig mit schweren Krankheitsverläufen wie dem HUS assoziiert (FRIEDRICH ET AL., 2002; JELACIC ET AL., 2003; MORA ET AL., 2012).

Der Subtyp **VT 2b** wurde im Rahmen einer Studie von PERSSON ET AL. (2007) zum ersten Mal als solcher benannt. In den Untersuchungen der Arbeitsgruppe fiel auf, dass der Subtyp VT 2c aus zwei separaten Gruppen von Toxinen besteht. Die Aminosäuresequenzen der untersuchten Toxinvarianten VT 2c-O118-EH250 und VT 2c-O111-PH unterschieden sich von den Sequenzen der beiden anderen Sequenzen VT 2c-O157-FLY16 und VT 2c-O157-C394-03. Zusätzlich zu diesem Unterschied wurden die beiden Toxin-Varianten VT 2c-O118-EH250 und VT 2c-O111-PH im Gegensatz zu den beiden anderen nur in VTEC-Stämmen gefunden, die sowohl „*eae*“-negativ waren als auch niemals bei HUS-Patienten gefunden werden konnten. Aufgrund dieser Tatsache wurde von der Arbeitsgruppe PERSSON ET AL. (2007) vorgeschlagen, diese Toxin-Varianten als VT 2b zu bezeichnen. Im Zuge der umfangreichen molekulargenetischen Studien von SCHEUTZ ET AL. (2012) zur Entwicklung eines einheitlichen Protokolls zur Subtypisierung der Verotoxine sowie einer Vereinheitlichung der Nomenklatur, konnte gezeigt werden, dass die ursprünglich nach PIERARD ET AL. (1998) bezeichnete Toxinvariante VT 2d (auch als *vtx*_{2-O118} oder *vtx* 2d_{non-activatable} bezeichnet) dem Subtypen VT 2b zuzuordnen ist (s. Tabelle 2).

VT 2c wurde erstmalig von SCHMITT ET AL. (1991) als neue Toxinvariante beschrieben. Da sie eine hohe Ähnlichkeit zu VT 2vh-a nach ITO ET AL. (1990) aufzeigte, wurde vorgeschlagen, die Varianten von VT 2vh (VT 2vh-a und VT 2vh-b) dem neuen Toxintyp VT 2c zuzuordnen (WHO, 1991). Ebenso wie VT 2a, ist VT 2c meist mit HUS und HC beim Menschen assoziiert (FRIEDRICH ET AL., 2002; PERSSON ET AL., 2007). Des Weiteren wird der Subtyp oftmals alleine oder in Kombination mit *vtx* 2a sowohl in bovinen als auch in klinischen Isolaten nachgewiesen (BÜLTE ET AL., 2002; FRIEDRICH ET AL., 2002).

Die Bezeichnung **VT 2d** wurde in der Literatur für unterschiedliche Toxine verwendet (SCHEUTZ ET AL., 2012). Im selben Jahr wie PIERARD ET AL. (1998) führte MELTON-CELSA ET AL. (1998) die Bezeichnung VT 2d ein, jedoch für einen anderen Toxintyp. Dabei handelte es sich um das VT 2d des Stammes B2F1 (O91:H21). Dieser von ITO ET AL. (1990) ursprünglich identifizierte Subtyp VT 2vh-a und VT 2vh-b wurde von MELTON-CELSA ET AL. (1998) in VT 2d1 und VT 2d2 bzw. **VT 2d_{activatable}** umbenannt. Die Bezeichnung dieses Toxintyps basiert auf der Fähigkeit, durch Maus oder humanen intestinalen Mucus in seiner biologischen Aktivität – demonstriert an einem signifikanten Anstieg der Zytotoxizität für Verozellen – aktiviert zu werden. Diese Eigenschaft, von Mucus aktiviert werden zu können, unterscheidet VT 2d_{activatable} von den anderen bisher bekannten VT-Subtypen (MELTON-CELSA ET AL., 1996; MELTON-CELSA ET AL., 2002). Als Aktivator von VT 2d_{activatable} wurde Maus-Elastase identifiziert, welche eine große Homologie zu der humanen Elastase IIIB aufweist (KOKAI-KUN ET AL., 2000). Die Aktivierung erfolgt durch eine Abspaltung der letzten beiden Aminosäuren des C-terminalen Endes der enzymatisch aktiven Untereinheit A des Subtypen VT 2d_{activatable}. Hierdurch entsteht das um zwei Aminosäuren verkürzte Fragment des aktivierbaren Phänotyps (MELTON-CELSA ET AL., 2002). Ausschlaggebend für die Aktivierung ist, dass sich an den Positionen 291 und 297 des C-terminalen Endes der Untereinheit A die Aminosäure Serin bzw. Glutaminsäure befinden – die Erkennungsstellen der Elastase. Diese Aktivierung resultiert in einem 35- bis 350- fachen Anstieg der Toxizität für Verozellen (MELTON-CELSA ET AL., 1996) und ist zusätzlich mit einer extrem niedrigen oralen letalen Dosis (50 %) von weniger als 10 Bakterien assoziiert, wenn sie an Streptomycin-behandelte Mäuse verfüttert werden (LINDGREN ET AL., 1993). Jedoch scheint die Erkennungsstelle der Subunit A nicht allein für die Aktivierung verantwortlich zu sein wie Studien von mehreren Arbeitsgruppen zeigen konnten (MELTON-CELSA ET AL., 1996, SCHEUTZ ET AL., 2012). In der Studie von SCHEUTZ ET AL. (2012) konnte die Sequenz des aktivierbaren Typs der Subunit A in zwei vtX_{2a} Varianten, in allen Varianten des Subtyps VT 2g, in 5 Varianten des Subtyps VT 2e sowie in allen 18 Varianten des Subtypen VT 2d gefunden werden. Jedoch konnte gezeigt werden, dass trotz Vorliegens des aktivierbaren Genotyps einige Subtypen wie VT 2e und die Variante Stx 2b-O118-EH250, nicht aktivierbar waren, so dass davon ausgegangen wird, dass die B-Subunit zusätzlich eine wichtige Rolle bei der Aktivierung des Holotoxins zu spielen scheint (SCHEUTZ ET AL., 2012). Tatsächlich konnte in einer Studie von MELTON-CELSA ET AL. (2002) gezeigt werden, dass beim Vorliegen eines chimären Toxins die B-Subunit von VT 2e die Aktivierung von VT 2d_{activatable} verhindern kann. Das Motiv END an Position 14 bis 16 der Subunit B wurde in allen 18 VT 2d-Varianten, im Subtyp VT 2c und

VT 2b gefunden. Die beiden letztgenannten Subtypen besitzen hingegen den aktivierbaren Teil der Subunit A nicht, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die Kombination des aktivierbaren Teils mit dem Motiv END der Subunit B verantwortlich für die aktivierbaren Eigenschaften des Toxins VT 2d_{activatable} sind (SCHEUTZ ET AL., 2012).

Eine weiterführende Problematik stellt sich laut SCHEUTZ ET AL. (2012) bei der Untersuchung auf die Subtypen VT 2a, VT 2c und VT 2d. Diese drei Subtypen sind sehr eng miteinander verwandt und stellen eine große Herausforderung bei dem Design spezifischer Primer sowie optimaler Bedingungen bei der Detektion dar. In der oben erwähnten Studie wurden 30 vtx 2a, 24 vtx 2c und 26 vtx 2d Nukleotidsequenz-Varianten identifiziert. Dabei ist jedoch nicht auszuschließen, dass weitere Varianten dieser Subtypen existieren, die unter Umständen mit den in dieser Studie verwendeten Primern nicht subtypisiert werden können. Des Weiteren kam es zu Kreuzreaktionen, die sich in der Gel-Elektrophorese als sog. Geisterbanden darstellten, besonders in den Fällen, in denen vtx 2c- und vtx 2d-positive Stämme untersucht wurden. Dieser Umstand unterstreicht erneut die Notwendigkeit einer zusätzlichen Stringenz bei der Differenzierung dieser Toxin-Subtypen (SCHEUTZ ET AL., 2012).

Das Toxin **VT 2e** verursacht die Ödemkrankheit der Absatzferkel und ist der am längsten bekannte VT-Subtyp (WEINSTEIN ET AL., 1988). Er wird selten bei humanen VTEC gefunden (MUNIESA ET AL., 2000; PIERARD ET AL., 1991; PIERARD ET AL., 1997A; THOMAS ET AL., 1994). Eine weitere Besonderheit dieses Verotoxins ist, dass es bevorzugt an Gb₄ bindet, aber dennoch in der Lage ist, auch an den Gb₃-Rezeptor zu binden (GYLES, 2007; NATARO & KAPER, 1998). Inwieweit VT 2e-positive VTEC tatsächlich eine Rolle als Krankheitserreger beim Menschen spielen, wird kontrovers diskutiert, da solche Stämme sowohl von Diarrhö-Patienten wie auch von symptomlosen Ausscheidern isoliert werden konnten (FRUTH ET AL., 2002, FRIEDRICH ET AL., 2002), aber nur ausnahmsweise bei HUS-Fällen in Erscheinung treten (THOMAS ET AL., 1994). Laut KRAUSE UND BEUTIN (2008) ist jedoch vtx 2e für ca. ein Prozent der EHEC-Erkrankungen beim Menschen verantwortlich.

In einer Studie von SCHMIDT ET AL. (2000) konnte aus Taubenkot eine neue VT-Variante mit einer Prävalenz von 12,5 % isoliert werden. Dieses Verotoxin-Gen bekam von der Arbeitsgruppe die Bezeichnung **vtx 2f**. Immer wieder konnten aus den unterschiedlichsten Regionen in variierenden Prävalenzen VT 2f-positive *E. coli* nachgewiesen werden (MORABITO ET AL., 2001; KOBAYASHI ET AL., 2002; GROßMANN ET AL., 2005). Lange Zeit konnte jedoch kein direkter Zusammenhang zwischen Erkrankungen beim Menschen und vtx 2f erbracht werden (BEUTIN ET AL., 2004; FRIEDRICH ET AL., 2002; MELLMANN ET AL.,

2005), so dass man davon ausging, das *vtx* 2f ein an Tauben angepasster Subtyp mit einem begrenzten Einfluss auf das Krankheitsbild des Menschen ist. Die Arbeitsgruppe um PRAGER ET AL. (2009) stellte schließlich den Bezug des Subtypens VT 2f zu Diarrhö-assoziierten *E. coli* beim Menschen her.

Im Jahr 2003 beschrieb LEUNG ET AL. erstmalig den Subtypen **VT 2g**. Dieser Subtyp stammt aus einem bovinen *E. coli* O2:H25-Isolat, welches aus dem Kot eines gesunden Rindes isoliert werden konnte. Laut LEUNG ET AL. (2003) weist dieser Subtyp eine hohe Homologie zu der DNS-Sequenz von *vtx* 2 und *vtx* 2c auf, und ist zudem nicht durch Darm-Mucus aktivierbar. In der Studie erwiesen sich nur drei der 409 (0,7 %) getesteten bovinen VTEC-Stämme als *vtx* 2g positiv. Des Weiteren konnte bei keinem der 51 getesteten humanen VTEC-Stämme der neue Subtyp nachgewiesen werden. Das Vorkommen von *vtx* 2g-positiven *E. coli*-Stämmen in Rindern, Hirschen, Lebensmitteln sowie im Ab- oder Oberflächenwasser wurde aus den verschiedenen Regionen berichtet (ASAKURA ET AL., 2001; BEUTIN ET AL., 2007; GARCIA-ALJARO ET AL., 2005; GARCIA-ALJARO ET AL., 2006; KRÜGER ET AL., 2007; SLANEC ET AL., 2009; STEPHAN ET AL., 2008; VU-KHAC AND CORNICK, 2008). Berichte über den Nachweis aus humanen VTEC, die *vtx* 2g positiv sind, sind jedoch eher selten. PERSSON ET AL. (2007) berichtete im Jahr 2007 erstmalig von einem *vtx* 2g-positiven humanen VTEC-Isolat aus Dänemark. Ähnlich niedrige Inzidenzen konnten PRAGER ET AL. (2011) bei der Untersuchung von 2012 humanen *vtx* 2-positiven VTEC-Isolaten aus Deutschland finden – hier waren nur 0,6 % der untersuchten Stämme *vtx* 2g positiv. Eine weitere Besonderheit *vtx* 2g-positiver Isolate ist, dass das C-terminale Ende der *vtx* 2g-Subunit A identisch mit zehn Aminosäuren der *vtx* 2d_{activatable}-Subunit an Position 310–319 ist, welche bei dem Subtypen VT 2d_{activatable} in seiner biologischen Aktivität durch die Elastase des intestinalen Mucus aktivierbar ist. Die B-Subunit hingegen unterscheidet sich bei den beiden Subtypen durch sieben Aminosäuren, was darin resultiert, dass *vtx* 2g durch Mucus in seiner biologischen Aktivität nicht aktivierbar ist (LEUNG ET AL., 2003). Derzeitig sind keine Daten über das pathogene Potential *vtx* 2g-positiver VTEC für den Menschen vorhanden. Es wurden bisher beim Menschen nur *eae*- und *e-hly*-negative *vtx* 2g-Stämme von Patienten mit geringfügiger Diarrhö oder aber asymptomatischen Infektionen isoliert (GARCIA-ALJARO ET AL., 2005; SONNTAG ET AL., 2005; ZHANG ET AL., 2005; PRAGER ET AL., 2011).

Die aufgeführten Verotoxin-Subtypen sind auf temperenten lambdoiden Phagen lokalisiert, so dass durch horizontalen Transfer apathogene *E. coli* zu VTEC transduziert werden bzw. pathogene VTEC ihr *vtx*-Gen wiederum verlieren können (KARCH ET AL., 1992; SCHMIDT ET

AL., 1999; BIELASZEWSKA ET AL., 2007). Somit können immer wieder neue Virulenzgen-Kombinationen entstehen.

Allgemein kann festgehalten werden, dass die Subtypen VT 2a, VT 2c und Vt 2d_{activatable} mit einem erhöhten Risiko assoziiert sind, dass sich HC und/oder HUS entwickeln kann (FRIEDRICH ET AL., 2002; BIELASZEWSKA ET AL., 2006; SCHEUTZ ET AL., 2012). Dagegen scheinen andere Subtypen wie VT 1c, VT 2d (non-activatable) oder VT 2e eine geringere klinische wie auch epidemiologische Relevanz zu haben (FRIEDRICH ET AL., 2002; ZHANG ET AL., 2002; FRIEDRICH ET AL., 2003; PRAGER ET AL., 2005; BEUTIN ET AL., 2008).

2.2.3 Weitere Virulenzgene

In der Wissenschaft besteht ein einheitlicher Konsens darüber, dass die Virulenz von VTEC nicht alleine durch die Verotoxine verursacht wird, sondern noch weitere Virulenzfaktoren für die Ausbildung schwerer Krankheitsverläufe verantwortlich sein müssen (KARCH ET AL., 2009). Der wichtigste Virulenzfaktor ist wahrscheinlich die chromosomale Pathogenitätsinsel der VTEC, der „locus of enterocyte effacement“ (**LEE**) (MCDANIEL ET AL., 1995) mit einer Gruppe von über 40 chromosomalen Genen (FLI, 2011). Diese Pathogenitätsinsel codiert für Virulenzfaktoren, die an der Ausprägung der sogenannten „attaching and effacing“ (A/E)-Läsionen beteiligt sind. Dazu zählen das äußere Membranprotein Intimin, welches durch das *E. coli* attaching and effacing-*(eae)* Gen codiert wird, der translozierte Intiminrezeptor Tir, Proteine eines Typ-III Sekretionssystems sowie diverse Sekretionsproteine (ELLIOT ET AL., 1998). Besonders das auf dem LEE lokalisierte **eae-Gen**, welches für einen als Intimin bezeichneten Adhärenzfaktor codiert, wird von einigen Ausnahmen abgesehen (z. B. vtx 2d_{activatable}-positiven Stämme), regelmäßig bei VTEC-Stämmen nachgewiesen, die schwere klinische Erkrankungen beim Menschen hervorrufen (FLI, 2011). Bei Intimin handelt es sich um ein 94–97 kDa großes äußeres Membranprotein, welches eine enge Adhäsion (attaching) zwischen Bakterium und Darmepithelzelle vermittelt sowie zusätzlich lokale Degenerationen (effacing) der Mikrovilli hervorruft (JERSE UND KAPER, 1991). Momentan sind 19 Varianten dieses Gens bekannt, die unterschiedliche Intimintypen und Subtypen codieren ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$, $\epsilon 1$ / $\beta 2B$, δ/κ / $\beta 2O$, $\gamma 1,0$ / $\gamma 2$, $\epsilon 1$, R/ $\epsilon 2$, ζ , $\eta 1$, $\eta 2$, $\iota 1$, $\mu R/\iota 2$, λ , $\mu \beta$, $\upsilon \beta$, $\xi \beta$, und o) (ABU-BOBIE ET AL., 1998; OSWALD ET AL., 2000; TARR UND WHITTMAM, 2002; ZHANG ET AL., 2002A; BLANCO ET AL., 2003; BLANCO ET AL., 2004; BLANCO ET AL., 2005; RAMACHANDRAN ET AL., 2003; GARRIDO ET AL., 2006; SCHÖNENBRÜCHER, 2006). Diese genetischen Variationen haben möglicherweise eine Spezifität für unterschiedliches Wirtsgewebe zur Folge. Zusätzlich scheint der Intimin-Typ eine Schlüsselrolle in der Tier-Wirtsspezifität zu spielen (FITZHENRY

ET AL., 2002; ZHANG ET AL., 2002A; TORRES ET AL., 2005). So findet man die Intimintypen $\beta 1$ und $\gamma 1$ hauptsächlich in O157:H7 und O26:H11, die eine hohe Spezifität sowohl für menschliches als auch für bovines Gewebe besitzen (BLANCO ET AL., 2004).

Im Gegensatz zu den enteropathogenen *E. coli* (EPEC) ist bei EHEC der LEE nicht obligat vorhanden, wird jedoch bei klinischen Isolaten von Patienten mit HUS oder HC häufig vorgefunden (BÜLTE UND GOLL, 2006). So sind die Serovare O157:H7/H⁻, O26:H11/H⁻, O111:H2/H⁻, O103:H2/H8/H⁻, O145:H28/H⁻ sowie O118:H16 regelmäßig mit dem *eae*-Gen assoziiert (BÜLTE, 2002). In einer Studie von BEUTIN ET AL. (2004), in welcher über eine Periode von drei Jahren in Deutschland VTEC-Stämme von Patienten weitergehend differenziert wurden, konnte sogar bei etwa 95 % der HUS-Isolate das *eae*-Gen nachgewiesen werden. Hingegen war bei Isolaten von Patienten mit unblutiger Diarrhö das *eae*-Gen nur in etwa 67 % der Fälle zu identifizieren (BEUTIN ET AL. 2004).

Des Weiteren besitzen VTEC ein LEE-codiertes Typ III-Sekretionssystem (TTSS), welches eine Art Kanal durch die Bakterienmembran bildet und so den Bakterien erlaubt, Virulenzfaktoren in die Wirtszelle einzuschleusen (BOLTON ET AL., 2011). Zu diesem Sekretionssystem gehören die Gene *sepA-I*, *pas* und *esp*, die für Proteine des Typ III-Sekretionssystems codieren (JARVIS UND KAPER, 1996; KRESSE ET AL., 1998). Die Translokationsproteine EspA, EspB und EspD setzen hierbei die ca. 20 nm große Pore des Esc (*E. coli* secretion)-Komplexes, welche durch die äußere und innere Bakterienmembran zieht, fort (DONNENBERG ET AL., 1993; KENNY UND FINLAY, 1995; KENNY ET AL., 1996; LAI ET AL., 1997). Das EspA ummantelt hierbei das nadelartig aus der äußeren Bakterienmembran ragende EscF, wohingegen EscB und EscD in die Membran der Zielzelle integriert werden und dort ebenfalls eine Art Pore bilden, die den Durchtritt von Effektorproteinen ermöglichen (GAUTHIER UND FINLAY, 2002). Das Protein Pas ist hierbei für die Sekretion der Esp-Proteine notwendig (KRESSE ET AL., 1998). Ein weiteres Protein des TTSS ist der translozierte Intimin-Rezeptor **Tir**, welcher im Rahmen einer Infektion über das TTSS in die Wirtszelle eingeschleust, in deren Membran integriert wird und dort als Rezeptor für das Intimin dient (KENNY ET AL., 1997). Insgesamt spielen die Proteine des Typ III-Sekretionssystems alle zusammen eine Rolle bei der Entstehung von Darmläsionen im Rahmen einer EHEC-Infektion (HAYASHI ET AL., 2001).

Neben zwei weiteren Pathogenitätsinseln HPI (High-pathogenicity island) und TAI (Tellurite resistance- and adherence-conferring island) befinden sich weitere Virulenzfaktoren auf einem extrachromosomalen EHEC-spezifischen Plasmid pO157. Dieses kann effizient durch

horizontalen Gentransfer zwischen *E. coli*-Stämmen ausgetauscht werden. Auf dem 92 kb großen Plasmid pO157 befindet sich u. a. das EHEC-spezifische Hämolyisin (***e-hly***), welches von anderen Autoren auch synonym als Ehx (EHEC-*E. coli*-Toxin und *ehxA*-Gen) bezeichnet wird (NATARO UND KAPER, 1998). Das Enterohämolyisin ist ein porenbildendes Zytolysin, welches eukaryotische Zellen zerstört (JÜRGENS ET AL., 2002). Zusätzlich zu dieser Eigenschaft stellt es durch Lyse der Erythrozyten eine Eisenquelle für die Bakterien bereit (BEUTIN ET AL., 1989), was zu der Vermutung geführt hat, dass VTEC hierdurch im Intestinum ein Selektionsvorteil geboten wird (GYLES ET AL., 2004). Das Enterohämolyisin wird zwar häufig bei EHEC und somit in Verbindung mit HUS und HC nachgewiesen (BIELASZEWSKA ET AL., 2008; PRADEL ET AL., 2008), dennoch ist dessen pathogenetische Bedeutung als Virulenzfaktor bisher noch nicht abschließend geklärt. So konnten BOERLIN ET AL. (1999) in ihren Untersuchungen keinen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Auftreten von klinischen Erscheinungen beim Menschen und dem Nachweis von *e-hly* feststellen. PRADEL ET AL. (2008) hingegen konnten in ihrer Studie bei 60 Prozent der Patienten mit HUS oder mit HC das *e-hly* beobachten. Zu ähnlichen Ergebnissen kam SCHREIBER (2008), die bei 70 Prozent der VTEC-Isolate aus humanen Stuhlproben *e-hly* detektieren sowie bei 45 Prozent *e-hly* und *eae* bestätigen konnten. Auch BÜLTE (2001) konnte bei 90 Prozent der HUS bzw. HC-Isolate das *e-hly* detektieren, jedoch lag die Nachweisrate bei Isolaten symptomloser Ausscheider in vergleichbarer Höhe.

Des Weiteren befinden sich auf dem Plasmid weitere Virulenzgene, für die eine pathogenetische Bedeutung diskutiert wird. Dabei handelt es sich um Virulenzgene (-operone) zur Ausbildung eines Typ II Sekretionssystems (*etpC-O*) (BURLAND ET AL., 1998), eines potentiellen Adhesins (*toxB*) zur vollständigen Ausbildung der Adhärenz von O157:H7 (TATSUNO ET AL, 2001), einer Serinprotease (*espP*) zur Spaltung des Gerinnungsfaktors (BURLAND ET AL., 1998), einer bifunktionellen Katalase-Peroxidase (*katP*) (BRUNDER ET AL., 1996), eines C1 Esterase Inhibitors (*stcE*) (LATHEM ET AL., 2002) sowie von Enzymen (*ecf*) zur Modifizierung der Lipopolysaccharidstruktur zur Optimierung der Membranstruktur und -integrität (YOON ET AL., 2005).

2.2.4 Serovare

Die Serotypisierung nach dem modifizierten Kaufmann-Schema ist eine übliche Methode zur epidemiologischen und klinischen Einteilung von *E. coli* sowie auch VTEC (KUHNERT ET AL., 2000). Nach diesem Schema werden VTEC nach ihren Oberflächen (O)-, Kapsel (K)- und Geißel (H)-Antigenen bezeichnet. Die somatischen O-Antigene werden durch die

Lipopolysaccharide, die sich auf der Zelloberfläche befinden, bestimmt, wohingegen die H-Antigene durch die Flagellen-Proteine definiert werden. Gemäß dem modifizierten Kaufmann-Schema werden sie heute nach ihren 181 Oberflächen-, ca. 100 Kapsel- und 56 Geißel-Antigenen in verschiedene Serovare eingeteilt (BÜLTE UND GOLL, 2006; STENUTZ ET AL., 2006). Dabei definieren die O-Antigene die Serogruppe, während die verschiedenen Kombinationen aus O- & und H-Antigenen den Serotyp eines *E. coli*-Isolates festlegen (NATARO UND KAPER, 1998).

In den Vereinigten Staaten können über 70 % und in der Europäischen Union an die 50 % der Fälle mit Erkrankungen von VTEC beim Menschen dem Serovar O157 zugeschrieben werden (EFSA, 2009; MEAD ET AL., 1999). Neben dem Serotyp O157 sind mittlerweile über 400 non-O157 Serotypen bekannt, die mit einer Erkrankung des Menschen wie der Diarrhö, HC und HUS assoziiert sind (SCHEUTZ UND STROCKBINE, 2005). Besonders hervorzuheben sind laut EFSA (2007) jedoch Stämme der Serogruppen O157, O26, O103, O91, O154 und O111, die ein besonderes Risiko für die öffentliche Gesundheit darstellen können. In diesem Zusammenhang muss jedoch erwähnt werden, dass Stämme der erwähnten Serogruppen nicht zwangsläufig pathogen sein müssen, wenn sie aus dem Nahrungsmittel oder dem lebenden Tier isoliert werden. Folglich ist die alleinige Serotypisierung nicht geeignet, um ein Risiko für die öffentliche Gesundheit zu identifizieren (EFSA, 2007), sondern muss mit anderen Methoden zur Charakterisierung des Pathogenitätspotentials kombiniert werden.

2.2.4.1 Serovare beim Menschen

Die herausragende Stellung die VTEC unter den darmpathogenen *E. coli* in Deutschland einnehmen (RKI, 1996 UND 2008; BÜLTE UND HECKÖTTER, 1997), ist an der Meldepflicht nach §7 Infektionsschutzgesetz (IfSG) zu erkennen. Hier werden „*Escherichia coli*, enterhämorrhagische Stämme (EHEC)“ separat von „*Escherichia coli*, sonstige darmpathogene Stämme“ erfasst. Im Jahr 2010 wurden 918 EHEC-Erkrankungen (ohne HUS) und 65 HUS-Fälle sowie 5.843 Erkrankungen durch sonstige darmpathogene *E. coli* nach IfSG gemeldet (RKI, 2010). Im darauffolgenden Jahr ereignete sich in Deutschland ein großer Ausbruch von EHEC-Gastroenteritis, der durch den bis dato wenig bekannten und sehr seltenen EHEC-Serotyp O104:H4 verursacht wurde. Durch Analyse der DNA-Sequenz wurde festgestellt, dass dieser Ausbruchsstamm wesentlich mehr Gemeinsamkeiten mit den enteroaggregativen *E. coli* (EaggEC) als mit den herkömmlichen EHEC aufweist (MELLMANN ET AL., 2011). Aufgrund dieser Besonderheit wird er auch als enteroaggregativer EHEC O104:H4 oder EaggEC O104:H4 bezeichnet. Somit ist dieser Stamm eine Rekombinante aus

einem enteroaggregativen und einem enterohämorrhagischen *E. coli*, welcher bisher lediglich beim Menschen nachgewiesen werden konnte (BfR, 2011A). Im Rahmen des Ausbruchs erkrankten mehr als 20 % der Patienten an HUS (880 Fälle) – 4.907 Menschen entwickelten eine EHEC-Gastroenteritis (RKI, 2012). Als Ursache des Ausbruchs werden importierte Bockshornkleesamen aus Ägypten, welche in einem niedersächsischen Gartenbaubetrieb und von Privatpersonen zur Sprossenproduktion verwendet wurden, angesehen (BfR, 2011A). Zusätzlich zu diesem Übertragungsweg spielten im Verlauf des Ausbruchs auch Mensch-zu-Mensch Übertragungen sowie sekundär kontaminierte Lebensmittel eine Rolle (RKI, 2012). Gemessen an der Zahl der aufgetretenen HUS-Fälle handelt es sich bei diesem Ausbruch um den größten bekannten derartigen Ausbruch weltweit (RKI, 2012). Im Jahr 2010 wurden in 34 % der Fälle Angaben zur Serogruppe des Erregers gemacht. Am häufigsten wurde die Serogruppe O26 (17 %), gefolgt von O157 (14 %), O91 (12 %), O103 (10,4 %), ONT (6,5 %), O145 (4,9 %), O146 (3,9 %), O111 (3,9 %), O128 (1,9 %), O125 (1,9 %) und anderen Serogruppen (23,9 %) nachgewiesen (RKI, 2011). Zusätzlich sind in Deutschland regional einige Gebiete wie Bayern, Teile von Nordrhein-Westfalen, Schleswig-Holstein und Rheinland-Pfalz zu nennen, die gegenüber der bundesweiten Inzidenz ein stark erhöhtes Vorkommen von EHEC-Erkrankungen erkennen lassen (RKI, 2011). Festzuhalten bleibt, dass die Inzidenz starken saisonalen und regionalen Schwankungen unterliegt, wobei eine Assoziation auf Kreisebene zwischen Erkrankungsinzidenz und Rinderdichte besteht (RKI, 2011). Die Serogruppen-Verteilung bei EHEC-Erkrankungen variiert jedoch 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 (O26, O91, O103, O111, O128, O145), dominieren bei extraintestinalen Komplikationen wie dem HUS beinahe weltweit Stämme der Serogruppe O157 (RKI, 2008A; STATENS SERUM INSTITUT, 2003; LOCKING ET AL., 2003).

2.2.4.2 Serovare bei den Hauswiederkäuern

Aus dem Zoonosebericht für das Jahr 2009 geht hervor, dass von den zehn häufigsten Serovaren von VTEC beim Menschen O26 aus Rindfleisch, O128 aus Wildfleisch, O55, O91 und O103 aus Hackfleisch, O157 aus stabilisierten Fleischerzeugnissen aus Rindfleisch und O26 aus Rohmilch-Weichkäse aus Ziegenmilch isoliert wurden. Bei Rindern und Schafen konnten die Serovare O26 und O103 identifiziert werden (BfR, 2011). Diese in tierischen Lebensmitteln bzw. bei Tieren nachgewiesenen VTEC-Serovare machten im Jahr 2009 66 % der an das RKI übermittelten Serovare aus menschlichen Erkrankungen aus (BfR, 2011). Laut BfR (2011) unterstreicht dies die Bedeutung von Lebensmitteln bzw. Tieren im

Infektionsgeschehen des Menschen. Eine weitere Studie vom BfR im Jahr 2009, in welcher 140 VTEC-Isolate aus Fleischproben von Rotwild, Wildschwein und Hasen untersucht wurden, zeigt, dass Wildtiere als natürliches Reservoir für humanpathogene EHEC und VTEC eine Rolle spielen (BEUTIN UND MIKO, 2009). Im Rahmen dieser Studie konnten 57,1 % der Wildfleisch-Isolate zu 18 Serotypen gezählt werden, die einen humanpathogenen Bezug haben (EFSA, 2007; SCHEUTZ UND STROCKBINE, 2005). In einer Studie von MARTIN UND BEUTIN (2011) konnte des Weiteren gezeigt werden, dass VTEC-Serotypen, die eng mit einer bestimmten Tierart assoziiert sind, auch regelmäßig in den Lebensmitteln der entsprechenden Tierart zu finden sind. So sind die Serotypen O128:H2 und O146:H21 mit Schafen, der Serotyp O76:H19 mit Ziegen und die Serotypen O21:H21, O174:H8 und O146:H28 mit Wildwiederkäuern assoziiert (DJORDJEVIC ET AL., 2004; BEUTIN ET AL., 1993; BLANCO ET AL., 2003; BEUTIN ET AL., 2008; FRATAMICO ET AL., 2004; ISHII ET AL., 2007; LEHMANN ET AL., 2006; ZWEIFEL ET AL., 2004). Bei Rindern werden die Serotypen O113:H21, O22:H8, O174:H21, O178:H19, O113:H4 und O91:H14 weltweit sowohl in von ihnen stammenden Lebensmitteln als auch in ihrem Kot regelmäßig nachgewiesen (BEUTIN ET AL., 1993; HUSSEIN UND SAKUMA, 2005; IRINO ET AL., 2005; PRADEL ET AL., 2000; SANDHU ET AL., 1996; ZWEIFEL ET AL., 2005). Aufgrund solcher Ergebnisse ist anzunehmen, dass die aus Fleisch isolierten EHEC/VTEC auf eine fäkale Kontamination durch das jeweilige Erzeugertier zurückzuführen sind (BEUTIN UND MIKO, 2009; MARTIN UND BEUTIN, 2011). In den folgenden Tabellen (s. Tabelle 3, Tabelle 4, Tabelle 5, Tabelle 6) finden sich Übersichten über die Serotypen von VTEC, die bisher bei Wildwiederkäuern, Rindern, Schafen und Ziegen isoliert werden konnten (KEENE ET AL, 1997; BLANCO ET AL., 2001; FISCHER ET AL., 2001; BLANCO ET AL., 2003; BRETT ET AL., 2003; GOBIUS ET AL., 2003; REY ET AL., 2003; VETTORATO ET AL., 2003; BLANCO ET AL., 2004; DUNN ET AL., 2004; ZWEIFEL ET AL., 2004; CORTÉS ET AL., 2005; HUSSEIN UND SAKUMA, 2005; BIELASZEWSKA ET AL., 2006; COOKSON ET AL., 2006; LEHMANN ET AL., 2006; REY ET AL., 2006; BEUTIN ET AL., 2007; GARCÍA-SÁNCHEZ ET AL., 2007; ISHII ET AL., 2007; ISLAM ET AL., 2008; MIKO ET AL., 2009; SÁNCHEZ ET AL., 2009; HORCAJO ET AL., 2010; KRÜGER ET AL., 2011; MARTIN UND BEUTIN, 2011; EGGERT ET AL., 2012; MORA ET AL., 2012).

Tabelle 3: Übersicht über die Serotypen von VTEC, die bisher bei **Wildwiederkäuern** isoliert werden konnten. Serotypen, die schon bei VTEC-Stämmen des Menschen nachgewiesen wurden, sind fett hervorgehoben. Grau hinterlegte Serotypen wurden nachweislich schon in Verbindung mit dem Krankheitsbild des HUS beim Menschen gefunden (s. Seite 26).

O2:HNT, H6, H21, H ⁻	O40:H8	O130:H30
O5:H ⁻	O43:H2	O141:H2
O6:H10, H34	O64:H34	O142:H16
O7:H21, H31	O74:H28	O145:H28
O8:H19, H21	O75:H8, H40	O146:H28, H21
O11:H5, H48, HNT	O88:H8, H25, H⁻	O153:H4
O15:H27	O91:H6, H8, H14	O153:H25
O17/77:H18	O91:H21	O154:H31
O18:H49	O101:H7	O157:H7
O21:H21, H22	O103:H2	O174:H8
O22:H1	O110:H31, H45, HNT	O178:H7, HNT
O22:H8	O113:H21	O179:H8
O26:H11	O117:H4	ONT:H2, H8, H14, H21, H28, H31, H45, H48, H52, HNT
O27:H30	O121:H19	ONT:H⁻
O29:H27	O128:H ⁻	OR:H19, H21, H28, H30, H ⁻
O36:H14	O128:H2	

Tabelle 4: Übersicht über die Serotypen von VTEC, die bisher bei **Rindern** isoliert werden konnten. Serotypen, die schon bei VTEC-Stämmen des Menschen nachgewiesen wurden, sind fett hervorgehoben. Grau hinterlegte Serotypen wurden nachweislich schon in Verbindung mit dem Krankheitsbild des HUS beim Menschen gefunden (s. Seite 26).

O1:H18, H20	O68:H14, H⁻	O130:H9, H11, H38, H43
O2:H5, H7, H8, H12, H25, H27, H32, H39, H45, H49, H⁻	O69:H11, H⁻	O131:H2
O2:H29	O70:H8, H11, H⁻	O132:H2, H9, H18, H49, H⁻
O3:H7, H ⁻	O73:H18	O133
O4:H4, H7, H11, H16, H25, H⁻	O74:H19, H28, H29, H42, H52, H ⁻ , HNT ⁻	O136:H1, H12, H16, H19, H ⁻
O5:H6, H7, H11, H27	O75:H1, H8, H10, H19	O138:H48
O5:H⁻	O76:H8, H19, H21, H25	O139:H8, H19, H51
O6:H3, H8, H10, H34, H49, H⁻	O76:H7	O140:H21, H32
O7:H4, H6, H40	O77:H18, H41	O141:H2, H7, H8, H21, H⁻
O8:H2, H7, H8, H9, H16, H19, H25, H30, H35, H⁻	O79:H19, H ⁻	O145:H8, H16, H19
O8:H19, H21	O80:H12, H19, H31, H⁻	O145:H25, H28, H ⁻
O9:H4, H51, H⁻	O81:H28, H31	O146:H1, H8, H21, H32, H⁻
O10:H21, H ⁻	O82:H2, H8, H40, H⁻, HNT⁻	O147:H11, H29
O11:H8, H48, H ⁻	O84:H2, H8, H28, H⁻	O148:H8
O15:H4, H7, H11, H16, H18, H19, H21, H27, H⁻	O85:H⁻	O149:H1, H8, H19
O16:H2, H21	O86:H26, H28	O150:H8, H⁻
O17:H18, H21, H45, H41	O87:H8, H16, H31, H ⁻	O152:H ⁻
O18:H11, H ⁻	O88:H8, H21, H25, H⁻	O153:H7, H9, H11, H12, H19, H21, H31, H32, H42, H⁻, HNT⁻, HR
O19:H ⁻	O89:H38, H⁻	O153:H25
O20:H2, H7, H16, H19	O90:H24, H⁻	O156:H7, H8, H19, H21, H25, H46, H⁻
O21:H21	O91:H7, H19, H49	O157: H8
O22:H1, H2, H8, H19, H16, H21, H40, H⁻	O91:H10, H14, H21, H ⁻	O157:H7, H ⁻
O22:H8	O92:H ⁻	O159:H28
O23:H15, H ⁻	O96:H19, H ⁻	O160
O25:H5, H19	O98:H25	O162:H4, H7, H21, H28
O26:H21, H32, H42	O98:H⁻	O163:H2, H9, H21, H⁻
O26:H11, H⁻	O101:H4	O163:H19
O28:H9, H21, H40, H⁻	O102:H21	O165:H21, H25, H⁻
O29:H34	O103:H16, H28, H39, H42	O166:H28, H⁻
O32:H7, H16, H25, H ⁻	O103:H2, H21, H⁻	O167:H21
O32/83:H7	O104:H11, H21	O168:H8
O35:H2, H21, H31	O105:H18	O169:H19
O37:H10	O106:H42, H ⁻	O170:H8
O38:H16, H39	O108:H7	O171:H25, H ⁻
O38:H21	O109:H16, H ⁻	O171:H2
O39:H7, H8, H21, H40, H48, H49, H⁻	O110:H2, H40, H ⁻	O172:H21, H⁻
O40:H8, H21, H⁻	O111:H2, H11	O174 (OX3):H2, H7, H16, H39, H43, H49, H⁻
O41:H2, H14, H51, H⁻	O111:H8, H⁻	O174:H8, H21, H ⁻
O42:H21, H25	O112:H2, H19	O175 (OX7):H8, H15, H16
O43:H2	O113:H2, H7, H19	OX177:H⁻
O44:H25, H28, H ⁻	O113:H4, H21, H⁻	O178:H19
O45:H2, H8, H9, HNT, H⁻	O115:H8, H18	O185:H7
O46:H2, H38, H⁻	O116:H9, H10, H21, H28, H⁻	OX6:H2
O49:H12, H⁻	O117:H4, H7, H21, H28, H⁻	OX8:H ⁻
O51:H2	O118:H16, H30, H⁻	"O"K84:H19

Tabelle 4: Fortsetzung.

O52:H ⁻	O119:H8, H25, H⁻	ONT:H1, H2, H4, H7, H8, H10, H11, H14, H16, H18, H19, H21, H28, H29, H30, H41, H48, H49, HNT
O53:H2	O120:H2, H18, H19, H42, H ⁻	ONT:H2, H⁻
O54:H ⁻	O121:H7, H15, H⁻	OR:H2, H8, H18, H21, H31, H ⁻
O55:H17	O123:H11, H16	OX3:H8
O57:H21	O124:H19	
O60:H19	O125:H19	
O63:H19	O126:H8, H19, H20, H21, H27, H⁻	
O64:H5, H34, H ⁻	O127:H21, H ⁻	
O65:H16, H⁻	O128:H31, H35, H⁻	

Tabelle 5: Übersicht über die Serotypen von VTEC, die bisher bei **Schafen** isoliert werden konnten. Serotypen, die schon bei VTEC-Stämmen des Menschen nachgewiesen wurden, sind fett hervorgehoben. Grau hinterlegte Serotypen wurden nachweislich schon in Verbindung mit dem Krankheitsbild des HUS beim Menschen gefunden (s. Seite 26).

O2:H29	O75:H ⁻	O128:H8, H10, H16, H21, HNT
O4:H10, H25	O76:H19, H⁻	O128:H2, H ⁻
O4:H ⁻	O77:H4, H⁻	O136:H20, H40, H ⁻
O5:H ⁻	O79:H14	O141:H⁻
O5:H28, H19, HR	O81:H26	O142:H11
O6:H10; H12, H28, H49	O84:H16, H⁻	O146:H21, H⁻
O6:H2, H ⁻	O85:H49	O146:H8
O8:H9, H16, H19, H30, H49, HNT	O87:H2, H16, H⁻	O152:H21
O8:H8, H19, H21	O88:H8, H12, H⁻	O153:H8, H21, H25, H⁻
O9:H ⁻	O90:H21, H24, H⁻	O156:H11, H25, H⁻
O11	O91:H2, H14, H16, H28, H29	O157:H21, H ⁻
O15:H ⁻	O91:H21, H ⁻	O157:H7
O16:H ⁻	O98:H7	O158:HR
O20:H7, H⁻	O103:H2, H38	O163:H11, H19, H⁻
O21:H21; H28	O103:H ⁻	O165:H-
O26:H11	O104:H7	O166:H28, H49, H⁻
O26:H⁻	O106:H2, H18, H20, HR	O168: H21
O30:H12	O110:H17, H28, H⁻	O172:H ⁻
O35:H7	O112:H10, H19, H21, H⁻	O174:H2, H4, H21
O42:H?	O113:H4	O174:H8
O45:H38	O117:H8, H⁻	ONT:H7, H16, H ⁻
O49:H ⁻	O118:H12	ONT:H4, H7, H8, H9, H10, H12, H14, H16, H19, H21, H29, H49, HNT, HR
O52:H12, H45	O119:H25, H⁻	ONT:16, 25, H⁻
O55:H2, H20, H21	O120:H-	OR:H2, H4, HR, H ⁻ OX3:H2, HR
O55:H ⁻	O121:H2	OX3:H8
O65:H7	O121:H10	OX176:H4, H ⁻
O69:H8	O123:H8, H10, H11, H⁻	OX177:H11
O71:H12, H⁻	O125:H14, H26, H⁻	
O75:H8, H40, H55, H⁻	O126:H8	

Tabelle 6: Übersicht über die Serotypen von VTEC, die bisher bei **Ziegen** isoliert werden konnten. Serotypen, die schon bei VTEC-Stämmen des Menschen nachgewiesen wurden, sind fett hervorgehoben. Grau hinterlegte Serotypen wurden nachweislich schon in Verbindung mit dem Krankheitsbild des HUS beim Menschen gefunden (s. Seite 26).

O5:H19, H21	O81:H21, H36, H ⁻	O154:H25
O5:H⁻	O85:H1	O157:H7
O7:H21	O87:H38	O161:H36
O18:H21, H28	O88:H8	O166:H28
O27:H18	O91:H14 , H28	O173:H8
O32:H25	O110:H19	O174:HNT
O39:H8	O119:H19	O174:H8
O58:H21	O126:H8	O175:H38
O64:H21	O128:H19	ONT:H2, H4, H8, H19, H21, H28, HNT
O74:H ⁻	O128:H2; H⁻	ONT:H⁻
O75:H8	O145:H21, H24	
O76:H19, HNT	O146:H21, H⁻	

2.2.5 Nachweismethoden

Die relative Unempfindlichkeit des Erregers gegenüber verschiedenen Umwelteinflüssen sowie die für eine humane Erkrankung notwendige sehr geringe orale Infektionsdosis, zumindest einiger Stämme von 10 bis 100 Zellen absolut, machen es notwendig, den Erreger mit entsprechend empfindlichen und spezifischen Methoden nachzuweisen. Erschwerend kommt hinzu, dass in Matrices wie klinischen Proben, Kot, Umgebungsproben und Nahrungsmitteln ein hoher Grad an mikrobieller Hintergrundflora sowie auch an natürlichen Inhibitoren vorhanden sein können, die die Isolierung und den anschließenden Nachweis von VTEC enorm zu beeinflussen vermögen. Zusätzlich können VTEC in vielen Proben aufgrund der Lebensmittelverarbeitung (z. B. pH, Temperatur) oder der Anwesenheit von antimikrobiellen Substanzen in klinischem Untersuchungsmaterial als gestresste oder vorgeschädigte Zellen vorliegen. Aufgrund dessen ist es, besonders bei solchen Proben, unerlässlich einen Voranreicherungsschritt durchzuführen, da ansonsten das Risiko falsch-negativer Ergebnisse erhöht wird (PEN, 2007).

Der alleinige Einsatz konventioneller kultureller Methoden (z. B. MacConkey-Agar, Sorbitol MacConkey-Agar (SMAC-Agar), Cefixime Tellurite Sorbitol MacConkey-Agar (CT-SMAC-Agar), Hämorrhagischer Colitis-Nährboden (HC-Agar) nach SZABO (1986)) ist deshalb nur eingeschränkt verwendbar, so dass eine sichere Diagnostik auf den Nachweis der wichtigen Pathogenitätsmerkmale (z. B. Verotoxin) ausgerichtet werden muss. Trotz dieser Einschränkungen hat sich in vielen Studien die kulturelle Untersuchung vor allem auf dem MacConkey-Agar bewährt (ROOPNARINE ET AL., 2007; OPORTO ET AL., 2008; DANASHREE UND MALLYA., 2008).

Für epidemiologische Fragestellungen sind die Erregerisolierung und die weitergehende Differenzierung (z. B. Serotypisierung) von entscheidender Bedeutung. In einem Vergleich von PCR, ELISA und Cytotoxizitätstest mit einer Reihe unterschiedlicher Probenmatrizes zeigte die PCR eine deutlich höhere Sensitivität (BEUTIN ET AL., 2007). In diesem Zusammenhang muss erwähnt werden, dass Prävalenzstudien von non-O157-VTEC immer noch sehr begrenzt sind, da die meisten Surveillance-Programme nur die nicht-Sorbitol-fermentierenden *E. coli* O157 miteinschließen. Dieses liegt darin begründet, dass in der Routinediagnostik keine einheitlichen Methoden zur Isolierung der non-O157 VTEC vorliegen, und somit diese Gruppe der VTEC oftmals unterschätzt wird bzw. unterschätzt worden ist (OPORTO ET AL., 2008). Für die primäre Isolierung der non-O157 VTEC können Methoden verwendet werden, die ursprünglich für den Nachweis von O157 entwickelt worden sind (BETTELHEIM, 2007). Hierbei ist es jedoch wichtig, dass zur Isolierung von non-O157 VTEC eine Vielzahl an Untersuchungsmethoden zur Anwendung kommt (ROOPNARINE ET AL., 2007).

2.3 Reservoir für VTEC

2.3.1 Landwirtschaftliche Nutztiere

Als wichtigstes natürliches Reservoir für VTEC stehen vor allem landwirtschaftliche Nutztiere wie Rinder, Schafe und Ziegen im Mittelpunkt (BÜLTE, 2004A; CAPRIOLI ET AL., 2005; EFSA, 2007; VU-KHAC UND CORNICK, 2008). Bei diesen geht man davon aus, dass VTEC bei erwachsenen Tieren zur normalen Darmflora gehören, da sie keine Krankheitssymptome verursachen (NAYLOR ET AL., 2005); Erkrankungsfälle wurden, wenn überhaupt, überwiegend bei Kälbern beschrieben (BALJER ET AL., 1990, SEPEHRISERESHT ET AL., 2009). In einer Untersuchung von CRISTANCHO ET AL. (2008) konnte sogar bei allen untersuchten Kälbern VTEC nachgewiesen werden. Das Serovar O157:H7 war jedoch mit 3,2 % nur vereinzelt vertreten. WIELER ET AL. (2007) konnte im Rahmen einer epidemiologischen Longitudinalstudie bei 221 Kälbern im Alter von einer bis zwölf Wochen bei nur 18,2 % der Rektalabstriche der Kälber das Verotoxin-Gen nachweisen. Jedoch konnten sie signifikante Korrelationen zwischen dem Auftreten von Durchfall und der Ausscheidung von EHEC-typischen Virulenzfaktoren bei mehreren Altersstufen ermitteln. In der ersten Lebenswoche wurde hierbei das EHEC-Hämolysin, in der ersten und zehnten Lebenswoche das *eae*-Gen und in der vierten Lebenswoche das Verotoxin-Gen nachgewiesen.

Untersuchungen von Kotproben von Milchrindern zeigen weltweit Prävalenzen von VTEC O157 von 0,2 bis 48,8 % sowie VTEC non-O157 von 0,2 bis 48,8 % bzw. 0,4 bis 74,0 %

(HUSSEIN UND SAKUMA, 2005). Ähnliche Prävalenzen findet man auch bei Untersuchungen von Fleischrindern (HUSSEIN UND BOLLINGER, 2005). BEUTIN ET AL. (1993) und ZSCHÖCK ET AL. (2000) fanden vor allem bei Schafen und Ziegen hohe Prävalenzen. BEUTIN ET AL. (1993) isolierten im Rahmen ihrer Studie bei 66,6 % der Schafe, bei 56,1 % der Ziegen, jedoch nur bei 21,1 % der Rinder VTEC. Ähnlich sieht die Situation bei ZSCHÖCK ET AL. (2000) aus. Diese isolierten VTEC bei 32,1 % der Schafe, bei 75,3 % der Ziegen und wiederum nur bei 18 % der Rinder. CORTES ET AL. (2005) hingegen fanden bei gesunden Ziegen eine Prävalenz von 47,7 %. Die Unterschiede für das Vorkommen von VTEC innerhalb unterschiedlicher Studien muss nicht immer methodische Aspekte beinhalten, sondern kann möglicherweise auch dadurch zustande kommen, dass die Ausscheidung von VTEC durch geographische Unterschiede, die Nahrung, das Alter der Tiere sowie Umweltbedingungen und jahreszeitliche Schwankungen beeinflusst wird (KUDVA ET AL., 1997). Ebenso wie bei Kälbern konnte gezeigt werden, dass VTEC bei Lämmern, sowohl bei Ziegen als auch bei Schafen, als Krankheitsauslöser eine untergeordnete Rolle spielen (ORDEN ET AL., 2003; CORTES ET AL., 2005).

Festzuhalten bleibt, dass Rinder als die wichtigste Infektionsquelle für den Menschen mit VTEC angesehen werden; dies gilt insbesondere für VTEC O157 (CAPRIOLI ET AL., 2005). Zusätzlich scheint die Anwesenheit von VTEC O157 durch das Alter der Tiere und die Jahreszeit beeinflusst zu werden. So scheiden Kälber wesentlich länger und intensiver aus als adulte Rinder (CRAY UND MOON, 1995). Darüber hinaus steigt die Ausscheidung vor allem nach dem Absetzen der Kälber an (GARBER ET AL., 1995; HANCOCK ET AL., 1998; SHINAGAWA ET AL., 2000). Des Weiteren ist die Ausscheidung in den Sommermonaten wesentlich höher (BONARDI ET AL., 1999; CHAPMAN ET AL., 1997; HANCOCK ET AL., 1997). Eine ähnliche Situation findet man bei der fäkalen Ausscheidung von VTEC non-O157. Einigen Untersuchungen zufolge scheint diese bei Rindern ebenfalls von der Jahreszeit und der Ernährung abhängig zu sein (CIZEK ET AL., 1999; STEVENS ET AL., 2002; THRAN ET AL., 2001; VANSELOW ET AL., 2005). Neue Untersuchungen vom FLI hingegen zeigen, dass die Fütterung keinen Einfluss auf das Vorkommen von VTEC/EHEC haben soll. So konnten zwischen Gruppen, die einerseits rohfaserreiches Futter (Grassilage) und andererseits überwiegend Kraftfutter erhielten, keine signifikanten Unterschiede im Vorkommen von *E. coli* nachgewiesen werden. VTEC konnte jedoch von beiden Gruppen isoliert werden. Ebenfalls konnten sie in ihren Untersuchungen zeigen, dass die Art der Rinderhaltung keinen Einfluss auf das Vorkommen von VTEC/EHEC in Rindern nimmt (FLI, 2010).

2.3.2 Wildwiederkäuer

In den Jahren zwischen 2002 und 2006 wurden in Wildfleischproben vermehrt VTEC nachgewiesen. Danach lag der Anteil der belasteten Proben 2005 bei Wildfleisch mit 14,8 % deutlich höher als bei Rindfleisch. Mit den VTEC-Serovaren O26:H11, O128:H2 und O103:H2 wurden auch Stämme nachgewiesen, die als Erreger von schweren Erkrankungen des Menschen bereits bekannt sind (BrR, 2007). Diese Ergebnisse konnten in einer Studie von MIKO ET AL. (2009) bestätigt werden. Diese untersuchten u. a. VTEC-Stämme, die in den Jahren zwischen 1998 und 2006 in Deutschland aus Hirschfleisch isoliert werden konnten und identifizierten ebenfalls die oben bereits erwähnten Serotypen. Zudem fanden sie unter den detektierten Stämmen auch Isolate, die aufgrund ihres Virulenzprofils (*vtx* 2, *vtx* 2d und *eae*) zu den potentiell hochpathogenen Stämmen zu zählen sind. In einer weiteren Studie aus Deutschland im Jahr 2006 konnten in 56 Kotproben bei 51,8 % der Wildwiederkäuer VTEC nachgewiesen werden. Im Rahmen dieser Studie konnten unter den 13 verschiedenen O-Serogruppen mit O21, O128 und O146 ebenfalls potentiell humanpathogene Stammformen gefunden werden. Isolate dieser Untersuchung erwiesen sich allerdings als *eae*-negativ (LEHMANN ET AL., 2006). In einer Studie von BÜLTE UND WROCKLAGE (1992), die bei Damwild eine Ausscheiderquote für VTEC von 10 % gefunden haben, konnten ebenfalls nur *eae*-negative VTEC-Stämme isoliert werden.

Zusätzlich konnten in einer Untersuchung von MARTIN UND BEUTIN (2011) bemerkenswerte Ähnlichkeiten zwischen den Virulenzprofilen und Serotypen von VTEC, die von einer Tierart sowohl in dessen Kot als auch im produzierten Nahrungsmittel isoliert werden konnten, aufgezeigt werden. Ihre Ergebnisse sehen sie als direkten Hinweis, dass die nahrungsmittel-liefernden Tierarten eine der wichtigsten Quellen für den Eintrag von VTEC in die Lebensmittelkette darstellen. Im Rahmen ihrer Studie konnten sie zudem zeigen, dass die Kombination der Verotoxin-Gene *vtx* 1c und *vtx* 2b bei VTEC in den Lebensmitteln von Rothirsch, Schaf und Ziege signifikant häufiger vorkommt als bei anderen Tierarten. Zu ähnlichen Ergebnissen bei Wildwiederkäuern kam auch eine Arbeitsgruppe aus der Schweiz (HOFER ET AL., 2012). Sie konnten bei den Tierarten Rot-, Reh-, Stein- und Gamswild die Subtypen VT 2b und VT 1c ebenfalls entweder in Kombination oder in Kombination mit anderen Subtypen am häufigsten bei den genannten Tierarten finden (HOFER ET AL., 2012). Eine weitere Bestätigung, dass der Subtyp VT 2b häufig bei Wildwiederkäuern zu finden ist, findet sich in der Untersuchung von EGGERT ET AL. (2012). Diese konnten ebenfalls zeigen, dass der Subtyp VT 2b aber auch das Enterohämolysin-Gen bei VTEC, die aus Kotproben bzw. Gewebeproben von Rotwild sowie Rehwild in Deutschland gewonnen werden konnten,

am häufigsten bei den untersuchten Tierarten vertreten sind. Zudem konnten sie sogar bei einem Rehwild-Isolat den Subtypen VT 2c nachweisen, welcher bekanntlicherweise mit einer höheren Virulenz assoziiert sein kann.

Bereits aus früheren Untersuchungen in Deutschland ist bekannt, dass aus Wildfleischproben VTEC-Stämme isoliert werden konnten, die bei menschlichen Infektionen nachgewiesen wurden (THOMS, 1999; TRUMPF ET AL., 2000). Hierbei wurden in der Untersuchung von THOMS (1999) bei Rehfleisch zwei Serovare isoliert, die bei menschlichen Infektionen bereits nachgewiesen wurden. Somit konnte in dieser Untersuchung schon gezeigt werden, dass Rehwild bzw. rohes Rehfleisch potentiell als EHEC-Quelle angesehen werden muss. Die isolierten humanpathogenen Serovare unterstreichen diese Hypothese.

Eine Darstellung der Situation in Deutschland bzw. im deutschsprachigen Raum über den Nachweis von VTEC bei Wildwiederkäuern gibt Tabelle 7.

Prävalenzdaten über VTEC bei Wildtieren liegen auch aus den Vereinigten Staaten von Amerika, Schweden, Spanien und Norwegen vor. Die Untersuchungen beschränkten sich jedoch häufig auf das Serovar *E. coli* O157:H7 als den Protopathotypus der EHEC-Gruppe. So wurde von *E. coli* O157:H7-Infektionen nach dem Verzehr von Wildfleisch in Oregon und Connecticut berichtet (RABATSKY-EHR ET AL., 2002; KEENE ET AL., 1997). In Kotproben von Damwild, Elch, Maultierhirsch, Vögeln, Wildkaninchen und Ratten wurden neben anderen VTEC-Serovaren auch *E. coli* O157:H7 nachgewiesen (RICE ET AL., 1995; PIERARD ET AL., 1997; WALLACE ET AL., 1997; SARGEANT ET AL., 1999; FISCHER ET AL., 2001; LAHTI ET AL., 2001; PRITCHARD ET AL., 2001; RENTER ET AL., 2001; RICE ET AL., 2003; WAHLSTRÖM ET AL., 2003; DUNN ET AL., 2004; LILLEHAUG ET AL., 2005; SCAIFE ET AL., 2006; GARCÍA-SÀNCHEZ ET AL., 2007; GILBREATH ET AL., 2009; PRITCHARD ET AL., 2009). Dabei wurde unter anderem die wechselseitige Übertragung von VTEC-Stämmen zwischen Hauswiederkäuern und Wildtieren diskutiert. In einer Untersuchung von RICE ET AL. (1995) konnte gezeigt werden, dass Hauswiederkäuer und Hirsche aus gleicher Region einen identischen *E. coli* O157:H7-Stamm ausschieden. Als Ursache wurde eine gemeinsame Expositionsquelle bzw. eine wechselseitige Übertragung angesprochen. In Zusammenhang mit einem Lebensmittelausbruch durch unpasteurisierten, kommerziell angebotenen Apfelsaft wurde eine von Hirschen stammende fäkale Kontamination für den Ausbruch mit *E. coli* O157:H7 identifiziert. Der Apfelsaft war aus ungewaschenem Fallobst hergestellt worden (CODY ET AL., 1999). Fäkale Kontaminationen von Pflanzen durch Wildwiederkäuer dürfen daher nicht vernachlässigt werden. Gleiche Nutzungsflächen von Wildwiederkäuern und

Hauswiederkäuern können zur gegenseitigen Übertragung und zu einer ständigen Präsenz der Erreger in den Populationen beitragen. Abschließend ist festzuhalten, dass Wildwiederkäuer zwar auch als primäres Reservoir diskutiert wurden, jedoch als Quelle von EHEC-Infektionen des Menschen bisher möglicherweise unterschätzt worden sind (BfR, 2007; LEHMANN ET AL., 2006).

Tabelle 7: Nachweis von Verotoxin-bildenden *E. coli* (VTEC) bei Wildwiederkäuern in Deutschland bzw. im deutschsprachigen Raum.

Tierarten	Anzahl untersuchter Kotproben	Anzahl untersuchter Wildfleischproben/ VTEC-Isolate/Gewebeproben	Anzahl positiver Proben (%)		Quelle
			VTEC allgemein	<i>E. coli</i> O157	
Damwild	100	0/0/0	10 (10,0)	0	BÜLTE UND WROCKLAGE, 1992
Rehwild	0	53/0/0	4 (7,5)	keine Angabe	THOMS (1999)
Rot-, Reh- und Damwild	56	0/0/0	29 (51,8)	0	LEHMANN ET AL., 2006
Rot- und Damwild in Gatterhaltung	20	0/0/0	3 (15,0)	0	LEHMANN ET AL., 2006
Reh- und Rotwild	0	0/34/0	34	0	LEHMANN ET AL., 2006
verschiedene Wildtierarten (Sammelkotproben)	0	80 bis 160/0/0 (keine genauen Angaben)	Jahr 2002 (3,0) Jahr 2005 (14,8) Jahr 2006 (10,0)	keine Angabe	BfR (2007)
Rotwild	0	15/0/0	3 (20)	keine Angabe	DIEPOLDER (2008)
Rehwild	0	61/0/0	19 (31)		
Damwild	0	7/0/0	0		
Rehwild	0	0/70/0	70	0	
Rotwild	0	0/36/0	36	0	MIKO ET AL., 2009
Damwild	0	0/4/0	4	0	
Mufflon	0	0/1/0	1	0	
Rotwild	0	0/46/0	45	1	
Rehwild	0	0/65/0	65	keine Angabe	MARTIN UND BEUTIN, 2011
andere Hirscharten	0	0/6/0	6	keine Angabe	
Rotwild	30	0/0/60**	28 (93)	0	EGGERT ET AL., 2012
Rehwild	30	0/0/0	22 (73)	0	
Rotwild	84	0/19/0	18	1	
Rehwild	64	0/15/0	15	0	
Gamswild	64	0/12/0	12	0	HOFFER ET AL., 2012
Steinwild	27	0/6/0	6	0	

* Die Tierarten Rehwild, Rotwild und Damwild wurden zusammengefasst.

** Von den 30 erlegten Rothirschen wurden zusätzlich jeweils noch Mesenteriallymphknoten sowie Tonsillen für die Untersuchung auf VTEC beprobt. Die Ergebnisse dieser Untersuchung wurden mit den Ergebnissen der Kotuntersuchung zusammengefasst.

2.3.2.1 Eintrag von VTEC in Wildbret

2.3.2.1.1 Kontaminationswege: Jagdart, Zustand des Tieres vor und nach dem Schuss

Im Rahmen der Wildbrethygiene ergibt sich die Frage nach den Kontaminationsmöglichkeiten bzw. -wahrscheinlichkeiten für den Eintrag der offensichtlich häufiger vorhandenen VTEC. Dieses hängt von mehreren Faktoren ab. Zum einem ist es die Art der Jagd, der Zustand des Tieres vor dem Schuss, der Sitz des Schusses sowie das Verhalten des geschossenen Tieres nach dem Schuss und zum anderen die anschließende Versorgung des Wildes. Letztendlich hat der Jäger einen erheblichen Anteil auf die Erhaltung der Qualität des Wildbrets; die Wildbrethygiene beginnt nicht erst mit dem Versorgen des erlegten Stück Wildes, sondern schon bei der Wahl der Jagdmethode (KRUG, 1998; DEUTZ ET AL., 2006). Als begünstigend für den Eintrag von VTEC könnten sich die so genannten Bewegungsjagden wie Drück- und Treibjagden, besonders beim Einsatz zahlreicher Hunde auswirken. Bei dieser Art des Jagens ist das Wild oftmals hochflüchtig (KRUG, 1998) und somit einer erhöhten Stresssituation ausgesetzt. Solch physische Belastungen, wie das Hetzen von Tieren, führen zu einer Erhöhung des Endotoxinspiegels (ZUCKER UND KRÜGER, 1998; SEIDLER ET AL., 1999), welcher wiederum für eine erhöhte Permeabilität des Verdauungstraktes für Bakterien verantwortlich ist. Hierdurch könnte es zu einer prämortalen, endogenen Kontamination des Organismus mit, falls vorhanden, auch gesundheitlich bedenklichen Bakterien kommen (ZUCKER UND KRÜGER, 1998; SEIDLER ET AL., 1999). Diese Translokation von Bakterien konnte bei Schlachtschweinen nachgewiesen werden. Allerdings sind diese aufgrund ihrer genetisch bedingten Situation, Haltungsart und der Transportbelastung besonders anfällig. Durch prämortale Belastungen kam es zur Translokation von Mikroorganismen aus den besiedelten Körperregionen bei dieser Tierart, wie z. B. dem Darm oder von infizierten lokalen Herden, in die normalerweise keimfreien Organe und die Muskulatur (ZUCKER UND KRÜGER, 1998; FEHLHABER UND ALTER, 1999; SEIDLER ET AL., 1999). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Translokationsprozesse umso häufiger stattfinden, je stärker der prämortale Stress ausgeprägt ist. Diese Situation führt weiterhin zur Beeinträchtigung der Serumbakterizidie, wobei selbst nach der Tötung die antibakteriellen Aktivitäten eingeschränkt bleiben. Die tatsächliche Abwehrleistung ist bei prä mortal stark belasteten Tieren also erheblich reduziert (FEHLHABER UND ALTER, 1999). Bei den hirschartigen Tieren kann es im Winter aufgrund ihrer physiologischen „Winterruhe“ zu einer zusätzlichen Belastungssituation kommen, die, durch eine zu hohe Beunruhigung durch die Jagd ausgelöst, zu einem beschleunigten Abbau der Glykogenreserven führt. In den Wintermonaten ist bei diesen der Stoffwechsel reduziert. Diese physiologische „Winterruhe“,

also das Herabsenken des Energieumsatzes und der Gesamtfutteraufnahme mit der gleichzeitigen Freisetzung von körpereigenen Reserven, muss bei der Wahl der Jagdart und dem Zeitpunkt der Jagd auf diese Tierarten berücksichtigt werden (BALFANZ, 2007). So ist es vorstellbar, dass gerade im Spätwinter das Risiko einer endogenen prämortalen Kontamination des Wildbrets mit VTEC durch die in dieser Zeit erhöhte Stressanfälligkeit aufgrund der katabolen Stoffwechsellage vermehrt gegeben ist. Im Hinblick auf die Qualität und Hygiene des Wildbrets sollte für diese Wildtierarten die Erfüllung des Abschussplanes bis Ende Dezember eines Jahres abgeschlossen sein (BALFANZ, 2007).

Einen weiteren wichtigen Faktor im Hinblick auf den Eintrag von VTEC hat der Sitz des Schusses: Haupt- (Kopf von Schalenwild außer Schwarzwild), Träger- (Hals bei allen Hirscharten), Kammer (Blatt)- oder Weichschuss (Schuss durch die Bauchhöhle, der das Gescheide (Magen, Darm) verletzt). KRUG (1998) konnte anhand eigener Untersuchungen zeigen, dass es bei der Einzeljagd vom Hochsitz zu über 90 % zu Blattschüssen kommt, wohingegen solche Schüsse bei Gesellschaftsjagden nur zu 25 % zu verzeichnen sind. Diese Tendenz konnte in einer Untersuchung von DEUTZ ET AL. (2006) bestätigt werden. Hier kamen etwa 1/3 der Tiere mit Waidwundschüssen (Weichschuss) zur Strecke. Des Weiteren konnte bei Bewegungsjagden im Vergleich zur Einzeljagd ein verlängerter Zeitraum zwischen Erlegen der Stücke und dem Aufbrechen festgestellt werden. Gerade bei Weichschüssen kann dies ein nicht unerheblicher Faktor beim Eintrag von VTEC in das Muskelfleisch sein.

Im Zusammenhang mit Weichschüssen muss ferner sehr kritisch gesehen werden, dass die Waidwund (Verletzung des Magen-Darmtraktes) geschossenen Tiere nicht sofort verenden, sondern längere Zeit überleben und somit Bakterien über den noch intakten Kreislauf in das Wildbret, welches primär keimfrei ist, verteilt werden (KAPPELHOFF, 1999; DEUTZ, 2000). Nicht nur endogene Bakterien, sondern auch mit dem Schuss in die Blutbahn eingetragene Erreger können bei einer Fluchtstrecke von 40-50 m über den noch funktionierenden Kreislauf in die Muskulatur verteilt werden (HADLOK, 1993).

2.3.2.1.2 **Kontaminationsweg:** Versorgen des Wildes

Üblicherweise wird erlegtes Wild an Ort und Stelle aufgebrochen, nicht selten auch unter ungünstigen Licht- und Witterungsverhältnissen. Dieses sowie Schussverletzungen des Magen-Darmtraktes, ein verzögertes Aufbrechen bei Gesellschaftsjagden sowie den oftmals sehr unterschiedlichen Fertigkeiten und Hygienemaßstäben der Jäger beim Aufbrechen bedingen, dass eine Kontamination des Wildbrets mit Darminhalt nicht immer auszuschließen ist. Die Möglichkeit zur hygienischen Entfernung ist jedoch oft nicht gegeben. Bei Rehwild kommt noch erschwerend hinzu, dass sie aufgrund ihres lockeren Bindegewebes ein noch

schnelleres Eindringen der Bakterien in die umliegende Muskulatur ermöglichen (DEUTZ, 2000). Gerade bei dieser Tierart ist somit ein umsichtiges Behandeln bei der Gewinnung des Wildbrets wichtig, um einen Eintrag mit pathogenen Mikroorganismen zu vermeiden.

Im Hinblick auf den Eintrag von Verotoxin-bildenden *E. coli* in das Lebensmittel Wildfleisch muss festgehalten werden, dass die Wildbrethygiene und damit auch der Eintrag von VTEC bereits mit der Auswahl der Jagdmethode beginnt. Dem Jäger muss in diesem Zusammenhang bewusst sein, dass er einen erheblichen Einfluss auf die Qualität des Wildbrets nimmt.

2.4 VTEC beim Menschen

Verotoxin-bildende *Escherichia coli*-Stämme (VTEC) können beim Menschen schwerwiegende Erkrankungen verursachen und gehören zu einem der bedeutensten humanen, über Lebensmittel übertragbaren Zoonoseerreger. Infektionen mit VTEC treten hierbei weltweit auf. Im Vergleich zu Erkrankungen z. B. durch Salmonellen oder *Campylobacter* werden in Deutschland pro Jahr durchschnittlich nur etwa 900 Erkrankungen, welche durch VTEC hervorgerufen werden, gemeldet. Ihre Bedeutung liegt demnach nicht in der großen Anzahl von Erkrankungsfällen, sondern darin, dass eine sog. EHEC-Infektion mit einem sehr schweren Krankheitsverlauf verbunden sein und zu lebenslangen Spätschäden mit möglicherweise tödlichem Ausgang führen kann (BfR, 2012). Zusätzlich von großer Relevanz ist die Tatsache, dass je nach Stamm schon geringe Mengen des Bakteriums für eine Infektion ausreichend sind (z. B. 10 bis 100 Bakterien bei EHEC O157:H7) und somit eine Übertragung und Infektion sehr leicht möglich ist (BfR, 2012). Die Ausprägung der klinischen Symptomatik ist dabei maßgeblich von der Virulenz des infizierenden VTEC-Stammes, der aufgenommenen Menge des Stammes sowie vom Immunsystem des Patienten abhängig. Insbesondere bei Säuglingen, Kleinkindern, Schwangeren, alten und abwehrgeschwächten Menschen (YOPIS-Gruppe = young, old, pregnant, immunocompromised segments of the public) können sich lebensbedrohliche Krankheitsbilder und Komplikationen entwickeln (BÜLTE UND GOLL, 2006). Prinzipiell können Infektionen mit VTEC auch klinisch inapparent verlaufen und somit unerkannt bleiben. Die Symptome der klinischen Erkrankungen hingegen reichen von einem milden, unkomplizierten Durchfall bis hin zur hämorrhagischen Colitis (HC), thrombotisch-thrombozytopenischer Purpura (TTP) und dem hämolytisch-urämisches Syndrom (HUS).

Nach oraler Aufnahme gelangen VTEC in den Magen, dessen saures Milieu normalerweise ein wirtseigenes Abwehrsystem gegen enterale Bakterien darstellt. *E. coli*-Stämme verfügen

jedoch über verschiedene Säure-Adaptionssysteme, so dass ein Überleben bei pH-Werten von 2,5 und darunter möglich ist (FOSTER, 2004). Zahlreiche Publikationen lassen dabei erkennen, dass insbesondere VTEC O157 im Gegensatz zu anderen VTEC-Stämmen ausgeprägte Säuretoleranzen bzw. -resistenzen besitzt (ARNOLD UND KASPAR, 1995; BUCHANAN UND EDELSON, 1999; BERRY UND CUTTER, 2000; RIORDAN ET AL., 2000). Nach der Magenpassage kolonisieren VTEC den Dünndarm. Dabei unterscheiden sich die Adhäsionsmechanismen verschiedener VTEC-Stämme in Abhängigkeit von ihrem Virulenzprofil (BÜLTE UND GOLL, 2006). VTEC-Stämme, die über eine Pathogenitätsinsel (LEE – Locus of enterocyte effacement), die für einen Typ-III-Sekretionsapparat kodieren, verfügen, sind durch deren Genprodukt Intimin befähigt, sich eng an Darmepithelzellen anzuheften (BÜLTE UND GOLL, 2006; RKI, 2011A). VTEC hingegen, die das Intimin nicht bilden können und somit nicht über das *eae*-Gen verfügen, bilden andere Adhärenzsysteme aus, sind aber dennoch seltener in der Lage, ein HUS auszulösen (RKI, 2011A). Nach Kolonisierung des Darmepithels sezernieren VTEC die Verotoxine in das Darmlumen. Anschließend wandern sie parazellulär durch das Darmepithel hindurch und gelangen über die Blutbahn an polymorphkernige Leukozyten gebunden zu ihren Zielzellen. Die Zielzellen stellen dabei Globotriosylceramid (Gb₃)-reiche Gewebe wie die renalen Endothelzellen, glomeruläre und tubuläre Epithelzellen, ZNS-Gewebe und intestinale Endothelzellen dar, was sich auch im klinischen Bild widerspiegelt. Dort angekommen, blockieren sie die Proteinsynthese und führen zum schnellen Zelltod. Die Schädigung renaler Endothelzellen führt dabei zur Aktivierung von Thrombozyten, was labordiagnostisch als Thrombozytopenie nachzuweisen ist. Zusätzlich führen die Gefäßschädigungen zu einer Fragmentation der Erythrozyten und somit zu einer hämolytischen Anämie. Im weiteren Verlauf der Erkrankung verringern Thrombenbildung sowie die Schädigung der tubulären Epithelzellen die glomeruläre Filtrationsrate und führen schließlich zum Nierenversagen, so dass es zur vollen Ausprägung des HUS kommt (BÜLTE UND GOLL, 2006).

Besonders gefürchtet ist vor allem das bei Kindern unter fünf Jahren vorkommende HUS. Dieses ist wie oben bereits erwähnt, charakterisiert durch die Trias hämolytische Anämie, Thrombozytopenie und Nierenversagen bis hin zur Anurie (KARMALI ET AL., 1983; NATARO UND KAPER, 1998; RKI, 2011A). Die Komplikation des HUS tritt in ca. 5-10 % der symptomatischen Fälle auf und ist der häufigste Grund für ein akutes Nierenversagen im Kindesalter (RKI, 2011A). Bei dem Krankheitsbild HUS unterscheidet man prinzipiell die typische und die atypische Form. Im Gegensatz zur atypischen Form, die ohne Diarrhö auftritt (KAVANAGH ET AL., 2006; AMIRLAK UND AMIRLAK, 2006), geht bei der typischen Form

primär eine Durchfallphase voraus (ZIMMERHACKL, 2007). Im Rahmen der Infektion kann es zur kurzzeitigen Dialysepflicht kommen, dabei ist ein irreversibler Nierenfunktionsverlust mit chronischer Dialyse jedoch eher selten (RKI, 2011A). Dennoch kann die Erkrankung in der Akutphase des HUS in etwa 2 % der Fälle tödlich enden (GERBER ET AL, 2002; RKI, 2011A). Ebenfalls in 5-10 % der Fälle der EHEC-Erkrankungen tritt die extraintestinale Komplikation einer TTP auf. Sie ist zwar wesentlich durch neurologische Symptome geprägt, zählt aber dennoch pathogenetisch wie HUS zu den thrombotischen Mikroangiopathien (BÜLTE UND GOLLE, 2006). Des Weiteren tritt das klinische Bild der TTP eher bei adulten Patienten auf.

Therapeutisch kann die Behandlung der Krankheitssymptome nur symptomatisch erfolgen. Der Einsatz einer antibakteriellen Therapie ist nicht angezeigt, da hierdurch die Bakterienausscheidung verlängert und zusätzlich die Toxinbildung stimuliert werden kann, was zu massiven Komplikationen zumindest während der akuten Krankheitsphase führen kann (RKI, 2011A). In der Regel wird beim Vorliegen einer HUS die Diurese forciert und bei globaler Niereninsuffizienz eine Hämo- oder Peritonealdialyse angewandt. Bei atypischen Verlaufsformen, insbesondere bei extrarenalen Komplikationen des HUS, empfiehlt das RKI eine Plasmatherapie. Laut RKI (2011A) ist der Nutzen einer solchen Plasmatherapie jedoch noch nicht umfassend geklärt und sollte durch Studien untermauert werden.

2.5 Infektionswege

Die Hauptquelle für VTEC stellt der Kot von Rindern, anderen landwirtschaftlichen Nutztieren wie Schafen und Ziegen sowie Wildwiederkäuern dar (EFSA, 2007; FLI, 2011). Aber auch andere Übertragungswege für VTEC sind möglich und vielfältig vertreten. Prinzipiell können vier Hauptübertragungswege von VTEC auf den Menschen unterschieden werden:

- Übertragung durch **Lebensmittel**
- Übertragung durch **Wasser**
- Übertragung durch den **direkten** oder **indirekten Kontakt zu Tieren**
- Übertragung **von Mensch zu Mensch**

Die **Übertragung durch Lebensmittel** findet oftmals über unzureichend gegartes Rindfleisch oder Rindfleischprodukte statt, welche während der Schlachtung mit Kot in Kontakt gekommen sind. Ebenfalls können Rohmilch und Rohmilchprodukte wie Käse bzw. nicht pasteurisierte Milch, aber auch Produkte mit Pasteurisierungsfehlern oder einer Kontamination Post-Pasteurisation, mit einer Infektion assoziiert sein (CARO UND GARCÍA-

ARMESTO, 2007; EFSA, 2007). Gerade fäkale Kontaminationen, ebenso eine nicht so gute Hygienepaxis während des Melkprozesses, spielen bei dem Eintrag von VTEC in Rohmilch eine bedeutende Rolle (GRIFFIN UND TAUXE, 1991). Durchaus mit einer Infektion mit VTEC in Verbindung gebracht werden konnten auch „Ready-to-eat“-Nahrungsmittel (EFSA, 2007). Aber auch Kontaminationen, die von gekühltem Fleisch auf unbelastete Lebensmittel wie z. B. Salami, Fleischpastete oder Kochwurst übertragen wurden (ESPÍE ET AL., 2006; CONEDERA ET AL., 2007; ETHELBERG ET AL., 2009; FLI, 2011), kontaminierte kalt gepresste Fruchtsäfte sowie kontaminiertes Gemüse sind als Quellen für menschliche Infektionen mit VTEC beobachtet worden (MAKI, 2006; FLI, 2011).

Wasser ist ebenfalls ein effizientes Vehikel zur Verbreitung von VTEC. Das Grundwasser kann bei schlechter Planung und entsprechend mangelhafter Behandlung, insbesondere bei massivem Regenfall, durch Tierkot kontaminiert sein (EFSA, 2007). Hieraus erwächst letztendlich auch die Gefahr einer Kontamination von Lebensmitteln pflanzlichen Ursprungs (BÜLTE, 2004). 1996 ereignete sich in Japan die weltweit bisher größte Epidemie durch *E. coli* O157. Bei diesem Ausbruch konnte als Ursache eine fäkale Kontamination von Rettichsprossen identifiziert werden. Der Dung der Rinder aus dem Farmhaltungsbereich wurde durch schwere Regenfälle abgeschwemmt und kontaminierte die Pflanzen auf dem anliegenden Feld (ITO ET AL., 1998). In diesem Zusammenhang sind als mögliche Infektionsquellen auch durch erregerrhaltigen Rinderkot kontaminierte Weiden sowie mit Rindergülle gedüngte Anbauflächen, auf denen sich VTEC-Stämme mehrere Monate halten können, in Betracht zu ziehen. Von solchen Flächen können VTEC in anliegende Badegewässer bzw. ins Trinkwasser wie Brunnenanlagen gelangen und somit ein erhebliches Infektionsrisiko darstellen (FLI, 2011).

Ein weiterer Übertragungsweg ist der **direkte** oder **indirekte Kontakt zu Tieren** und deren Kot. Insbesondere der direkte Kontakt zu Tieren wie Rindern, Schafen, Ziegen, Wasserbüffeln sowie Wildwiederkäuern in Streichelzoos oder aber bei Besuchen von landwirtschaftlichen Betrieben kann ein Risiko für eine Infektion mit VTEC darstellen (EFSA, 2007; FLI, 2011). So ereignete sich 1997 in Großbritannien ein EHEC-Ausbruch in zwei Familien, die zuvor einen landwirtschaftlichen Betrieb besucht hatten. Im Rahmen der Untersuchung erwiesen sich die aus drei Kälbern und zwei Ziegen isolierten VTEC-Stämme identisch mit den Stämmen der Erkrankten (PRITCHARD ET AL., 2000). Zwei ähnliche Fälle ereigneten sich in den USA und den Niederlanden (CRUMP ET AL., 2002; HEUVELINK ET AL.,

2002). In einem der beiden Fälle erkrankte ein Kind an HUS, nachdem es einen Streichelzoo mit Schafen und Ziegen besucht hatte (HEUVELINK ET AL., 2002).

Des Weiteren ist auch in den Jahren 2007-2010 im Rahmen von Untersuchungen der Lebensmittelüberwachung der Nachweis von VTEC in Wildfleisch auf demselben Niveau geblieben und konnte häufiger als im Rindfleisch nachgewiesen werden (BfR, 2012). Aus den USA sind vier EHEC-Ausbrüche bekannt, die auf den Verzehr von Wildwiederkäuerfleisch zurückgeführt werden konnten; jedesmal handelte es sich um das Serovar O157:H7 (KEENE ET AL., 1997; CODY ET AL., 1999; RABATSK-EHR ET AL., 2002; AHN ET AL., 2009). Der Mensch infiziert sich somit meist durch den Verzehr von unzureichend gegartem Wildfleisch sowie nicht korrekt gereiften Wildprodukten (BUSCH ET AL., 2007); aber auch pflanzliche Lebensmittel, die mit Losung von Wildtieren in Kontakt gekommen sind, werden diskutiert (THOMS, 1999; AKASHI ET AL., 1994). Schweine und Geflügel, Pferde und andere Wildtiere hingegen scheinen eher eine untergeordnete Rolle in der Übertragung von VTEC in Europa zu spielen (EFSA, 2007).

Die fäkal-orale **Übertragung von Mensch zu Mensch**, besonders zwischen Familienmitgliedern, betreuenden Personen, in Gemeinschaftseinrichtungen, Schulen und anderen institutionellen Einrichtungen, ist ebenso ein bedeutender Weg für eine Infektion mit VTEC und darf nicht vernachlässigt werden (EFSA, 2007; FLI, 2011).

Durch Untersuchungen von Ausbrüchen mit VTEC konnten bisher viele Daten zu Übertragungswegen gesammelt werden. Jedoch gestalten sich die Untersuchungen oftmals nicht sehr einfach, da bei vielen Ausbrüchen mehr als nur ein Übertragungsweg beteiligt ist. So kann eine Primärinfektion durch ein Nahrungsmittel oder eine tierische Quelle bedingt sein, sich jedoch sekundär in der Familie oder einer größeren Gemeinschaft ausbreiten. Aufgrund der niedrigen Infektionsdosis und den intrinsischen Eigenschaften von VTEC gestalten sich die Untersuchungen von Infektionen mit VTEC zunehmend komplexer. Ergebnisse von Fall-Kontroll-Studien – meist mit VTEC O157 – zeigen, dass es Unterschiede zwischen den Ländern gibt, und die Risikofaktoren für eine Infektion vom Alter abhängig zu sein scheinen. In mehreren Studien konnten zudem keine spezifischen Nahrungsmittel als Überträger von VTEC identifiziert werden; stattdessen konnten sie den Kontakt mit Tieren und/oder die ländliche Region als die Hauptquelle für eine Infektion mit VTEC O157 nachweisen (LOCKING ET AL., 2001; O'BRIEN ET AL., 2001; KASSENBOG ET AL., 2004). WERBER ET AL. (2007) konnten zeigen, dass Kinder unter drei Jahren die höchste Erkrankungsrate haben, wenn sie Wiederkäuer wie Rind, Schaf oder Ziege angefasst haben.

Als Nahrungsquelle konnte Rohmilch als einziger Risikofaktor für diese Altersgruppe identifiziert werden. Im Gegensatz hierzu infizieren sich Personen, die zehn Jahre oder älter sind, vor allem über Nahrungsmittel mit VTEC.

2.6 Rechtliche Grundlagen

2.6.1 Wildbrethygiene

Anfang 2005 trat die europäische Basis-Verordnung (EG) Nr. 178/2002 zur Festlegung einheitlicher Grundsätze des Lebensmittelrechts und der Lebensmittelsicherheit in Kraft. Dieser folgten die Verordnungen 852/2004, 853/2004 und 854/2004 sowie die Verordnung 2075/2005, in welcher die Trichinenprobenentnahme geregelt ist. Durch das Inkrafttreten des neuen EU-Lebensmittelrechts entstand ein EU-einheitliches Regelwerk, welches für die Erzeugung und Vermarktung aller Lebensmittel gilt. Somit umfasst es alle Stufen der Lebensmittelherstellung und reicht von der landwirtschaftlichen Primärproduktion und Futtermittelerzeugung über die Verarbeitung der erzeugten Primärprodukte bis hin zur Abgabe des fertigen Lebensmittels an den Endverbraucher. Seit 2006 müssen nun Jäger, die Wild vermarkten, die neuen EU-Lebensmittelhygienevorschriften und seit August 2007 die nationale „Verordnung zur Durchführung von Vorschriften des gemeinschaftlichen Lebensmittelhygienerechts“ beachten und auch danach handeln. Des Weiteren spielen bei der Vermarktung von Wildbret noch weitere Rechtsnormen der EU und des Bundes eine Rolle. Es handelt sich um das Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch (LFGB) sowie die VO (EG) Nr. 1069/2009 mit Hygienevorschriften für nicht für den menschlichen Verzehr bestimmte tierische Nebenprodukte sowie gegebenenfalls das Tierische Nebenproduktbeseitigungsgesetz.

Nach Artikel 14 der VO (EG) Nr. 178/2002 ist der Jäger ein Lebensmittelunternehmer, welcher für die Sicherheit des von ihm in den Verkehr gebrachten Wildbrets verantwortlich ist. Ebenso hat er den Artikel 18 der VO (EG) Nr. 178/2002 zu beachten, in welchem die Rückverfolgbarkeit nach dem Prinzip „Einen Schritt nach vorn und einen Schritt zurück“ festgelegt ist. All dieser Verantwortung wird der Jäger gerecht, wenn er die nötige Sachkenntnis besitzt oder aber sie sich aneignet. Hierbei ist jedoch zu unterscheiden, ob kleine Mengen von erlegtem Wild direkt an Verbraucher oder örtliche Betriebe des Einzelhandels zur unmittelbaren Abgabe an den Verbraucher oder aber Wild an einen zugelassenen Wildverarbeitungsbetrieb abgegeben werden sollen. Bei Abgabe kleiner Mengen gilt im Gegensatz zu der Abgabe an einen zugelassenen Wildverarbeitungsbetrieb nicht die VO (EG) Nr. 853/2004. Stattdessen hat sich der Jäger auf nationaler Ebene nach der

Tierischen Lebensmittelhygiene-Verordnung zu richten. Hiernach muss ein Jäger alleinig „ausreichend geschult“ sein. Hierbei ist ausreichend geschult, wer seine Jägerprüfung ab dem 01. Februar 1987 bestanden hat. Anders sieht es aus, wenn an einen zugelassenen Wildverarbeitungsbetrieb abgegeben wird. Hier ist in der Regel die Fortbildung von mindestens einer Person einer Jagdgesellschaft zur kundigen Person im Sinne der VO (EG) Nr. 853/2005 gefordert.

Die Bedeutung der Wildbrethygiene beginnt für den Jäger bereits beim Erlegen des Wildes. Der Jäger muss sich vergegenwärtigen, dass er mit dem sog. Ansprechen vor dem Schuss die Lebendtieruntersuchung am Wild durchführt. Beim Ansprechen des Wildes ist das Verhalten, die Konstitution sowie auffällige Veränderungen, die auf Störungen der Gesundheit hinweisen können, zu beurteilen. Diese sind im späteren Umgang mit dem erlegten Stück zu berücksichtigen und werden als gesundheitlich bedenkliche Merkmale in der Tierischen LebensmittelhygieneVO in Anlage 4 aufgeführt. Denn bereits unnatürliches Verhalten des Wildes ist ein bedenkliches Merkmal, so dass es ohne tiefergehenden Befund erforderlich ist, das Wildbret der amtlichen Fleischuntersuchung zuzuführen. Zusätzlich wird durch das Ansprechen sichergestellt, dass Wildtiere, die gemäß der Bundesjagdzeiten-Verordnung und der Verordnung über die Änderung der Jagdzeiten vom 09.06.2011 nicht zur Schussabgabe freigegeben sind, wie z. B. führende Ricken, nicht irrtümlicherweise erlegt werden.

Nach Beenden der Jagd wird das erlegte Wild an einem Platz gesammelt. Seit Inkrafttreten des neuen EU-Hygienepakets im Jahre 2006 setzt sich das sog. Streckehängen – das Wild wird nebeneinander aufgehängt – gegenüber dem Streckelegen, bei dem die Tiere liegend auf Zweigen aufgereiht werden, zunehmend durch. Das Streckehängen hat mehrere Vorteile für die Qualität des Wildbrets. So kann das Blut aus der Körperhöhle abfließen und das Wildbret wesentlich schneller abtrocknen. Auch die Bildung und Vermehrung von schädlichen Mikroorganismen kann bei dieser hängenden Aufbewahrung reduziert werden.

Für die Vermarktung des erlegten Wildes sind je nachdem, ob das Wild an einen zugelassenen Wildverarbeitungsbetrieb oder der Jäger direkt kleine Mengen an Wild oder Wildfleisch an den Endverbraucher abgibt, unterschiedliche Rechtsnormen zugrunde zu legen. Hingegen muss das Wild sowohl gemäß der VO (EG) Nr. 853/2004 als auch der Tierischen LebensmittelhygieneVO nach dem Erlegen alsbald auf eine Innentemperatur von nicht mehr als +7 °C (Großwild) und +4 °C (Kleinvild) abgekühlt werden. Innereien sind hierbei auf unter +3 °C zu kühlen. Im Zusammenhang mit der Lagerung von Wild ist zusätzlich zu

beachten, dass Großwild wie auch Kleinwild in der Decke getrennt von bereits enthäutetem Wild bzw. unverpacktem Wildfleisch gelagert werden muss.

Erfolgt die Abgabe von Wild über einen zugelassenen Wildbearbeitungsbetrieb so muss die kundige Person gemäß der VO (EG) Nr. 853/2004 tätig werden.

Bei der Abgabe kleiner Mengen an Wild in der Decke, Wild oder Wildfleisch durch den Jäger an den Endverbraucher oder örtliche Einzelhandelsunternehmen zur direkten Abgabe an den Endverbraucher sind hingegen die Vorschriften der VO (EG) Nr. 852/2004 sowie der nationalen Verordnung zur Durchführung von Vorschriften des gemeinschaftlichen Lebensmittelhygienerechts hinsichtlich der Registrierung und den hygienischen Voraussetzungen für das aus der Decke schlagen und zerwirken anzuwenden.

Gänzlich unabhängig von einer Zulassungspflicht gilt es, die Rückverfolgbarkeit zu gewährleisten. Hierbei orientiert sich die Kennzeichnung nach Artikel 18 der VO (EG) Nr. 178/2002. So müssen auf dem Etikett folgende Angaben vorhanden sein: die Wildart, das Gewicht, die Anschrift des registrierten Jägers, die Wildmarkennummer bzw. beim Schwarzwild die Trichinennummer sowie bei gekühlter Ware das Haltbarkeitsdatum oder das Datum des Einfrierens.

2.6.2 Europäisches und nationales Recht beim Vorliegen des Zoonoseerregers VTEC

VTEC als ein bedeutender über Lebensmittel übertragbarer Zoonoseerreger wird im Rahmen der Richtlinie 2003/99/EG (Zoonose-Richtlinie) im Anhang I Teil A als überwachungspflichtiger Erreger aufgeführt. Somit gibt es für Deutschland ebenso wie für die anderen EU-Mitgliedstaaten nach dieser Richtlinie eine Verpflichtung, jährlich einen Bericht über Trends und Quellen von Zoonoseerregern wie VTEC für das zurückliegende Jahr zu erstellen (BfR, 2012B). Die nationale Datenerfassung, -auswertung sowie –veröffentlichung über das Auftreten von VTEC entlang der Lebensmittelkette wird hierfür durch eine Allgemeine Verwaltungsvorschrift (AVV Zoonose Lebensmittelkette), welche am 11. Juli 2008 veröffentlicht wurde, geregelt. Diese basiert auf der Richtlinie 2003/99/EG und bildet die Grundlage für das Zoonose-Monitoring (HARTUNG UND KÄSBOHRER, 2012). Dabei regelt die Allgemeine Verwaltungsvorschrift das Vorgehen bei der Planung, Koordinierung und Durchführung der Untersuchungen zum Zoonosen-Monitoring sowie ebenfalls die sich anschließende Berichterstattung (BfR, 2012B). Dieser Bericht wird anschließend an die Europäische Kommission und Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA) übermittelt.

Eine weitere zentrale Bedeutung besitzt in diesem Geschehen das Referenzlaboratorium. Dieses gewährleistet, dass europaweit nach einem einheitlichen Standard im Bereich von VTEC gearbeitet wird und somit eine Vergleichbarkeit der Untersuchungsergebnisse besteht (ELLEBROEK ET AL., 2009).

Ebenso eine zentrale Rolle spielt im Rahmen des Infektionsschutzgesetzes das Robert Koch-Institut (RKI). Es hat die Aufgabe, Konzeptionen zur Vorbeugung übertragbarer Krankheiten sowie zur frühzeitigen Erkennung und Verhinderung der Weiterverbreitung von Infektionen zu entwickeln. Das BfR, welches seit 2005 das bundesweite System zur einheitlichen Erfassung von Ausbrüchen lebensmittelbedingter Infektionen und Intoxikationen (BELA) führt, soll dabei die Datenerfassung des RKI ergänzen (BfR, 2012B, s. auch Abbildung 2).

Seit 2001 sind der Krankheitsverdacht, die Erkrankung sowie der Tod an HUS gemäß des § 6 IfSG namentlich meldepflichtig. Die anderen EHEC-Erkrankungen werden in der Meldepflicht jedoch vom HUS abgegrenzt. Bei diesen ist nach § 7 IfSG bereits der direkte oder indirekte Nachweis von enterohämorrhagischen *Escherichia coli* meldepflichtig, sofern der Nachweis auf eine akute Infektion hinweist.

Für Gemeinschaftseinrichtungen im Sinne des § 33 IfSG wie Kinderkrippen, Kindergärten, Kindertagesstätten, Schulen, Heime oder sonstige Ausbildungseinrichtungen gelten zusätzliche Anforderungen. So dürfen Personen, bei denen eine EHEC-Erkrankung oder der Verdacht darauf besteht, nach § 34 IfSG in den oben genannten Einrichtungen weder Lehr-, Erziehungs-, Pflege-, Aufsichts- noch sonstige Tätigkeiten ausüben, solange aus ärztlicher Sicht eine Weiterverbreitung der Krankheit zu befürchten ist. Ebenso dürfen betreute Personen einer Gemeinschaftseinrichtung, die an EHEC erkrankt sind oder dessen verdächtig sind, weder Räume der Gemeinschaftseinrichtung betreten noch an Veranstaltungen der Gemeinschaftseinrichtung teilnehmen. Des Weiteren bedürfen EHEC-Ausscheider einer Zustimmung des Gesundheitsamtes, um Räume einer Gemeinschaftseinrichtung zu betreten, Einrichtungen der Gemeinschaftseinrichtung zu nutzen sowie an Veranstaltungen der Gemeinschaftseinrichtung teilzunehmen.

Für Personen, die Umgang mit Lebensmitteln haben, gibt es ebenfalls besondere gesundheitliche Anforderungen. So dürfen Personen, die den Krankheitserreger EHEC ausscheiden, nach § 42 IfSG nicht in Küchen von Gaststätten und sonstigen Einrichtungen mit oder zur Gemeinschaftsverpflegung tätig oder beschäftigt sein. Gleiche Regelungen betreffen

das Herstellen, Behandeln oder Inverkehrbringen von Lebensmitteln wie Fleisch, Milch etc., wenn diese Personen bei der Tätigkeit mit den Lebensmitteln in Berührung kommen.

In der Veterinärmedizin ist der Nachweis von VTEC beim Tier nach der Verordnung über meldepflichtige Tierkrankheiten ebenso meldepflichtig.

Allgemein basieren die Untersuchungen auf den Zoonoseerreger VTEC in Deutschland u. a. auf dem Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch (LFGB), dem Infektionsschutzgesetz (IfSG), dem Tierseuchengesetz sowie den aufgrund dieser Gesetze erlassenen Verordnungen (BfR, 2012B).

Eine allgemeine Übersicht über bundes- und EU-einheitliche Meldewege zu lebensmittelbedingten Ausbrüchen wie VTEC findet sich in Abbildung 2.

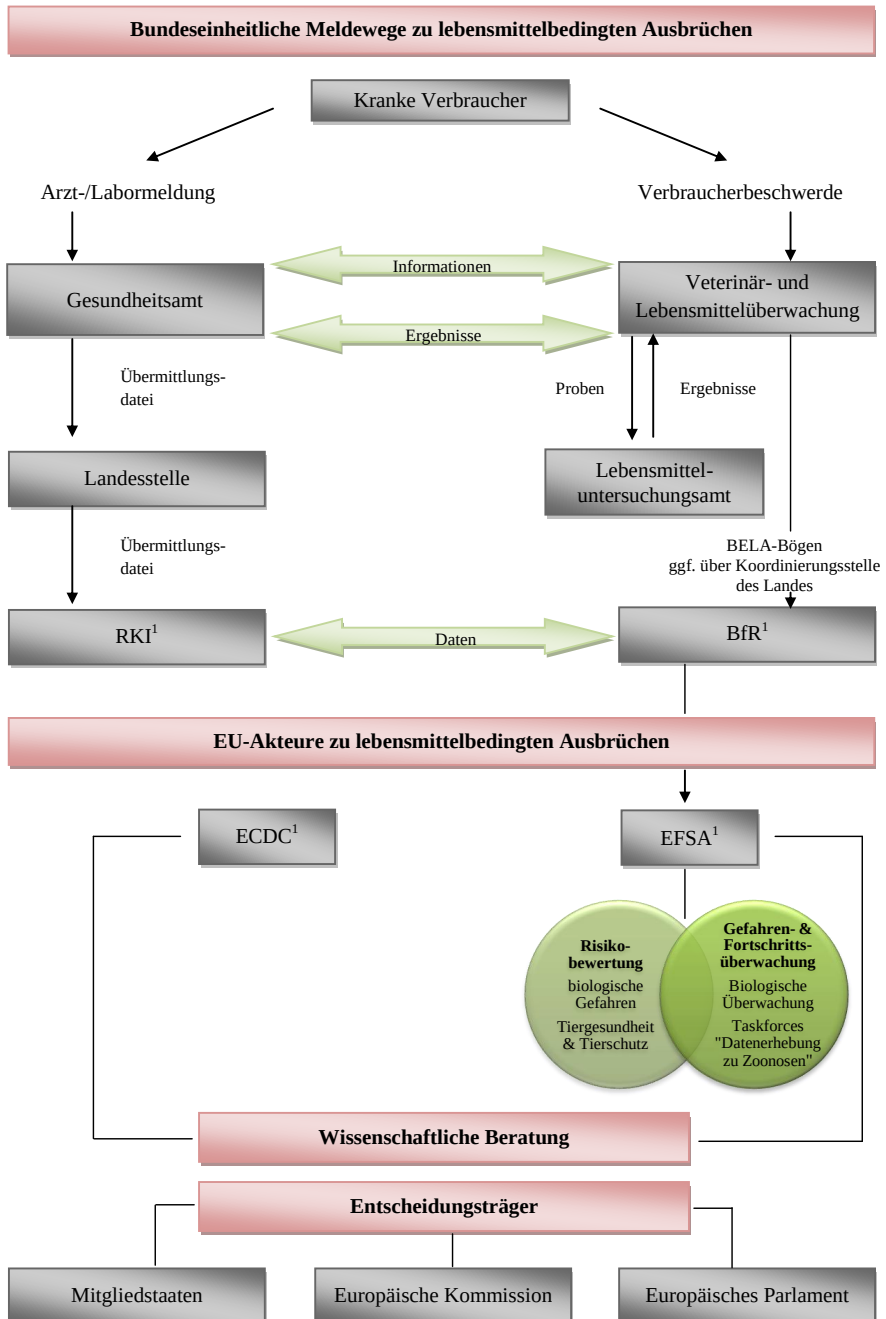


Abbildung 2: Übersicht über Meldewege auf bundeseinheitlicher und europäischer Ebene bei einem lebensmittelbedingten Ausbruch durch EHEC in Anlehnung an BfR (2013) und EFSA (2012).

¹RKI = Robert Koch-Institut; BfR = Bundesinstitut für Risikobewertung; ECDC = European Centre for Disease Prevention and Control; EFSA = European Food Safety Authority

3. Material und Methoden

3.1 Untersuchungsmaterial

Bei dem Untersuchungsmaterial handelte es sich um Kotproben von 353 Rehen, die im Rahmen von Jagden in Hessen erlegt wurden. Im Folgenden werden die Probenentnahme und -lagerung, das Vorgehen bei der Alters- und Geschlechtsbestimmung der Rehe, die Auswahl der Beprobungsorte sowie der Beprobungszeitraum und die saisonale Verteilung der Proben dargestellt.

3.1.1 Probenentnahme und -lagerung

Das Untersuchungsmaterial wurde unter sterilen Kautelen nach Beendigung einer Jagd vom erlegten Stück Rehwild entnommen (s. Abbildung 3). Für das Aufbrechen der einzelnen Tiere wurde das entsprechende Messer gesäubert und desinfiziert. Zusätzlich zu diesen Maßnahmen wurden beim Aufbrechen wie auch bei der Probenentnahme Einmalhandschuhe verwendet, die bei jedem Tier gewechselt wurden. Zur Entnahme des Probenmaterials wurde der Aufbruch jedes Einzeltieres auf eine saubere Plastikfolie gelegt. Die Entnahme des Kots erfolgte in ein Probengefäß unter Ausdrücken des Darmes, so dass der Kot zu keinem Zeitpunkt mit der äußeren Umgebung in Verbindung kam. Weiterhin wurden für jedes Tier der Ort des Erlegens, das Geschlecht, Alter (s. Anhang Tabelle 40), Ernährungszustand, Gewicht und gegebenenfalls pathologische Veränderungen aufgenommen. Die Proben wurden bis zur labormäßigen Aufarbeitung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ tiefgefroren gelagert.



Abbildung 3: Kotprobenentnahme.

3.1.2 Alters- und Geschlechtsbestimmung

Das Geschlecht wurde anhand der primären und sekundären Geschlechtsmerkmale festgelegt. Für die Altersbestimmung wurde in erster Linie die Zahnentwicklung herangezogen, aber

auch Merkmale wie der Zustand des Gesäuges wurden als Grundlage für die Einteilung in juvenil, subadult und adult berücksichtigt. Als juvenil wurde ein Reh bezeichnet, wenn aufgrund der Altersmerkmale zu erkennen war, dass das Tier sich im 1. Lebensjahr befand. Als ein eindeutiges Altersmerkmal für juvenile Rehe erwies sich dabei unter Feldbedingungen der hintere Prämolare (P4). Dieser wird im Alter von 12 bis 13 Monaten gewechselt und besteht als Milchzahn (Pd4) aus drei Zahneinheiten, wohingegen der P4 im Dauergebiss nur aus zwei Zahneinheiten besteht (HABERMEHL, 1985). Subadult war ein Tier im 2. Lebensjahr. Solche Rehe hatten bereits ihr vollständiges bleibendes Gebiß. Zusätzlich zu diesem Merkmal lässt das vollständig ausgebildete Backenzahngebiß noch keine oder nur geringe Abnutzung am Kaurand der P4, M1 und M2 erkennen (HABERMEHL, 1985). Des Weiteren war kein angebildetes Gesäuge zu erkennen. Rehe, die eindeutig älter als 2 Jahre waren, wurden als adult bezeichnet. Bei weiblichen Tieren war für die Alterseinteilung als adult vor allem der Zustand des Gesäuges von großer Bedeutung. Schmalrehe werden in der Regel bereits im zweiten Lebensjahr beschlagen und führen somit im Alter von drei Jahren zum ersten Mal ein Kitz. Dies führt zu einem angebildeten Gesäuge, welches je nach Erlegungsdatum gut zu erkennen war.

Die Beprobung der Rehe erfolgte hauptsächlich in den Monaten Oktober bis Januar. In diesen Monaten dürfen Kitze, Schmalrehe und Ricken geschossen werden. Rehböcke hingegen dürfen ab dem 15. Oktober bis zum 30. April des darauffolgenden Jahres nicht erlegt werden. Insgesamt fiel daher der Anteil der männlichen Tiere geringer aus (s. Tabelle 8). Eine Gegenüberstellung der Geschlechts- und Altersverteilung ist der Tabelle 9 zu entnehmen. Die Differenz von vier Rehen zu der Gesamtzahl einbezogener Rehe von 353 kommt dadurch zustande, dass bei vier Rehen das Alter nicht eindeutig festgelegt werden konnte.

Tabelle 8: Übersicht über die Anzahl der untersuchten weiblichen und männlichen Rehe.

Geschlecht	Probenanzahl (n)
weiblich	283
männlich	70
weiblich & männlich (Σ)	353

Tabelle 9: Einteilung der untersuchten Rehe nach Geschlecht und Alter.

Geschlecht \ Alter	adult (Σ)	subadult (Σ)	juvenil (Σ)	Σ aller Altersstufen
weiblich	153	52	74	279
männlich	11	9	50	70
weiblich & männlich (Σ)	164	61	124	349

3.1.3 Beprobungszeitraum und -orte

Im Zeitraum von Oktober 2008 bis Januar 2010 wurden flächendeckend für Hessen Kotproben von Rehwild, insbesondere bei Gesellschaftsjagden, aber auch vereinzelt bei Einzel- oder Intervalljagden, gesammelt. Von den insgesamt 353 Rehen wurden 209 Tiere im Jahr 2008, 134 Rehe im Jahr 2009 sowie 10 Tiere im Jahr 2010 beprobt. Aufgrund logistischer Hintergründe wurde die Mehrzahl der Proben in den Wintermonaten auf sogenannten Bewegungsjagden gesammelt. In diesen Monaten wird Rehwild in den staatlichen Forstämtern im Gegensatz zu den Sommermonaten – hier finden in der Mehrzahl Ansitzjagden statt – hauptsächlich im Rahmen von Gesellschaftsjagden erlegt. Für die Probennahmen wurden die Jagden von insgesamt 12 Forstämtern des Landes Hessen einbezogen. Eine entsprechende geographische Übersicht der beteiligten Forstämter findet sich in Abbildung 4. Die in der Abbildung grün hinterlegten Flächen stellen die Forstämter dar, bei denen auf den Jagden Proben entnommen wurden.

1. Groß-Gerau
2. Hanau-Wolfgang
3. Nidda
4. Hofbieber
5. Wettenberg
6. Herborn
7. Weilburg
8. Frankenberg
9. Burgwald
10. Neukirchen
11. Melsungen
12. Hessisch-Lichtenau

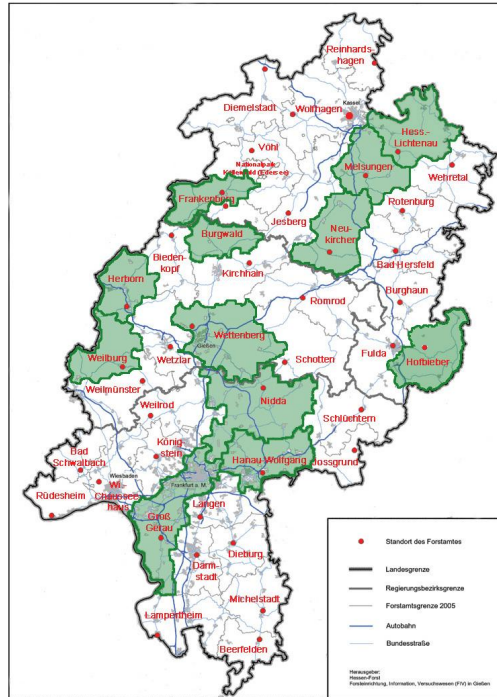


Abbildung 4: Übersichtskarte der Hessischen Forstämter (Quelle: <http://www.hessen-forst.de/forstaemter/kontaktkarte.htm>).

Je nach Größe der Jagdgesellschaft, der Größe des Revierbezirkes sowie der vorhandenen Rehpopulation wurden bis zu 22 Rehe pro Jagd erlegt und konnten alle im Laufe eines Jagdtages beprobt werden. Innerhalb jedes ausgewählten Forstamtes sollten im Rahmen des Projektes etwa 10 % der Rehe eines Jagdjahres beprobt werden. Als Grundlage zur Festlegung der benötigten Tieranzahl für jedes Forstamt diente die Rehwildstrecke des Jagdjahres 2007/2008. Für die Forstämter Hanau-Wolfgang, Nidda, Melsungen, Frankenberg sowie Neukirchen standen zur Berechnung die Streckenübersichten des Rehwildes aus den Jahren 2005-2008 zur Verfügung. In Tabelle 10 sind die aufgrund der Streckenübersichten geplanten sowie die nach Beendigung der Probennahme tatsächlich beprobten Tierzahlen der einzelnen Forstämter dargestellt.

Tabelle 10: Übersicht über die Anzahl der untersuchten Rehe für jedes Forstamt.

Forstamt	Ø Anzahl erlegter Rehe eines Jagdjahres	geplante Probenanzahl	Probenanzahl (%)
Groß-Gerau	290	29	23 (79,3)
Hanau-Wolfgang*	89	9	12 (133,3)
Nidda*	285	29	31 (106,9)
Hofbieber	327	33	13 (39,4)
Wettenberg	199	20	27 (135,0)
Herborn	243	24	27 (112,5)
Weilburg	146	15	6 (40,0)
Frankenberg*	270	27	33 (122,2)
Burgwald	429	43	51 (118,6)
Neukirchen	591	59	71 (120,3)
Melsungen	377	38	23 (60,5)
Hessisch-Lichtenau	500	50	36 (72,0)
Gesamtanzahl	3746	376	353 (93,9)

* Bei diesen Forstämtern standen zur Berechnung der benötigten Tierzahl die Streckenübersichten des Rehwildes aus den Jahren 2005-2008 zur Verfügung.

Bei den einzelnen Forstämtern wurden jedoch nicht in jeder zugehörigen Revierförsterei Proben genommen. Eine Auflistung der Forstämter mit den beteiligten Revierförstereien findet sich in Tabelle 11. Für die statistische Auswertung wurden die Revierförstereien jedoch den entsprechenden Landkreisen zugeordnet (s. Tabelle 11).

Tabelle 11: Übersicht über die Revierförstereien der einzelnen Forstämter, in denen die Proben genommen wurden.

Forstamt	Revierförsterei	zugehöriger Landkreis
Groß-Gerau	Kühkopf-Knoblochsau	Groß-Gerau
Hanau-Wolfgang	Neuwirtshaus Linsengericht Gelnhausen	Main-Kinzig-Kreis
Nidda	Oberlais	Wetteraukreis
Hofbieber	Ehrenberg Findlos Sandberg	Fulda
Wettenberg	Salzböden Krofdorf Hungen Grünberg Reiskirchen	Gießen
Herborn	Struth Thiergarten Schelderwald Siegbach	Lahn-Dill-Kreis
Weilburg	Tiergarten Beselich	Limburg-Weilburg
Frankenberg	Wangershaus Karlsburg Dodenau Louisdorf	Waldeck-Frankenberg
Burgwald	Wetter Lahntal Münchhausen Bracht Wohratal Rosenthal Ernsthausen	Marburg-Biedenkopf Marburg-Biedenkopf Marburg-Biedenkopf Marburg-Biedenkopf Marburg-Biedenkopf Waldeck-Frankenberg Waldeck-Frankenberg
Neukirchen	Linsingen Hülsa Ottrau Oberbeisheim/Remsfeld Wincherode Frielendorf	Schwalm-Eder-Kreis
Melsungen	Wellerode Kaltenbach Morschen Schwarzenberg Schwarzenberg/Kirchhof Spangenberg	Kassel Schwalm-Eder-Kreis Schwalm-Eder-Kreis Schwalm-Eder-Kreis Schwalm-Eder-Kreis Schwalm-Eder-Kreis
Hessisch-Lichtenau	Kaufungen Wendershausen Buchberg Roßbach/Hundelshausen	Kassel Werra-Meißner-Kreis Kassel Kassel

Da die Anzahl auf VTEC getesteter Rehe in den Landkreisen Fulda ($n = 13$), Limburg-Weilburg ($n = 6$), Main-Kinzig-Kreis ($n = 12$) und Werra-Meißner-Kreis ($n = 9$) für die statistische Auswertung zu gering war (s. Tabelle 44 im Anhang), wurden diese Landkreise mit anderen Landkreisen zusammengefasst. Die Zuordnung erfolgte nach der geographischen Nähe. So wurden der Landkreis Fulda und Main-Kinzig-Kreis zusammengefasst. Weiterhin erfolgte eine Zuordnung des Landkreises Limburg-Weilburg zum Lahn-Dill-Kreis sowie des Werra-Meißner-Kreises zu Kassel. Eine Auflistung der neu zugeordneten Landkreise mit der Anzahl der beprobten Rehe findet sich in Tabelle 12.

Tabelle 12: Auflistung der neu zugeordneten Landkreise mit der Anzahl der beprobten Rehe.

Landkreis	Probenanzahl
Fulda/Main-Kinzig-Kreis	25
Gießen	29
Groß-Gerau	23
Kassel/Werra-Meißner-Kreis	38
Lahn-Dill-Kreis/Limburg-Weilburg	33
Marburg-Biedenkopf	41
Schwalm-Eder-Kreis	92
Waldeck-Frankenberg	43
Wetteraukreis	29
Gesamtanzahl	353

Zusätzlich wurden die Ergebnisse aus den einzelnen Landkreisen statistisch in Beziehung zu der Wald- bzw. landwirtschaftlich genutzten Fläche gesetzt. Die hierfür benötigten Flächenangaben zu den jeweiligen Landkreisen (s. Anhang Tabelle 45) wurden der Datenbank des Hessischen Statistischen Landesamtes entnommen (<http://www.statistik-hessen.de/themenauswahl/landwirtschaft/regionaldaten/flaechennutzung-nach-der-belegenheit/index.html>).

Des Weiteren wurde die Anzahl an Rindern, Schafen und Ziegen pro Hektar landwirtschaftliche Nutzfläche für das Vorkommen von VTEC bei Rehwild statistisch ausgewertet. Die hierfür benötigten Tierzahlen für die Tierarten Rind, Schaf und Ziege der einzelnen Landkreise sowie die zugehörige landwirtschaftlich genutzte Fläche befinden sich im Anhang in Tabelle 46. Die Angaben der Tierzahlen für die Tierarten Rind, Schaf und Ziege für jeden Landkreis aus dem Jahr 2011 wurden von der hessischen Tierseuchenkasse geliefert.

3.1.4 Saisonale Verteilung der Proben

Die Proben wurden hauptsächlich, wie in Kap. 3.1.3 bereits erwähnt, in den Wintermonaten genommen. Da im Rahmen der statistischen Auswertung auch der saisonale Einfluss der Probenahme berücksichtigt werden sollte, wurden die Proben zusätzlich in jahreszeitliche Klassen unterteilt (s. Tabelle 13).

Es wurden die Zeitpunkte zwischen Mai bis einschließlich September zu einer Klasse, der Klasse 5, zusammengefasst, da in diesen Monaten die Probenanzahl zu gering war. Die Monate Oktober (Klasse 10), November (Klasse 11), Dezember (Klasse 12) und Januar (Klasse 1) werden aufgrund genügend großer Probenanzahl einzeln aufgeführt und statistisch ausgewertet. In den Monaten Februar (Klasse 2), März (Klasse 3) sowie April (Klasse 4) wurden zu keinem Zeitpunkt Proben genommen, so dass diese Klassen nicht berücksichtigt wurden.

Tabelle 13: Übersicht über die saisonale Verteilung der Probenahme.

Saison	Probenanzahl (n)
Klasse 1	31
Klasse 5	25
Klasse 10	32
Klasse 11	157
Klasse 12	108
GESAMT (Σ)	353

Für die statistische Auswertung wurden die Daten zusätzlich noch weitergehend zusammengefasst, um möglicherweise eine Aussage über einen Effekt hinsichtlich des Sommers und des Winters treffen zu können. Hierfür wurden die Klassen 10, 11, 12 und 1 zu den Wintermonaten zusammengefasst. Die Klasse 5 hingegen wurde nicht weitergehend zusammengefasst und stellt die Sommermonate dar.

3.2 Labormaterial

3.2.1 Referenz- und Kontrollstämme

In der vorliegenden Arbeit wurden die in Tabelle 14 aufgeführten Referenz- und Kontrollstämme bei den angewandten Nachweisverfahren eingesetzt.

Tabelle 14: Verwendete *E. coli* Referenz- und Kontrollstämme.

Stamm-bezeichnung	Serovar	Virulenz-Gene ¹⁾	Biochemische Eigenschaften ²⁾	Herkunft	Quelle ³⁾
DW 5	---	<i>vtx</i> 1	S ⁺ β-D-Gluc ⁺	Damwildkot	Wrocklage, V., Berlin
EDL 933	O157:H7	<i>vtx</i> 1 <i>vtx</i> 2 klassisch <i>eae</i>	S ⁻ β-D-Gluc ⁻	„Hamburger“	O'BRIEN, A. D. ET AL. (1983)
B2324	O157:H7	<i>vtx</i> 2c <i>eae</i>	S ⁻ β-D-Gluc ⁻	Rinderkot	Bülte, M., Berlin
<i>E. coli</i> 3199/98	O40:H6	<i>vtx</i> 2d	S ⁺ β-D-Gluc ⁺	Stuhl/Mensch (Diarrhoe)	Karch, H., Würzburg
<i>E. coli</i> E57a	---	<i>vtx</i> 2e	S ⁺ β-D-Gluc ⁺	Schwein	Karch, H., Würzburg
W89/11	O91:H21	<i>vtx</i> 2d _{activatable}	---	---	Beutin, L., BfR Berlin
T 535	O104:H21	<i>vtx</i> 1 <i>vtx</i> 2c <i>e-hly</i>	---	Rinderkot	Trumpf, T., Berlin
Sal 2/5/1-98	O113:H4	<i>vtx</i> 2 klassisch	S ⁺ β-D-Gluc ⁺	Rindfleisch	Bülte, M., Gießen
Sal 61/13-1-99	ONT:H4	<i>vtx</i> 2 klassisch	S ⁺ β-D-Gluc ⁺	Rindfleisch	Bülte, M., Gießen
HUS 1249	O157:H7	<i>vtx</i> 1 <i>vtx</i> 2 klassisch <i>eae</i> <i>e-hly</i>	S ⁻ β-D-Gluc ⁻	Stuhl/Mensch	Karch, H., Würzburg
HC 2044	O157:H7	<i>vtx</i> 1 <i>vtx</i> 2 klassisch <i>eae</i> <i>e-hly</i>	S ⁻ β-D-Gluc ⁻	Stuhl/Mensch	Karch, H., Würzburg
Schu 15	O155:H ⁻	<i>vtx</i> 2 klassisch	S ⁺ β-D-Gluc ⁺	Rinderkot	Schuy, C., Gießen
Sal 80/10/1-01	O157:H ⁺	<i>vtx</i> 2 <i>eae</i>	S ⁻ β-D-Gluc ⁻	Rindfleisch	Bülte, M., Gießen
Sal 33/4/1-98	O22:H8	<i>vtx</i> 1 <i>vtx</i> 2 klassisch	S ⁺ β-D-Gluc ⁺	Rindfleisch	Bülte, M., Gießen
<i>E. coli</i> ATCC 25922	O6	---	S ⁺ β-D-Gluc ⁺	Mensch	ATCC

¹⁾ *vtx* = Verotoxin-Gen; *eae*-Gen = *E. coli* attaching and effacing-Gen; *e-hly* = EHEC-Enterohämolysin-Gen

²⁾ S⁺/S⁻ = Sorbit positiv/Sorbit negativ; β-D-Gluc⁺/β-D-Gluc⁻ = β-D-Glucuronidase positiv/β-D-Glucuronidase negativ

³⁾ ATCC = American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, USA

3.2.2 Medien und Lösungen

Sowohl für die erste (Verwendung von zwei Anreicherungsmedien) als auch für die weitere gesamte Untersuchungsphase wurden die in Tabelle 15 aufgeführten Medien und Lösungen verwendet.

Tabelle 15: Medien und Lösungen.

Medium/Lösung	Firma	Artikel bzw. Bestellnummer
Columbia-Blut-Agar-Basis	Oxoid, Wesel	CMO331
Schafblut, defibriniert	Oxoid, Wesel	SROO51C
Plate Count- (PC-) Agar	Merck, Darmstadt	1.05463.0500
Hemorrhagic Colitis-(HC-) Agar nach Szabo (1986)	Sifin GmbH, Berlin	TN1223
Sorbit-McConkey- (SMAC-) Agar	Merck, Darmstadt	1.09207.0500
ECD-Agar	Sifin, Berlin	TN1235
Kovacs' Indol-Reagenz	Merck, Darmstadt	1.09293.0100
Oxidase-Reagenz (N, N, N', N' - Tetramethyl-1,4-phenylendiammoniumdichlorid)	Merck, Darmstadt	8.21102.0025
Brain Heart- (BHI-) Bouillon	Merck, Darmstadt	1.10493.0500
Glycerin 85%	Merck, Darmstadt	1.04091.1000
McFarland Standard	Biomerieux, Nürtingen	70900
Peptonwasser, gepuffert	Oxoid, Wesel	CM 0509T
Physiologische Kochsalzlösung (0,9 %)	Merck, Darmstadt	1.06404.5000
Isopropanol	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe	7343.1
Aqua dest.	---	---
DNA/RNA-freies Wasser	QIAGEN, Hilden	129115
Caso-Bouillon	Merck, Darmstadt	105459
Gallesalz Nr. 3	Oxoid, Wesel	LP 56
di-Kaliumhydrogenphosphat wasserfrei reinst	Merck, Darmstadt	1.05101
Novobiocin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	N1628
Mitomycin C from <i>Streptomyces caespitosus</i>	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	M 0503-2MG
N, N, N', N' - Tetramethyl-1,4-phenylendiammoniumdichlorid	Merck, Darmstadt	8.21102.0025
Tris-(hydroxymethyl)aminomethan	Roth	5429.3
EDTA (Tritiplex II)	Merck, Darmstadt	1.08417
Ficoll (Typ 70)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	F-2878
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt	8122
Ethidumbromid	Merck, Darmstadt	1.11608.0030
Biozym LE Agarose	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf	840004
Biozym Phor Agarose	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf	850180
Hae III Restriktionsenzym	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim	10693936001
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN, Hilden	28704
Primer vtx-Screening (MK 1/MK 2)	Firma Eurofins MWG Operon, Ebersberg	---
Primer vtx 1 (VT1-A/VT1-B)		
Primer vtx 2 (GK3/GK 4)		
Primer vtx 2d (VTAM-I/VTAM-II)		
Primer vtx 2e (FK1/FK2)		
Primer eae-Gen (SK1/SK2)		
Primer vtx 2d _{activatable} (Stx 2d _{activatable} / CKS2)		

Tabelle 15: Fortsetzung.

Medium/Lösung	Firma	Artikel bzw. Bestellnummer
d-ATP PCR Grade	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim	11 934 511 001
d-CTP PCR Grade		11 934 520 001
d-GTP PCR Grade		11 934 538 001
d-TTP PCR Grade		11 934 546 001
AmpliTa ^q ® Gold DNA Polymerase incl. 10 x PCR Puffer	Applied Biosystems, Darmstadt	N 808 0242
AmpliTa ^q ® DNA Polymerase incl. 10 x PCR Puffer	Applied Biosystems, Darmstadt	N 808 0166
Marker XIV (100 bp-Leiter)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim	1 721 933
Marker XIII (50 bp-Leiter)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim	1 721 925

3.2.3 Geräte und Labormaterialien

Für die gesamten Untersuchungen wurden die in Tabelle 16 und Tabelle 17 aufgeführten Geräte und Labormaterialien eingesetzt.

Tabelle 16: Geräte und Labormaterialien.

Gerätebezeichnung	Typ	Firma	Seriennummer
Autoklav	Varioklav 500 E	H+P Labortechnik, Oberschleißheim	56770295
Plattenabfüllgerät	Technomat 125	Intgra Biosciences, Fernwald	2784
Abzugsschrank	7593/F 7593/F	Köttermann GmbH & Co KG, Uetze-Hänigsen	780047 780027
Brutschränke	Tv 15810091 BvM 50 BVW 50 K	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach	810091 411008 964021
Schüttelinkubator	3033	Gesellschaft f. Labortechnik, Burgwedel	10 127 199 C
Dampftopf	Dampf Desinfektionsapparat 4120	Köttermann GmbH & Co KG, Uetze-Hänigsen	800068
Gefrierschrank	GS 5203 Index 10 GS 5203 Comfort 410934	Liebherr GmbH, Ochsenhausen	71.054.525.9 74.000.839.7
Gefrierschrank	GS 5D 14A	Robert Bosch Hausgeräte GmbH, Frankfurt a. M.	GSD 1443/01
Kühlschrank	Privileg Super Energie Sparer	Quelle GmbH	80.900110
Kühlschrank	Privileg Nr. 4324	Quelle Schickedanz AG & Co, Gießen	62800189
Kühlschrank	20071 Profi line 200071/001	Liebherr, Ochsenhausen	70.595.364.9 71.866.507.2
Kühl-Gefrier-Schrank	Glass line 511074 Glass line KGK 4055 Index 23	Liebherr, Ochsenhausen	14.349.342.4 14.349.346.2
Kühlzelle	TE 900*2030*60	Vissmann GmbH & Co, Allendorf	TE-11
Kühlaggregat	R 34 a	Danfoss GmbH, Offenbach a. M.	188158N110
Labor-Spülautomat	G 7883	Miele Professional	
Magnet-Rührer mit Heizplatte	RCT B basic RCH	Janke & Kunkel, Staufen	823484 56840

Tabelle 16: Fortsetzung.

Gerätebezeichnung	Typ	Firma	Seriennummer
pH-Meter	Microprocessor- Präzisions-pH/mV-Meter 539	WTW, Weilheim	43202044
Meßwertdrucker	YDP 03-0CE	Sartorius, Göttingen	70 635609 D09-96.15
Zentrifuge	5415 C	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg	5414 B - 69541
Mini-Zentrifuge	Micro-Zentrifuge MZ 001	Qualitron, INC., Mühlhausen	99060225
Reagenzglasschüttler	VV3-S 40	VWR International, Darmstadt	01.430 334
	VM 300	neoLab Migge Laborbedarfs-Vertrieb, Heidelberg	409264
Thermomixer	5436	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg	B 07445
Analyse- & Präzisionswaage	BA 210 S-OD 1/MC BB 100	Sartorius AG, Göttingen	50204739
Waage	BP 3100 S YDP 03-0CEBP 4100 S	Sartorius AG, Göttingen	50109796 91203189
Minischüttler	MS 1 Minishaker	Janke & Kunkel, Staufen	004127
Reinigungsautomat	25-06	Gilowy/Riebesam, Essen	5479
Sicherheitsbrenner	Gasi Nr. 3.340102	Schütt Labortechnik GmbH, Göttingen	95239/95240
Tischautoklav	Agarklav 10	Integra Bioscience, Fernwald	132.981105
Trockenschrank (Heißluftsterilisator)	FED 400	WTC Binder GmbH	910010
Tiefkühlzelle	4750 021	Viessmann Kältetechnik AG	HO 115181
Mikrowelle	Dimension 4 NE-973	Panasonic, Matsushita Electric Industrial Co., Japan	Q 06762, FTZ Nr: C- 001/86T
Elektrophoresekammer	Transphor Electrophoresis Dc Power Supply PS 250	Hoefer Scientific Instruments, San Francisco	95-2021
Elektrophoresekammer	---	MBT Brand Micro Bio Tec Brand	SIN 57042
ELISA-Reader	MRX Microplate Reader	Dynatech Laboratories, Denkendorf	2 CxA1 769
Monitor für Computer ELISA Reader	DeluxeScan 15M HL- 5848M	Hyundai, Raunheim	MDRHE 508300355
Computer ELISA Reader	Proline 486 Dx/4	Dynatech Laboratories, Denkendorf	1 FFV 0000
Elektrophoresekammer	MBT 30 EL	Fa. Fischer	---
Horizontalschüttler	HS 500	Janke & Kunkel GmbH, Staufen	337518
Thermocycler	Hybaid Touch Down Temperature Cycling System	Hybaid Limited, Heidelberg	H 1096011
Thermocycler	Personal Cycler	Biotron, Göttingen	9501253
Thermocycler	Gene Amp PCR System 9600	Perkin Elmer: Applied Biosystems Division	N 20494
Analysenlampe	Min UVIS 230 V / 110 V	Desaga GmbH, Heidelberg	95-134
Polaroid Instant Camera System	Polaroid MP 4+	Polaroid GmbH, Offenbach	Modell 44-16

Tabelle 16: Fortsetzung.

Gerätebezeichnung	Typ	Firma	Seriennummer
Ultraviolett Transilluminator	Mighty Bright UVTM	Hoefer Scientific Instruments, San Francisco	95-2019
Pipette	Reference 0,5-10 µl	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg	030322/372339
	Research 0,1-2,5 l		060191
	Reference 2-20 µl		039690
	Reference 10-100 µl		365448/117061
	Reference 50-200 µl		077104
	Reference 200-1000 µl		039658
	Reference 100-1000 µl		092249/315691
Stomacher	Bagmixer 400	Interscience, F. 78860 St. Nom	960 520 25
Sicherheitswerkbank	Lamin Air HB 2448	Heraeus Sepatech	22020739
UV-Kabinett	L020-GC	G. Kisker GbR	8407050021

Tabelle 17: Verwendetes Material.

Materialbezeichnung	Typ/Größe/Volumen	Firma	Bestellnummer
Cryoröhrchen	Qualilab-Cryoröhrchen, 2 ml	VWR Darmstadt	479-4503
Cryobank	Kryoboxen	VWR Darmstadt	479-0474
Aufbewahrungsbox			479-0477
Desinfektionsmittel	Gigasept Instru AF	Schülke und Mayr, Norderstedt	107412
	Desmanol Industrial pure		109424
	Buraton rapid		113912
Einmalhandschuhe	Touch NT-Nitrit	Ansell, München	
Einmalpapiertücher		Torx	
Waschlotion	Esemtan 5l	Schülke und Mayr, Norderstedt	116604
Hautbalsam	Esemtan 1l	Schülke und Mayr, Norderstedt	109602
Filter-Tips PE/PP natur	0,5-10 µl	Nerbe plus, Winsen	07.612.5300
	0-100 µl		07.642.7300
	100-1000 µl		07.692.5300
Impfösenhalter	Länge 240 mm	VWR, Darmstadt	631-0621
Messpipetten	1, 5	VWR, Darmstadt	612-1107
	10 ml		612-1114
Metallspatel	Edelstahl 18/10, antimagnetisch	VWR, Darmstadt	231-2185
Petrischalen mit Entlüftungsnocken	92 x 16 mm	Nerbe plus, Winsen	09.031.0060
Platinösen	0,5 mm/ID 3 mm	VWR, Darmstadt	631-7122
Reagenzgläser	160 x 16 x 0,8-1,0	VWR, Darmstadt	212-0019
Reagenzglasständer	2 x 6	VWR, Darmstadt	212-6405
	2 x 12		212-6420
	3 x 12		212-6425
Reaktionsgefäßständer	---	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe	4562.1
			4563.1
Reaktionsgefäße	PCRTube 0,2 ml neutral	Sarstedt, Nümbrecht	72.737.002
	MicroTube 1,5 ml		72.694.105
Messzylinder	50 ml	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe	Y306.1
Sicherheitspipettierball	(Peleusball)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe	C261.1
Sterile Probenbeutel 400 (Stomacherbeutel)	Typ „P“ mit Filterstreifen	Meintrup DWS Laborgeräte, Lähden	ME 001006a
Verschlussfolien	Parafilm® M	VWR, Darmstadt	291-1213

Tabelle 17: Fortsetzung.

Materialbezeichnung	Typ/Größe/Volumen	Firma	Bestellnummer
NOVITEC® Verotoxin Test	Testkit mit 96 Kavitäten	HISS Diagnostics GmbH, Freiburg	710096
Duopath® Verotoxin-Test	Immunochromatographischer Schnelltest	Merck, Darmstadt	1.04144.001
Wattestäbchen, steril	Sterile Applikatoren	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe	EH12.1
Filterereinheit	FP 30/0,2 CA-S	VWR, Darmstadt	10 462 205
Biochemisches Testsystem	Api 20E Testsystem	bioMérieux, Nürtingen	20100
	TDA		70402
	VP1 & VP2 Kit		70422
	James Reagenz Paraffinöl		70542 70100
Autoklavensack	Entsorgungs- & Vernichtungsbeutel	VWR, Darmstadt	129-9712
Handtuchpapier	Tork classic	Hegro Eichler, Büttelborn	290162
Handschuhe	Nitril Perfect Handschuhe	Hansa-Trading, Hamburg	9G8E-S
Skalpelle	AESCLAP Steril-Skalpell	Henry Schein Medical, Hamburg	710-5882

3.3 Methoden

3.3.1 Immunologischer Nachweis von Verotoxin-bildenden *E. coli*

3.3.1.1 Übersicht über den Versuchsaufbau

In Abbildung 5 ist die Übersicht zum Untersuchungsablauf schematisch wiedergegeben. Die Anreicherung der einzelnen Kotproben ($n = 353$) erfolgte in gepuffertem Peptonwasser (BPW) sowie teilweise in modifizierter Trypton-Soja-Bouillon mit Novobiocin (mTSB + N). Bei den ersten 50 Proben wurde das homogenisierte Untersuchungsmaterial (1:10) sowohl in BPW als auch in mTSB+N angereichert. Das letztgenannte Medium ist gemäß § 64 LFGB in der Amtlichen Methodensammlung zur Anreicherung von VTEC in Lebensmitteln vorgesehen. Die in mTSB + N enthaltenen Salze, Gallensalze und das Antibiotikum Novobiocin können jedoch das Wachstum von gestressten, z. B. eingefrorenen Bakterien, hemmen (HUSSEIN UND BOLLINGER, 2008). Deshalb wurde zur Kultivierung eventuell durch das Einfrieren vorgeschädigter VTEC gepuffertes Peptonwasser eingesetzt (BEUTIN ET AL., 2010). Dieses erwies sich als gleichwertig und wurde daher bei den Untersuchungen der weiteren 303 Kotproben als alleiniges Anreicherungsmedium verwendet.

Der immunologische Nachweis erfolgte mit zwei verschiedenen Testsystemen – dem NOVITEC® Verotoxin Test und dem Duopath® Verotoxin Test. Bei einem positiven Ergebnis schloss sich eine Subkultivierung aus der Anreicherungsbouillon auf dem Hemorrhagic Colitis (HC)-Agar nach SZABO ET AL. (1986) an. Von diesem Nährmedium ausgehend wurden morphologisch unterschiedliche Kolonien molekularbiologisch auf das Vorhandensein von Verotoxin-Genen untersucht.

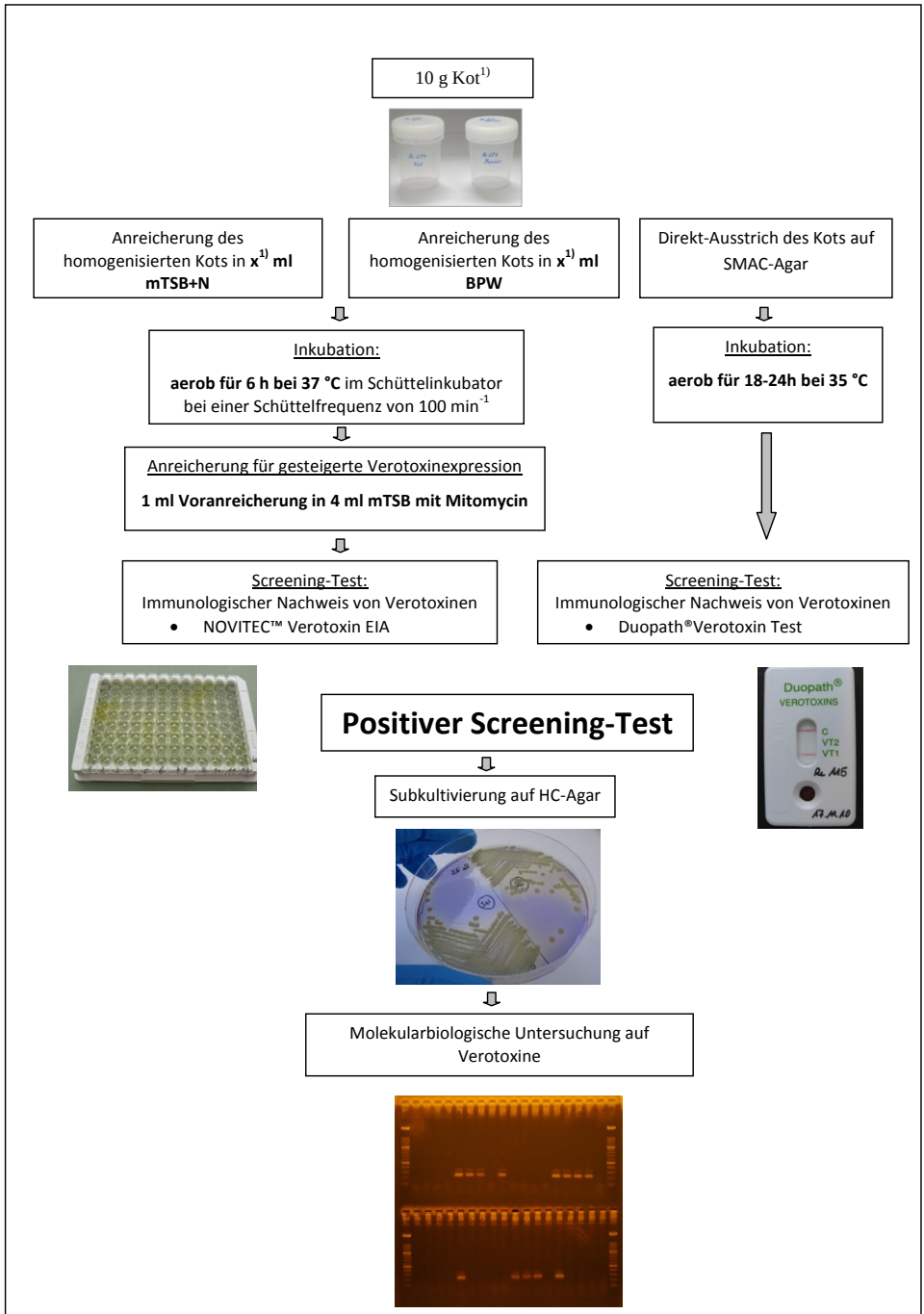


Abbildung 5: Versuchsaufbau für den Nachweis von Verotoxin-bildenden *E. coli* (VTEC).

¹⁾ In Abhängigkeit von der eingesetzten Kotmenge wurde das Voranreicherungsmedium im Verhältnis von 1/10 dazugegeben.

3.3.1.2 Anreicherungsverfahren

Von jeder Kotprobe wurden 10 g bzw., wenn nicht genügend Kotmaterial zur Verfügung stand, die gesamte Kotprobe, in einem sterilen Stomacherbeutel eingewogen. Da vor der Anreicherung des Kots ein Direktausstrich auf Sorbit-MacConkey-Agar (SMAC) erfolgte – dieser wird für die Durchführung des Duopath® Verotoxin-Test benötigt –, wurden die festen Kotkügelchen zuerst in 5 ml gepufferten Peptonwasser manuell zerdrückt und homogen verteilt. Danach war es möglich, mithilfe eines sterilen Wattetupfers eine repräsentative Probe des Kots auf SMAC-Agar auszubringen. Insgesamt wurde 90 ml gepuffertes Peptonwasser bzw. in Abhängigkeit von der eingesetzten Kotmenge – ein Verhältnis von 1/10 – zum Kot dazugegeben, manuell zu einer homogenen Masse zerdrückt und anschließend für 60 s auf niedriger Stufe gestomachert.

Bei den ersten 50 Proben wurde das homogenisierte Untersuchungsmaterial, wie in der Übersicht zum Versuchsaufbau bereits geschildert, sowohl in BPW als auch in mTSB+N angereichert.

Die Anreicherung des homogenisierten Untersuchungsmaterials erfolgte jeweils für 6 h bei 37°C im Schüttelinkubator bei 100 min⁻¹. Zum immunologischen Nachweis von Verotoxinen wurde der Enzymimmunoassay (EIA) NOVITEC® Verotoxin Test sowie der immunochromatographische Duopath® Verotoxin-Test eingesetzt.

3.3.1.3 Immunologischer Nachweis mit dem NOVITEC® Verotoxin Test

Zur Durchführung des EIA's wurde nach einer Inkubationszeit von 6 h aus der Anreicherung ein Aliquot von 1 ml entnommen, in 4 ml modifizierte Trypton-Soja-Bouillon mit Mitomycin (mTSB+M) überführt und aerob für weitere 16-18 h im Schüttelinkubator bei 100 min⁻¹ Umdrehungen inkubiert. Bei positivem Screening-Test wurde aus der 24-stündigen Anreicherung mittels einer Öse ein Verdünnungsausstrich über drei HC-Platten zur Isolierung der VTEC angelegt.

Der NOVITEC® Verotoxin Test ist ein schneller, qualitativer Mikrotiter-Enzym-Immunoassay zur Bestimmung von Verotoxinen (VT 1 und VT 2). Die Mikrotiterkavitäten dieses Tests sind mit polyklonalen Verotoxin-Antikörpern beschichtet. In einem ersten Reaktionsschritt werden die in der Anreicherungskultur vorhandenen Verotoxine von den Antikörpern der Festphase gebunden. Mit einem darauffolgenden Waschschrift wird ungebundenes Material entfernt. In einem zweiten Reaktionsschritt binden monoklonale Anti-Verotoxin-Antikörper an vorhandene Antigen-Antikörper-Komplexe. Nach einem weiteren Waschschrift werden Peroxidase-markierte Anti-Maus-Antikörper hinzugegeben. Hiernach

wird die Reaktion sichtbar gemacht. Die Auswertung kann visuell oder aber spektralphotometrisch erfolgen. Die Auswertung der eigenen Proben erfolgte sowohl visuell als auch spektralphotometrisch, da sich die alleinige spektralphotometrische Auswertung als nicht ausreichend zuverlässig erwies.

Bei der visuellen Auswertung galt ein Ergebnis als negativ, wenn die Kavität der Probe keine und als positiv, sobald sie eine distinkte gelbe Färbung aufwies. Diese Proben wurden weitergehend molekularbiologisch untersucht.

Das spektralphotometrische Ergebnis wurde bichromatisch bei 450/630 nm ausgewertet. Hierbei zeigte ein Extinktionswert (OD) von $< 0,150$ an, dass der Ansatz keine detektierbaren Mengen an Verotoxin enthält. Bei einem OD-Wert $\geq 0,150$ wurde die Probe als Verotoxin-positiv eingestuft.

3.3.1.4 Nachweis mit dem Duopath® Verotoxin-Test

Für die Untersuchung mit dem Duopath®-System wurden die Kotproben direkt – ohne Voranreicherung – auf SMAC ausgestrichen und 18-24 h bei 35°C inkubiert. Mittels eines Wattetupfers wurden die nach Inkubation gewachsenen Kolonien abgenommen, in eine Polymyxin B-Lösung (5 mg/ml) überführt und zur Toxinfreisetzung für 30 Minuten bei 35 °C inkubiert. Der Verotoxin-Nachweis erfolgte durch das Auftropfen von 200 µl dieser Lösung auf den Testträger und resultierte im positiven Fall in der Ausprägung sichtbarer Banden. Dabei war eine differenzierende Erfassung von Verotoxin 1 und Verotoxin 2 möglich.

Bei dem Duopath® Verotoxin Test handelt es sich um einen immunchromatographischen Schnelltest, der die Verotoxine 1 und 2 über Gold-markierte Antikörper nachweist. Aufgrund der Goldmarkierung der Antikörper entsteht im positiven Fall eine rot gefärbte gerade Linie. In jedem Testansatz ist gleichzeitig eine Positivkontrolle enthalten, die das korrekte Funktionieren des Tests anzeigt.

3.3.2 Kulturelle Untersuchung der präsumtiven VTEC-Isolate

Aus den 24-stündigen Anreicherungen immunologisch positiv getesteter Proben wurde mittels einer Öse ein Verdünnungsausstrich auf drei HC-Platten angelegt. Die Anreicherung wurde für eventuell erforderliche Nachuntersuchungen bei + 4 °C aufbewahrt. Nach Inkubation der HC-Platten für 16-18 h bei 41 ± 1 °C wurden, falls vorhanden, mindestens 20 morphologisch möglichst unterschiedliche Kolonien zur weiteren Untersuchung ausgewählt. Diese wurden zu vier Pools à fünf Kolonien zusammengefasst und anschließend in der PCR auf das Vorhandensein von Verotoxin-Gen(en) mit dem Primersystem nach KARCH UND MEYER

(1989), wie in Kap. 3.3.3.1 beschrieben, untersucht. Bei einem positiven Ergebnis wurden die einzelnen Kolonien des Pools als Subkultur auf Plate-Count-Agar (PC-Agar) angelegt und molekularbiologisch auf Verotoxin-Gen(e) untersucht, um die präsumtiven VTEC-Isolate zu identifizieren.

Erwies sich die PCR als negativ, wurden erneut 10 Kolonien ausgesucht und zu 2 Pools à 5 Kolonien zusammengefasst und anschließend wiederum molekularbiologisch auf das Vorhandensein von Verotoxin-Gen(en) untersucht. Waren diese Pools erneut negativ, wurde von der ersten Platte des Verdünnungsaustrichs eine Abschwemmung des gesamten Koloniematerials der Platte vorgenommen und molekularbiologisch untersucht. Im negativen Fall war die Untersuchung der entsprechenden Probe abgeschlossen. War hingegen die molekularbiologische Untersuchung der Abschwemmung positiv auf Verotoxin-Gen(e), wurde die Abschwemmung, welche für eventuelle Nachuntersuchungen bei + 4 °C aufbewahrt wurde, erneut in einem Verdünnungsaustrich auf HC-Agar ausgestrichen. Nach Inkubation der HC-Platten für 16-18 h bei 41 ± 1 °C wurden, falls vorhanden, wiederum 20 morphologisch möglichst unterschiedliche Kolonien auf Verotoxin-Gene untersucht. Im positiven Fall wurden die Kolonien der Pools einzeln, wie zuvor beschrieben, weiter untersucht.

Sämtliche, auf diese Weise erhaltenen *E. coli*-Isolate wurden anschließend molekularbiologisch auf die verschiedenen Verotoxin-Subtypen sowie auf das *E. coli* attaching and effacing (*eae*)-Gen untersucht.

3.3.2.1 Spezies-Bestätigung

Die Zugehörigkeit der Isolate zur Spezies *E. coli* erfolgte über das Wachstum auf HC-Agar nach SZABO ET AL. (1986), dem Fluoreszenzverhalten sowie der Sorbitverwertung und dem Indol-Test. Typische Kolonien zeigen unter UV-Licht bei 366 nm aufgrund der Glucuronidverwertung eine bläuliche Fluoreszenz sowie eine gelbe Koloniemorphologie aufgrund der Sorbitverwertung. Um die Koloniemorphologie der jeweiligen Isolate auf HC-Agar beschreiben zu können, wurde von der Reinkultur der PC-Platte eine Kolonie abgenommen und auf HC-Agar überimpft. Dieser wurde aerob bei 41 ± 1 °C für 16-18 h inkubiert. Das HC-Nährmedium enthält das Substrat 4-Methylumbelliferyl- β -D-Glucuronid (MUG). Dieses Substrat kann von 94-96 % der *E. coli*-Stämme mithilfe des Enzyms β -D-Glucuronidase zu 4-Methyl-umbelliferon umgesetzt werden (FENG UND HARTMANN, 1982; KILIAN UND BÜLOW, 1979, BÜLTE UND REUTER, 1989), welches bei 366 nm fluoresziert. Eine

weitere Schlüsselreaktion dieses Nährmediums ist die Sorbitverwertung, die durch eine Gelbfärbung der Kolonien angezeigt wird.

Im Anschluß an die Inkubation wurde sofort das Fluoreszenzverhalten sowie die Sorbitverwertung beurteilt, da sich die Morphologie der Kolonien auf HC-Agar sowohl bei RT als auch im Kühlschrank innerhalb kürzester Zeit verändert und somit nicht mehr eindeutig charakterisierbar ist.

Da die Beurteilung der Fluoreszenz bzw. die Beurteilung MUG-negativer Kolonien auf dem HC-Agar oft nicht gut durchzuführen war, wurden die Isolate zusätzlich auf *Escherichia coli*-Direkt-Agar (ECD-Agar) überimpft und der Nährboden aerob bei 37 °C für 24 h inkubiert. Dieses Nährmedium enthält wie der HC-Agar neben dem Substrat MUG auch einen Zusatz von Trypton, so dass sowohl das Fluoreszenz-Verhalten als auch die Indol-Bildung beurteilt werden konnte. Zur Überprüfung auf die Produktion von Indol, wurden die Kolonien mit KOVÁCS-Indolreagenz überschichtet und eine mögliche Rotfärbung nach 10 Sekunden beurteilt. Dieser Test dient zum Nachweis des Enzyms Tryptophanase. Das im Nährboden enthaltene Substrat Tryptophan wird von *E. coli* zu Brenztraubensäure, Ammoniak und Indol verstoffwechselt. Das Indol reagiert mit dem im KOVÁCS-Indolreagenz enthaltenen 4-Dimethylaminobenzaldehyd zu einem roten Farbstoff. Ein Bakterium ist Indol-positiv, wenn sich nach Zugabe des Indol-Reagenz eine Rotfärbung einstellt. Bleibt die Lösung hingegen farblos, ist das Bakterium Indol-negativ. Nach BÜLTE UND REUTER (1989) erwiesen sich ca. 3 % der von ihnen aus Lebensmitteln isolierten *E. coli*-Stämme als Indol-negativ. Solche Isolate wie auch Isolate, die sich im Screening als vtx-positiv erwiesen, bei denen aber kein Verotoxin-Subtyp nachzuweisen war, wurden im api 20E-Testsystem untersucht. Zuvor erfolgte jedoch grundsätzlich bei allen Isolaten der Cytochrom-Oxidase-Test. Dieser Test dient zur Klassifizierung und Identifizierung von Bakterien, die das Enzym Cytochromoxidase, ein sehr weit verbreitetes Enzym der Eisenporphyrin-Gruppe, bilden können.

Die Beimpfung, die Inkubation sowie die Auswertung des api 20E Testsystems erfolgten gemäß den Herstellerangaben. Anhand der aufgetretenen Farbumschläge konnte ein biochemisches Profil erstellt werden, das über die Datenbank des Herstellers einem oder aber auch mehreren Spezies zugeordnet werden konnte.

Zur Überprüfung der Nährböden und des KOVÁCS-Indolreagenz wurde als Positivkontrolle *E. coli* ATCC 25922 sowie als Negativkontrolle *Klebsiella pneumoniae* mitgeführt.

3.3.3 Molekularbiologische Untersuchung der VTEC-Isolate

Zur weitergehenden Differenzierung wurden die präsumtiven VTEC-Isolate molekularbiologisch auf die unterschiedlichen Verotoxin-Gene (*vtx*) und das *eae*-Gen untersucht. In Tabelle 18 sind die dazu eingesetzten Primersysteme aufgelistet. Zusätzlich wurden bei allen, nachfolgend beschriebenen PCR-Ansätzen eine bzw. zwei Positivkontrollen, eine Negativkontrolle sowie jeweils ein Leerwert für die Probenaufbereitung und den Mastermix mitgeführt. Die Primersysteme, die im Rahmen der erneuten Subtypisierung in den Referenzzentren verwendet wurden, liegen hingegen nicht vor.

Tabelle 18: Übersicht über die verwendeten Primersysteme.

Primer Akronym	Ziel-Gen	Sequenz der Primer (5'-3')	Amplifikat -größe (bp)	Referenz
MK1 / MK2	<i>vtx</i> 1 & <i>vtx</i> 2	MK1: 5'-TTTACGATAGACTTCTCGAC-3' MK2: 5'-CACATATAAATTATTCGCTC-3'	227 bzw. 224	KARCH UND MEYER (1989)
VT1-A / VT1-B	<i>vtx</i> 1	VT1-A: 5'-GAAGAGTCCGTGGGATTACG-3' VT1-B: 5'-AGCGATGCAGCTATTAATAA-3'	130	POLLARD ET AL. (1990)
GK3 / GK 4	<i>vtx</i> 2	GK3: 5'-ATGAAGAAGATGTTTATG-3' GK4: 5'-TCAGTCATTATTAAACTG-3'	260	KARCH ET AL. (1997)
VTAM-I / VTAM-II	<i>vtx</i> 2d	VTAM-I: 5'-AGGGCCCACTCTTTAATACATCC-3' VTAM-II: 5'-CGTCATTCTGTAACTGTGCG-3'	242	ABDUL-MAWJOOD UND BÜLTE (2000)
FK1 / FK2	<i>vtx</i> 2e	FK1: 5'-CCCGGATCCAAGAAGATGTTTATAG-3' FK2: 5'-CCCGAATTCTCAGTTAACTTCACC-3'	280	RÜSSMANN ET AL. (1995)
SK1 / SK2	<i>eae</i>	SK1: 5'-CCCGAATTCGGCACAAGCATAAGC-3' SK2: 5'-CCCGGATCCGTCTCGCCAGTATTTCG-3'	863	SCHMIDT ET AL. (1994)
Stx 2d _{activatable} / CKS2	<i>vtx</i> 2d _{activatable}	Stx2d_{activatable}: 5'-CTTTATATACAACGGGTG-3' CKS2: 5'-CTGAATTGTGACACAGATTAC-3'	359	ZHENG ET AL. (2008)

Der Nachweis von Verotoxin-Genen erfolgte mithilfe der Primer nach KARCH UND MEYER (1989). Die degenerierten Primer erlauben den Nachweis sowohl des Verotoxins 1 (*vtx* 1) als auch des Verotoxins 2 (*vtx* 2) sowie dessen Varianten *vtx* 2c, *vtx* 2d, *vtx* 2e und *vtx* 2g (SCHMIDT ET AL., 2000; LEUNG ET AL., 2003). Die erhaltenen DNS-Fragmente haben eine Länge von 227 bp bzw. 224 bp. Dieses PCR-Verfahren dient jedoch nur als Screening-Methode zum Nachweis des Verotoxinbildungsvermögens, nicht aber zur Unterscheidung von Verotoxin 1 und 2.

3.3.3.1 Gewinnung und Aufbereitung der Proben-DNS

Die Gewinnung der Proben-DNS erfolgte nach dem Prinzip der Hitze-Lyse. Dazu wurde vom PC-Agar, auf dem die verdächtigen Isolate subkultiviert worden waren, Koloniematerial abgenommen. Von jeweils fünf Kolonien wurden Poole in 300 µl sowie die Einzelkolonien in jeweils 150 µl Aqua bidest. eingegeben, gründlich durchmischt und im Wasserbad bei 100 °C für 10 min. gekocht.

Für Abschwemmungen wurde 1 ml sterile isotonische NaCl-Lösung auf die erste HC-Platte des Verdünnungsausstrichs gegeben, das gesamte Koloniematerial mithilfe eines Spatels in der Kochsalzlösung gelöst, anschließend mit einer Eppendorfpipette aufgenommen und in eine Eppendorf tube pipettiert. Nach dem Durchmischen wurden von dieser Abschwemmung 50 µl abgenommen und zu 950 µl Aqua bidest. hinzugegeben (Verdünnung 1:20), gut durchmischt und im Wasserbad bei 100 °C für 10 min. gekocht.

Anschließend wurden die Ansätze sofort auf Eis abgekühlt, auf einem Reagenzglasschüttler kräftig durchmischt und für zwei Minuten bei 14.000 Upm zentrifugiert. Die DNS wurde bei + 4 °C bis zur molekularbiologischen Untersuchung aufbewahrt.

3.3.3.2 PCR-Ansatz

Der sog. Mastermix für die PCR wurde im UV-Kabinett hergestellt. Die dafür vorgesehenen Reagenzien wurden bei mind. – 18 °C aufbewahrt und vor der Herstellung des Mastermixes bis auf die Polymerase AmpliTaq® aufgetaut. Der Mastermix wurde unter Auslassung der Ziel-DNS für einen Einzelansatz nach folgendem Pipettierprotokoll angesetzt:

Reagenzien und deren Konzentrationen	Pipettiermenge pro Einzelansatz (µl)
Aqua bidest.	17,4
10 x Polymerase-Puffer (15 mM MgCl ₂), Fa. Applied Biosystems	2,5
dNTP-Mix (à 10mM)	0,5
Primer MK 1/ MK 2 (10µM) Fa. Eurofins MWG Operon	je 1,0
Polymerase AmpliTaq® (5U/µl), Fa. Applied Biosystems	0,1
DNS	2,5
Inhalt pro Reaktionsgefäß	25,0

Der nach dem Pipettierprotokoll hergestellte Mastermix wurde anschließend in Portionen von 22,5 µl in PCR-Gefäße überführt und die Proben-DNS hinzu pipettiert. Hiernach kamen die PCR-Ansätze unverzüglich in einen Thermocycler.

Die Amplifikation der Ziel-DNS erfolgte nach folgendem Cycler-Temperaturprofil:

Initiale Denaturierung	94 °C für 5 min.		
Denaturierung	94 °C für 30 s	}	35 Zyklen
Annealing	44 °C für 30 s		
Extension	72 °C für 30 s		
Finale Extension	72 °C für 5 min.		
Abkühlung auf 4 °C.			

3.3.3.2.1 Darstellung der Amplifikate

Die Amplifikate wurden mithilfe der Agarose-Gelelektrophorese und einer sich anschließenden Ethidiumbromidfärbung dargestellt.

Zur Herstellung eines 1,5 %igen Gels wurde eine entsprechende Menge Standard-Agarose in 1 x TBE-Puffer (s. Kap. 11.2.1 im Anhang) aufgekocht, im Wasserbad auf etwa 50 °C abgekühlt, anschließend auf einen Gelträger gegossen und bei Raumtemperatur zum Erstarren gebracht. Nach dem Erstarren wurde das Agarosegel zeitnah mit 1 x TBE-Puffer überschichtet, um ein Austrocknen des Gels zu verhindern.

Die Amplifikate wurden mit 6,25 µl Gel-Loading-Buffer (s. Kap. 11.2.2 im Anhang) vermischt. Von dieser Mischung wurden 10 µl in die jeweilige Geltasche pipettiert. Zur Orientierung wurde ein DNS-Molekulargewichtslängenstandard, der Marker XIV, mitgeführt. Die Elektrophorese erfolgte in einer Horizontalgelkammer, die mit 1 x TBE Puffer als Laufpuffer gefüllt war. Die Laufzeit betrug ca. 1,5 h bei 120 V. Die Färbung des Gels mit Ethidiumbromid (s. Anhang Kap. 11.2.3) erfolgte auf einem Horizontalschüttler für ca. 1 h. Nicht gebundenes Ethidiumbromid wurde anschließend für ca. 15 min im Wasserbad auf dem Horizontalschüttler ausgewaschen. Die Darstellung der Amplifikate erfolgte unter UV-Licht bei 302 nm auf einem Transilluminator und wurde fotografisch dokumentiert.

3.3.3.3 Nachweis des Verotoxin-Gens vtx 1

Der qualitative Nachweis des Verotoxin-Gens vtx 1 bei *E. coli* erfolgt mit dem nach POLLARD ET AL. (1990) beschriebenen Verfahren. Die Länge des Amplifikats beträgt 130 bp. Nach Aufbereitung der DNS einer Einzelkolonie (s. Kap. 3.3.3.1) wurde mit Ausnahme der

Primer der Mastermix nach demselben Pipettierprotokoll, wie in Kap. 3.3.3.2 dargestellt, hergestellt.

Die Amplifikation der Ziel-DNS erfolgte nach folgendem Cycler-Temperaturprofil:

Initiale Denaturierung	94 °C für 5 min.	
Denaturierung	94 °C für 30 s	} 30 Zyklen
Annealing	54 °C für 30 s	
Extension	72 °C für 35 s	
Finale Extension	72 °C für 5 min.	
Abkühlung auf 4 °C.		

Die Amplifikate wurden wie in Kap. 3.3.3.2.1 beschrieben mithilfe der Agarose-Gelelektrophorese und einer sich anschließenden Ethidiumbromidfärbung dargestellt.

3.3.3.4 Nachweis des Verotoxin-Gens vtx 2

Der Nachweis des Verotoxin-Gens vtx 2 erfolgt mit den Primern „GK3“ und „GK4“ nach KARCH ET AL. (1997). Ein positiver Nachweis des Gens bestätigt das Vorliegen der beiden vtx 2-Genvarianten „vtx 2 klassisch“ und „vtx 2c“. Zur Unterscheidung der beiden Subtypen schließt sich an die PCR ein Restriktionsverdau mit dem Enzym *HaeIII* an.

Die Amplifikatlänge des PCR-Produktes beträgt 260 bp. Im Restriktionsverdau bleibt bei Vorliegen von vtx 2 klassisch das Amplifikat ungeschnitten, bei Vorliegen von vtx 2c wird das Amplifikat einmal geschnitten, so dass sich zwei Banden in den Größen ca. 120 und 140 bp darstellen lassen.

Nach Aufbereitung der DNS einer Einzelkolonie (s. Kap. 3.3.3.1) wurde der Mastermix unter Auslassung der Proben-DNS für einen Einzelansatz nach folgenden Pipettierprotokoll angesetzt:

Reagenzien und deren Konzentrationen	Pipettiermenge pro Einzelansatz (µl)
Aqua bidest.	17,3
10 x Polymerase-Puffer (15 mM MgCl ₂), Fa. Applied Biosystems	2,5
dNTP-Mix (each 10mM)	0,5
Primer GK3 / GK 4 (10µM) Fa. Eurofins MWG Operon	je 1,0
Polymerase AmpliTaq® (5U/µl), Fa. Applied Biosystems	0,2
DNS	2,5
Inhalt pro Reaktionsgefäß	25,0

Der nach dem Pipettierprotokoll hergestellte Mastermix wurde anschließend in Portionen von 22,5 µl in PCR-Gefäße überführt und die Proben-DNS hinzu pipettiert. Hiernach kamen die PCR-Ansätze unverzüglich in einen Thermocycler. Die Amplifikation der Ziel-DNS erfolgte nach folgendem Cycler-Temperaturprofil:

Initiale Denaturierung	94 °C für 5 min.	
Denaturierung	94 °C für 30 s	} 35 Zyklen
Annealing	52 °C für 60 s	
Extension	72 °C für 45 s	
Finale Extension	72 °C für 5 min.	
Abkühlung auf 4 °C.		

Die Amplifikate wurden wie in Kap. 3.3.3.2.1 beschrieben mithilfe der Agarose-Gelelektrophorese und einer sich anschließenden Ethidiumbromidfärbung dargestellt.

3.3.3.4.1 Restriktionsverdau

Der Restriktionsverdau des Amplifikats von 260 bp erfolgte mit dem Enzym *Hae III*. Dieses Enzym erkennt folgende Basensequenz und schneidet wie nachfolgend dargestellt:



Der sog. Mastermix für den Restriktionsverdau wurde im UV-Kabinett hergestellt. Dieser wurde unter Auslassung der Proben-DNS für einen Einzelansatz nach folgenden Pipettierprotokoll angesetzt:

Reagenzien und deren Konzentrationen	Pipettiermenge pro Einzelansatz (µl)
Aqua bidest.	10,3
10 x Puffer Fa. Roche	2,5
Restriktionsenzym <i>Hae III</i> (10 U/µl), Fa. Applied Biosystems	0,2
PCR-Produkt*	12
Inhalt pro Reaktionsgefäß	25,0

*Die eingesetzte Menge des PCR-Produktes variierte, da sie abhängig von der sich darstellenden Bande ist.

Der nach dem Pipettierprotokoll hergestellte Mastermix wurde anschließend in Portionen von 13 µl in 1,5 ml Eppendorf-Gefäße überführt und das PCR-Produkt hinzu pipettiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation bei 37 °C für 24 h.

Die Amplifikate wurden mit Ausnahme von einigen Änderungen wie in Kap. 3.3.3.2.1 mithilfe der Agarose-Gelelektrophorese und einer sich anschließenden Ethidiumbromidfärbung dargestellt.

Zur Darstellung potentiell geschnittener Amplifikate wurde jedoch statt des 1,5 % ein 3 %iges Gel mit einer entsprechenden Menge an Biozym Phor Agarose in 1 x TBE-Puffer (s. Anhang Kap. 10.2.1) hergestellt. Die weitere Herstellung erfolgte wie in Kap. 3.3.3.2.1 bereits beschrieben. Des Weiteren wurde im Rahmen der Elektrophorese statt des Markers XIV, zur Orientierung der Marker XIII, mitgeführt. Die Laufzeit der Elektrophorese betrug ca. 2,5 h bei 100 V. Die Färbung des Gels und die Darstellung der Amplifikate erfolgten wie bereits in Kap. 3.3.3.2.1 beschrieben.

3.3.3.5 Nachweis des Verotoxin-Gens *vtx 2d*

Der qualitative Nachweis des Verotoxin-Gens *vtx 2d* bei *E. coli* erfolgt mit dem nach ABDULMAWJOOD UND BÜLTE (2000) beschriebenen Verfahren. Die Länge des Amplifikats beträgt 242 bp (s. Tabelle 18). Nach Aufbereitung der DNS einer Einzelkolonie (s. Kap. 3.3.3.1) wurde mit Ausnahme der Primer der Mastermix nach demselben Pipettierprotokoll, wie in Kap. 3.3.3.2 dargestellt, hergestellt.

Die Amplifikation der Ziel-DNS erfolgte nach folgendem Cycler-Temperaturprofil:

Initiale Denaturierung	94 °C für 5 min.	
Denaturierung	94 °C für 30 s	} 30 Zyklen
Annealing	54 °C für 40 s	
Extension	72 °C für 35 s	
Finale Extension	72 °C für 5 min.	
Abkühlung auf 4 °C.		

Die Amplifikate wurden wie in Kap. 3.3.3.2.1 beschrieben mithilfe der Agarose-Gelelektrophorese und einer sich anschließenden Ethidiumbromidfärbung dargestellt.

3.3.3.6 Nachweis des Verotoxin-Gens *vtx 2d_{activatable}*

Der qualitative Nachweis des Verotoxin-Gens *vtx 2d_{activatable}* erfolgte in Anlehnung an das bei ZHENG ET AL. (2008) beschriebene Verfahren. Die Länge des Amplifikats beträgt 359 bp. Nach Aufbereitung der DNS einer Einzelkolonie (s. Kap. 3.3.3.1) wurde mit Ausnahme der Primer der Mastermix nach demselben Pipettierprotokoll, wie in Kap. 3.3.3.4 dargestellt, hergestellt.

Die Amplifikation der Ziel-DNS erfolgte nach folgendem Cycler-Temperaturprofil:

Initiale Denaturierung	94 °C für 10 min.	
Denaturierung	94 °C für 30 s	} 35 Zyklen
Annealing	54 °C für 45 s	
Extension	72 °C für 45 s	
Finale Extension	72 °C für 10 min.	
Abkühlung auf 4 °C.		

Zur Überprüfung des Amplifikationserfolges wurden die PCR-Produkte wie in Kap. 3.3.3.2.1 beschrieben mithilfe der Agarose-Gelelektrophorese und einer Ethidiumbromidfärbung dargestellt.

Nach der Auswertung des PCR-Produkts erwies sich dieses als nicht spezifisch für den Subtypen *vtx 2d_{activatable}*, woraufhin – nach Rücksprache mit dem Nationalen Referenzlabor für *E. coli* – das Amplifikat der entsprechenden Isolate in einem externen Labor sequenziert wurde. Da im Rahmen der *vtx 2d_{activatable}*-PCR nicht nur die Zielbande von 359 bp amplifiziert wurde, sondern auch eine Fehlbande, die im Agarosegel kurz oberhalb der Zielbande zu

detektieren war, musste die Zielbande für die Sequenzierung aus dem 1,5 % Agarosegel herausgeschnitten und extrahiert werden.

3.3.3.6.1 DNS-Extraktion mit dem QIAquick Gel Extraction Kit

Zur Extraktion der DNS aus dem Agarose-Gel wurde der kommerziell erhältliche QIAquick Gel Extraction Kit der Firma Qiagen eingesetzt. Das Prinzip beruht auf der Adsorption der DNS an Silicagelmembranen. Während der Aufreinigung im Rahmen der Gel-Extraktion werden Primer, Nukleotide, Enzyme, Salze, mineralisches Öl, Agarose, Ethidiumbromid und andere Verunreinigungen von der DNS entfernt. Die so aufgereinigte und anschließend eluierte DNS kann in die Sequenzierungsreaktion eingesetzt werden.

Im Folgenden werden die einzelnen Schritte der DNS-Extraktion aus dem Agarose-Gel aufgelistet:

- Ausschneiden der Zielbande aus dem Ethidiumbromid gefärbten und anschließend gewässerten Agarose-Gel unter UV-Licht; UV-Einwirkung so kurz wie möglich halten, da unter UV-Licht die DNA sehr schnell zerstört wird
- Einwaage des ausgeschnittenen Gelstücks in einem 2 ml Eppendorf-Gefäß; vor der Einwaage die Waage mit dem leeren Eppendorf-Gefäß auf TARA stellen; bei einer größeren Einwaage von 400 mg sollten die Einwaagen auf mehrere Eppendorf-Gefäße verteilt werden
- Zugabe des dreifachen Volumens an Puffer QG bei bis zu 2 %-ige Gelen
- Inkubation bei 50 °C im Thermomixer bis zur vollständigen Auflösung der Agarose; alle 2-3 min. gut vortexen
- zur DNS-Fällung Zugabe eines Gelvolumens Isopropanol, vorsichtig über Kopf mischen
- zur Bindung der DNS Überführung des Volumens auf eine Säule
- Zentrifugation bei 13.000 U/min. für 1 min.
- Säule auf ein neues Sammelgefäß überführen, altes Filtrat verwerfen
- Waschen der DNS: Zugabe von 700 µl PE Puffer
- Zentrifugation bei 13.000 U/min. für 1 min.
- Säule mit Waschpuffer 2-5 min. stehenlassen
- Säule auf ein neues Sammelgefäß überführen, altes Filtrat verwerfen
- Zentrifugation bei 13.000 U/min. für 1 min.
- DNS-Elution: Säule auf ein neues Eppendorf-Gefäß setzen, 32 µl EB Puffer direkt auf das Zentrum der Membran pipettieren
- Inkubation bei RT für 1 min.
- Zentrifugation bei 13.000 U/min. für 1 min.

- Eluierte DNS kann direkt in die Sequenzierungsreaktion eingesetzt werden oder bei – 25 °C aufbewahrt werden

Für die Sequenzierung wurden 5 µl der extrahierten DNS in ein Reaktionsgefäß überführt und der entsprechend für diese PCR spezifische forward bzw. reverse Primer in einer Menge von 2 µl dazu pipettiert. Das Endvolumen für die Sequenzierung betrug 7 µl.

3.3.3.6.2 Datenauswertung

Die Auswertung der in einem externen Labor (Seqlab-Sequence Laboratories Göttingen GmbH) generierten Sequenzen wurde mithilfe des Programms Finch TV Version 1.4.0 (Geospiza Inc.) bei jeder Probe überprüft und gegebenenfalls korrigiert. Hierbei wurden unsichere Signale – vor allem im Anfangsbereich der Sequenz – korrigiert oder Peaks, die eine sehr ungewöhnliche Form aufwiesen, wie z. B. sehr flache und breite Peaks, als Artefakte behandelt und in der Auswertung nicht berücksichtigt. Die Auswertung jeder einzelnen Probe erfolgte ohne Berücksichtigung der anderen schon bekannten Sequenzen, um eine Beeinflussung der Interpretation der Daten zu verhindern.

Die so bearbeiteten Sequenzen wurden mit dem Programm *EditSeq* von *DNASStar*, Inc. für das Alignment bearbeitet. Mithilfe des Programms *MegAlign* von *DNASStar*, Inc. wurden die bearbeiteten Sequenzen auf Unterschiede in ihrer Basen- sowie Aminosäurenabfolge untersucht. Dieses Programm stellt homologe Sequenzen untereinander dar und ermöglicht dadurch einen Vergleich der Basenabfolge. Mithilfe dieses sog. Alignments können Unterschiede innerhalb des untersuchten Sequenzabschnittes erkannt und somit die einzelnen Isolate entweder einem gemeinsamen oder einem anderen Subtyp zugeordnet werden.

3.3.3.7 Nachweis des Verotoxin-Gens *vtx 2e*

Der qualitative Nachweis des Verotoxin-Gens *vtx 2e* bei *E. coli* erfolgte mit dem nach RÜSSMANN ET AL. (1995) beschriebenen Verfahren. Die Länge des Amplifikats beträgt 280 bp. Nach Aufbereitung der DNS einer Einzelkolonie (s. Kap. 3.3.3.1) wurde mit Ausnahme der Primer der Mastermix nach demselben Pipettierprotokoll, wie in Kap. 3.3.3.2 dargestellt, hergestellt.

Die Amplifikation der Ziel-DNS erfolgte nach folgendem Cycler-Temperaturprofil:

Initiale Denaturierung	94 °C für 5 min.	
Denaturierung	94 °C für 30 s	} 30 Zyklen
Annealing	54 °C für 40 s	
Extension	72 °C für 35 s	
Finale Extension	72 °C für 5 min.	
Abkühlung auf 4 °C.		

Die Amplifikate wurden wie in Kap. 3.3.3.2.1 beschrieben mithilfe der Agarose-Gelelektrophorese und einer sich anschließenden Ethidiumbromidfärbung dargestellt.

3.3.3.8 Nachweis des *E. coli* attaching and effacing-Gen

Der Nachweis des *E. coli* attaching and effacing (*eae*)-Gens erfolgte mit Hilfe des Primersystems SK1 / SK2 nach SCHMIDT ET AL. (1994). Das erhaltene Fragment hat eine Länge von 863 bp. Ein positiver Nachweis des Gens bestätigt somit das Vorliegen dieses Virulenzfaktors. Nach Aufbereitung der DNS einer Einzelkolonie (s. Kap. 3.3.3.1) wurde der Mastermix unter Auslassung der Proben-DNS für einen Einzelansatz nach folgenden Pipettierprotokoll angesetzt:

Reagenzien und deren Konzentrationen	Pipettiermenge pro Einzelansatz (µl)
Aqua bidest.	17,1
10 x Polymerase-Puffer (15 mM MgCl ₂), Fa. Applied Biosystems	2,5
dNTP-Mix (each 10mM)	0,5
Primer SK1 / SK 2 (10µM) Fa. Eurofins MWG Operon	je 1,0
Polymerase AmpliTaq Gold™ (5U/µl), Fa. Applied Biosystems	0,4
DNS	2,5
Inhalt pro Reaktionsgefäß	25,0

Die Amplifikation der Ziel-DNS erfolgte nach folgendem Cycler-Temperaturprofil:

Initiale Denaturierung	94 °C für 7 min	
Denaturierung	95 °C für 30 s	} 30 Zyklen
Annealing	52 °C für 60 s	
Extension	72 °C für 40 s	
Finale Extension	72 °C für 5 min.	
Abkühlung auf 4 °C.		

Die Amplifikate wurden wie in Kap. 3.3.3.2.1 beschrieben mithilfe der Agarose-Gelelektrophorese und einer sich anschließenden Ethidiumbromidfärbung dargestellt.

3.3.4 Archivierung der VTEC-Isolate

Zur Archivierung der gewonnenen VTEC-Isolate wurde eine Kolonie der entsprechenden Kultur auf PC-Platte in BHI eingegeben. Diese wurde 16-18 h bebrütet und anschließend 1 ml dieser Übernachtskultur zu 210 µl Glycrol dazugegeben. Daraufhin wurde das ganze gut durchmischt und bei + 4 °C für etwa 2-3 h gelagert. Im Anschluß wurde die so hergestellte sog. Glycerol-Kultur bei – 20 °C eingefroren.

3.3.5 Serotypisierung der VTEC-Isolate

Zur Bestimmung des Serovars wurden die VTEC-Isolate an das nationale Referenzlabor für *Escherichia coli* am Bundesinstitut für Risikobewertung (n = 10) in Berlin (PD Dr. L. Beutin) sowie an das Referenzzentrum für *E. coli* (n = 86) in Lugo/Spanien (Prof. Dr. J. Blanco) versandt. Zusätzlich erfolgten in beiden Referenzzentren erneut eine Subtypisierung der VTEC-Isolate sowie die Bestimmung des Enterohämolysin-Gens.

3.3.6 Statistik

Die Daten wurden mit dem Programmpaket SAS Version 9 ausgewertet. Die Übereinstimmungen der Untersuchungsergebnisse für die beiden immunologischen Testsysteme wurden mit dem KAPPA-Koeffizienten mittels der SAS-Prozedur FREQ analysiert. Die Einflussfaktoren der fixen Effekte „Jahr der Untersuchung“, „Geschlecht der Tiere“, „Alter der Tiere“, „Regierungsbezirk und Anzahl Tiere pro Hektar landwirtschaftliche Nutzfläche (eingeteilt in 2 Klassen < 0,7 und > 0,7)“ sowie das „Vorkommen von VTEC in Beziehung zu der Wald- bzw. landwirtschaftlich genutzten Fläche“ wurden einzeln mittels Chi-Quadrat-Test überprüft. Des Weiteren wurde eine Varianzanalyse mit der SAS-Prozedur GLIMMIX mit der Abhängigen Variablen Untersuchungsergebnis (positiv = 1 und

negativ = 0) und den oben genannten fixen Einflussfaktoren im Modell durchgeführt. In dieser Analyse wird eine Binomialverteilung der abhängigen Variablen angenommen.

4. Ergebnisse

4.1 Mikrobiologischer und molekularbiologischer Nachweis von VTEC bei Rehen

Alle aus den Kotproben der Rehe isolierten präsumtiven VTEC-Stämme wurden in den eigenen Untersuchungen bzw. im Rahmen der Serotypisierung in den Referenzzentren molekularbiologisch auf das Vorhandensein von Verotoxin-, *eae*- und Enterohämolysin-Genen untersucht. Zusätzlich zu den molekularbiologischen Untersuchungen wurden die Isolate auf ihre biochemischen Eigenschaften untersucht, die spezifisch für VTEC sind.

Eine Kotprobe eines Rehs wurde als positiv in die statistische Auswertung mit einbezogen, wenn entweder mindestens eines der Verotoxingene nachgewiesen oder aber alleinig das molekularbiologische Screening mithilfe des Primersystems MK 1/MK 2 positiv war und sie über das api 20E Testsystem als *E. coli* identifiziert werden konnten.

4.1.1 Prävalenzen

4.1.1.1 Prävalenzdaten auf Ebene des Bundeslandes Hessen

Insgesamt konnten 68 Kotproben von 353 Rehen sowohl mikrobiologisch als auch immunologisch und molekularbiologisch als positiv für VTEC ermittelt werden. Das entspricht einer Prävalenz von 19,26 %, bezogen auf die Gesamtheit aller Tiere. Bei einer der 68 positiven Kotproben war trotz eines jeweils positiven immunologischen und molekularbiologischen Screenings mit anschließender erfolgreicher Isolierung des VTEC-Stammes keine weitergehende Differenzierung in einen Verotoxin-Subtyp möglich – es wurde auch kein anderes der untersuchten Virulenzgene nachgewiesen, das Isolat jedoch als *E. coli* identifiziert.

4.1.1.2 Prävalenzdaten auf Ebene der Regierungsbezirke Darmstadt, Gießen und Kassel

Von den insgesamt 68 positiven Rehen wurden 11 Tiere im Regierungsbezirk Darmstadt nachgewiesen, was einer Prävalenz der untersuchten Rehe in Südhessen von 21,15 % entspricht (s. Tabelle 19). In den Regierungsbezirken Gießen und Kassel konnte von 103 untersuchten Rehen 28 (27,18 %) bzw. von 198 untersuchten Tieren 29 (14,65 %) positive Kotproben identifiziert werden (s. Tabelle 19). In der statistischen Auswertung ergab sich für die Prävalenzen der jeweiligen Regierungsbezirke ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$ Chi-Quadrat-Test).

Tabelle 19: Prävalenzdaten in den hessischen Regierungsbezirken.

Regierungsbezirk	Anzahl untersuchter Proben	VTEC-positive Proben	Prävalenz (%)
Darmstadt	52	11	21,15
Gießen	103	28	27,18
Kassel	198	29	14,65
GESAMT	353	68	19,26

Abbildung 6 gibt eine Übersicht über die Lage der einzelnen Forstämter der Beprobungsorte hinsichtlich ihrer Zugehörigkeit zu dem jeweiligen Regierungsbezirk. Zusätzlich dargestellt sind die Prävalenzen der Regionen Nord-, Mittel- und Südhessen, so dass ein direkter Zusammenhang zu den jeweiligen Forstämtern und den vorliegenden Prävalenzen zu erkennen ist.



Abbildung 6: Geographische Übersicht über die Prävalenzen in den Regierungsbezirken in Bezug zu der geographischen Verteilung der beprobten hessischen Forstämter (Quelle: <http://www.hessen-forst.de/forstaemter/kontaktkarte.htm>). Die grün hinterlegten Flächen stellen die Forstämter dar, bei denen auf den Jagden Proben entnommen wurden.

4.1.1.3 Prävalenzdaten auf Ebene der Landkreise

Auf Ebene der Landkreise ergab sich ebenfalls ein signifikanter Unterschied in den jeweiligen Prävalenzen ($p < 0,05$ Chi-Quadrat-Test). So konnte in den Landkreisen Fulda/Main-Kinzig-Kreis kein einziges Reh identifiziert werden, welches VTEC mit seinem Kot ausscheidet. Im Landkreis Gießen hingegen wurde eine Prävalenz von 41,38 % gefunden, was einem Nachweis von 12 positiven Kotproben in diesem Kreis entspricht. Im Wetteraukreis waren 24,14 % der Rehe positiv, gefolgt von dem Kreis Marburg-Biedenkopf mit 21,95 %, dem Schwalm-Eder-Kreis mit 21,74 %, dem Lahn-Dill-Kreis/Limburg-Weilburg mit einer Prävalenz von 21,21 %, dem Kreis Groß-Gerau mit 17,39 % sowie dem Kreis Waldeck-Frankenberg mit 11,63 % und dem Kreis Kassel/Werra-Meißner-Kreis mit 10,53 %. Eine Auflistung der Prävalenzen für die jeweiligen Landkreise befindet sich in Tabelle 20.

Tabelle 20: Prävalenzdaten in den Landkreisen.

Landkreise	Anzahl Tiere	VTEC-positive Tiere	Prävalenz (%)
Fulda/Main-Kinzig-Kreis	25	0	0,00
Gießen	29	12	41,38
Groß-Gerau	23	4	17,39
Kassel/Werra-Meißner-Kreis	38	4	10,53
Lahn-Dill-Kreis/ Limburg-Weilburg	33	7	21,21
Marburg-Biedenkopf	41	9	21,95
Schwalm-Eder-Kreis	92	20	21,74
Waldeck-Frankenberg	43	5	11,63
Wetteraukreis	29	7	24,14
GESAMT	353	68	19,26

Abbildung 7 gibt eine Übersicht über die geographische Verteilung der Prävalenzen in den einzelnen beteiligten Landkreisen. Zur besseren Übersicht, welcher Landkreis zu welchem Regierungsbezirk gehört, sind in Abbildung 7 zusätzlich die Regierungsbezirksgrenzen Kassel, Gießen und Darmstadt zu erkennen.



Abbildung 7: Geographische Übersicht über die Prävalenzen in den beteiligten Landkreisen.

4.1.2 Vorkommen von VTEC in Abhängigkeit von der Altersstufe und des Geschlechts

Die untersuchten Rehe wurden in die drei Altersstufen adult, subadult und juvenil bei der Probenentnahme eingeteilt. Vier der untersuchten weiblichen Rehe konnte kein eindeutiges Alter zugewiesen werden, so dass in diese Auswertung nur 349 Rehe mit einbezogen wurden. Unter diesen vier Rehen war auch ein Tier, welches als Ausscheider für VTEC identifiziert werden konnte. Aufgrund des nicht definierten Alters wurde dieses Tier bei der Auswertung jedoch nicht berücksichtigt.

Bei der Ausscheidung von VTEC mit dem Kot gibt es zwischen den einzelnen Altersstufen hochsignifikante Unterschiede ($p < 0,001$ Chi-Quadrat-Test). 29,84 % der juvenilen Rehe haben mit ihrem Kot VTEC ausgeschieden, gefolgt von den subadulten mit 14,75 % und den adulten Rehen, bei denen bei 12,80 % der adulten Tiere VTEC nachgewiesen werden konnte (s. Abbildung 8).

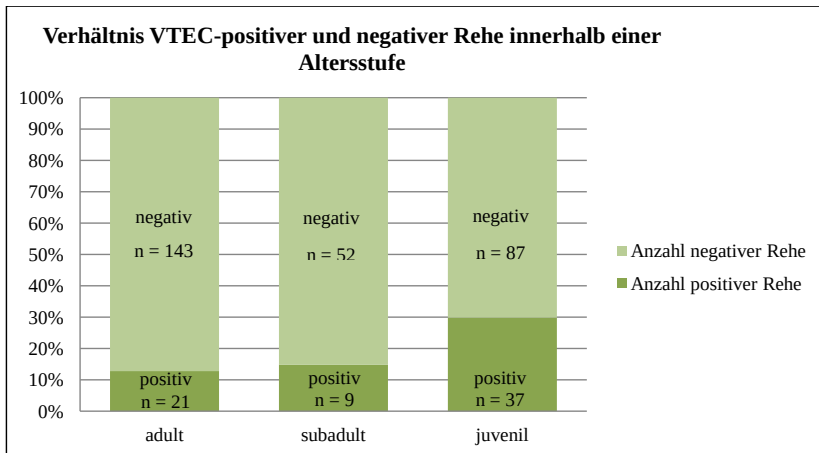


Abbildung 8: Übersicht über das Verhältnis VTEC-positiver und negativer Rehe innerhalb einer Altersstufe.

Von den insgesamt 353 untersuchten Rehen waren 70 Tiere männlich und 283 Tiere weiblich. Unter den männlichen Rehen waren von 70 Tieren 18 Tiere (25,71 %) positiv in der Ausscheidung von VTEC. Bei den weiblichen Rehen hingegen konnte bei 17,67 % der Tiere VTEC nachgewiesen werden (s. Tabelle 21). Hinsichtlich des Nachweises von VTEC gab es zwischen den Geschlechtern jedoch keinen signifikanten Unterschied.

Tabelle 21: Anzahl VTEC-positiver und negativer Tiere bei den beiden Geschlechtern.

Geschlecht	Anzahl	VTEC-positive Tiere (%)	VTEC-negative Tiere (%)
weiblich	283	50 (17,67)	233 (82,33)
männlich	70	18 (25,71)	52 (74,29)
GESAMT	353	68 (19,26)	285 (80,74)

In Tabelle 22 findet sich eine Übersicht über die Verteilung VTEC-positiver und –negativer Rehe hinsichtlich des Alters und des Geschlechts. Von den 49 positiven weiblichen Rehen, von denen das Alter bekannt war, waren 21 Tiere juvenil, 8 subadult und 20 Tiere adult. Bei den männlichen Rehen hingegen wurden 16 juvenile Tiere, bei den beiden anderen Altersstufen wurde jeweils ein Tier als Ausscheider von VTEC detektiert.

Tabelle 22: Anzahl positiver und negativer Tiere hinsichtlich Geschlecht und Alter.

Geschlecht	Anzahl	VTEC-positive Rehe ¹⁾				VTEC-negative Rehe ¹⁾			
		juv.	sub.	a.	GESAMT (%)	juv.	sub.	a.	GESAMT (%)
weiblich	279	21	8	20	49 (17,56)	53	44	133	230 (82,44)
männlich	70	16	1	1	18 (25,71)	34	8	10	52 (74,29)
keine Angabe	4	--	--	--	1 (25,00)	--	--	--	3 (75,00)
GESAMT	353	37	9	21	68 (19,26)	87	52	143	285 (80,74)

¹⁾ juv. = juvenil; sub. = subadult; a. = adult

4.1.3 Vorkommen von VTEC in Abhängigkeit des Probennahmejahres

Um eine Abhängigkeit der Ausscheidung von VTEC hinsichtlich des Probennahmejahres beurteilen zu können, wurden die Daten der Jahre 2008 und 2009 statistisch mittels Chi-Quadrat-Test miteinander verglichen. Die 10 Rehe aus dem Jahr 2010 wurden aufgrund zu geringer Datenlage zu den Rehen des Jahres 2009 gezählt.

Im Jahr 2008 wurden insgesamt 209 Rehe beprobt. Unter diesen Tieren waren 49 Rehe, die VTEC mit ihrem Kot ausschieden, was einer Prävalenz von 23,44 % für dieses Jahr entspricht (s. Tabelle 23). Im Jahr 2009 hingegen waren von den 144 untersuchten Rehen lediglich 19 Tiere (13,19 %) positiv für VTEC (s. Tabelle 23).

Tabelle 23: Vorkommen von VTEC in Abhängigkeit des Probennahmejahres.

Jahr	Anzahl Tiere	VTEC-positive Tiere (%)	VTEC-negative Tiere (%)
2008	209	49 (23,44)	160 (76,56)
2009/2010	144	19 (13,19)	125 (86,81)
GESAMT	353	68 (19,26)	285 (80,74)

Die statistische Auswertung ergab, dass es einen signifikanten Unterschied zwischen den Jahren 2008 und 2009 in der Ausscheidung von VTEC bei den Rehen gibt ($p < 0,05$ Chi-Quadrat-Test).

4.1.4 Vorkommen von VTEC in Abhängigkeit von der Jahreszeit

Um eine Abhängigkeit von dem Zeitpunkt der Probenahme für das Vorkommen von VTEC beurteilen zu können, wurden die Proben hinsichtlich des Zeitpunktes einmal in 5 Klassen sowie in die 2 Klassen Winter und Sommer eingeteilt (s. Kap. 3.1.4). In Tabelle 24 findet sich für die Einteilungen der Klassen 1, 5, 10, 11 und 12 eine Übersicht über die saisonale Verteilung VTEC-positiver und – negativer Proben.

Tabelle 24: Übersicht über die saisonale Verteilung VTEC-positiver und -negativer Proben für die Klassen 1, 5, 10, 11 und 12.

Saison	VTEC-positive Proben (%)	VTEC-negative Proben (%)	GESAMT
Klasse 1	4 (12,90)	27 (87,10)	31
Klasse 5	4 (16,00)	21 (84,00)	25
Klasse 10	7 (21,88)	25 (78,13)	32
Klasse 11	39 (24,84)	118 (75,16)	157
Klasse 12	14 (12,96)	94 (87,04)	108
GESAMT (Σ)	68	285	353

In Abbildung 9 ist die Verteilung VTEC-positiver und –negativer Proben für die Klassen Sommer und Winter dargestellt.

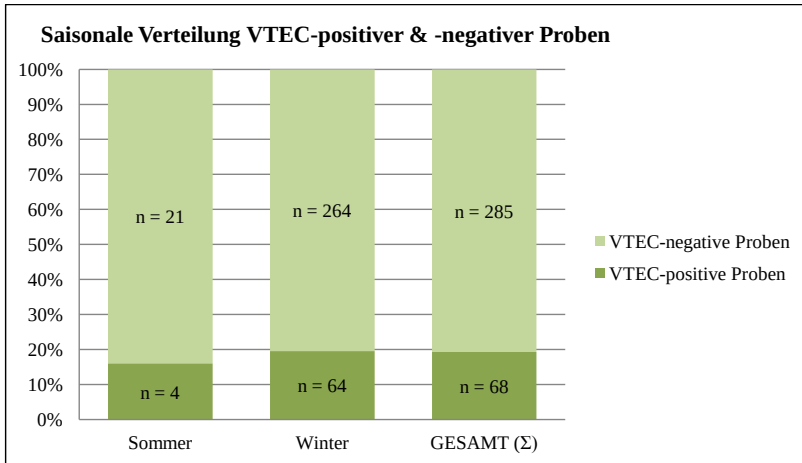


Abbildung 9: Saisonale Verteilung VTEC-positiver und -negativer Proben für die Klasseneinteilung Sommer und Winter.

Es konnte für keine der beiden Einteilungen ein signifikanter Einfluss im Hinblick auf den Zeitpunkt der Probennahme gefunden werden ($p > 0,05$ Fisher's Exakt-Test).

4.1.5 Vorkommen von VTEC in Abhängigkeit von der Wald- bzw. landwirtschaftlich genutzten Fläche

Zur Untersuchung der Abhängigkeit von der Wald- bzw. landwirtschaftlich genutzten Fläche für das Vorkommen von VTEC in den untersuchten Regionen wurden die entsprechenden Flächenangaben der einzelnen Landkreise und die Ergebnisse der Untersuchung zueinander in Beziehung gesetzt. Die statistische Analyse ergab keinen signifikanten Einfluss für das Vorkommen von VTEC in Abhängigkeit von der Wald- bzw. landwirtschaftlich genutzten Fläche.

4.1.6 Vorkommen von VTEC in Abhängigkeit von der Anzahl Tiere pro Hektar landwirtschaftliche Nutzfläche

Zur Untersuchung der Abhängigkeit der Anzahl Tiere pro Hektar landwirtschaftliche Nutzfläche für das Vorkommen von VTEC in den untersuchten Regionen in Hessen wurden diese in zwei Klassen eingeteilt ($< 0,7$ und $> 0,7$, s. auch Tabelle 25). Die statistische Analyse ergab keinen signifikanten Einfluss für das Vorkommen von VTEC in Abhängigkeit der Anzahl Tiere pro Hektar landwirtschaftliche Nutzfläche.

Tabelle 25: Verhältnis der Anzahl an Rindern, Schafen und Ziegen pro Hektar landwirtschaftliche Nutzfläche für das Vorkommen von VTEC bei Rehwild.

Verhältnis Gesamt-Tierzahl zur landwirtschaftlichen Fläche (Tiere/ha)	VTEC-positive Proben (%)	VTEC-negative Proben (%)	GESAMT
< 0,7	47 (22,27)	164 (77,73)	211
> 0,7	21 (14,79)	121 (85,21)	142
GESAMT (Σ)	68	285	353

4.1.7 Ergebnisse der Varianzanalyse

Mittels der univariaten Varianzanalyse wurde der Einfluss der fixen Faktoren Alter, Regierungsbezirk, Probennahmejahr, Geschlecht sowie Tieranzahl pro landwirtschaftliche Fläche – eingeteilt in die Klassen > 0,7 und < 0,7 – auf die Prävalenzen für das Vorkommen von VTEC untersucht.

Die Ergebnisse der univariaten Varianzanalyse zeigen, dass sich das Alter, die Regierungsbezirke sowie die Tieranzahl pro landwirtschaftliche Fläche auf die Prävalenzen auswirken (s. Tabelle 26). Im Gegensatz zur Analyse der einzelnen Faktoren hat jedoch das Probennahmejahr keinen Einfluss auf die Prävalenzen.

In Tabelle 26 findet sich eine Übersicht über die Ergebnisse der Varianzanalyse. Zusätzlich sind die geschätzten Prävalenzen der Varianzanalyse sowie die Signifikanzniveaus des Chi-Quadrat Tests mit aufgeführt.

Tabelle 26: Ergebnisse der Varianzanalyse. Zusätzlich aufgeführt sind die Signifikanzen des Chi-Quadrat-Tests.

				Signifikanz	
Regierungsbezirk	Darmstadt	Gießen	Kassel	Varianz-analyse	Chi ² -Test
geschätzte Prävalenz (%)	11,90	26,07	10,46	**	*
Alter	adult	subadult	juvenil		
geschätzte Prävalenz (%)	10,85	11,53	26,00	**	***
Probennahmejahr	2008	2009			
geschätzte Prävalenz (%)	18,32	12,28		ns	*
Geschlecht	weiblich	männlich			
geschätzte Prävalenz (%)	15,90	14,25		ns	ns
Tierzahl pro landwirtschaftlicher Fläche	> 0,7	< 0,7			
geschätzte Prävalenz (%)	10,10	21,85		*	ns

* signifikant $p \leq 0,05$; ** hochsignifikant $p \leq 0,01$; *** höchstsignifikant $p \leq 0,001$; ns = nicht signifikant

4.1.8 Untersuchung der VTEC-Isolate

Insgesamt wurden im molekularbiologischen Screening 72 Rehe als präsumtive Ausscheider von VTEC identifiziert – von diesen Tieren lagen 84 Isolate vor. Im Rahmen der weitergehenden Untersuchungen konnten von diesen jedoch nur 68 Tiere bestätigt werden. Von diesen 68 VTEC-positiven Rehen konnten 79 Isolate gewonnen werden. Von 11 Rehen konnten aus dem Kot jeweils zwei verschiedene Isolate mit unterschiedlichen Virulenzprofil und / oder Serovareigenschaften gewonnen werden.

4.1.8.1 Biochemische Eigenschaften

Indol- und β -D-Glucuronidase-negative präsumtive *E. coli*-Stämme der 84 Isolate wie auch Isolate, die zwar im molekularbiologischen Screening positiv waren, jedoch kein Virulenzgen molekularbiologisch nachgewiesen werden konnte, wurden biochemisch über das api 20E Testsystem untersucht. Im Rahmen dieser Untersuchung erwiesen sich fünf der insgesamt 18 untersuchten Isolate als nicht zu der Spezies *E. coli* zugehörig. Bei drei Isolaten handelte es sich um *Hafnia alvei*. Die anderen beiden Isolate gehörten der Spezies *Salmonella* ser. *Gallinarum* an. Aufgrund dieser Untersuchung konnten fünf der Isolate nicht als *E. coli*

bestätigt werden. Vier der nicht bestätigten Isolate wurden jeweils aus dem Kot eines Rehs isoliert, so dass vier Tiere als Ausscheider von VTEC nicht bestätigt werden konnten. Das fünfte nicht bestätigte Isolat wurde aus dem Kot eines Tieres isoliert, aus dem zwei weitere Isolate nachgewiesen werden konnten.

Von den insgesamt 79 VTEC-positiven Isolaten besaßen 75 Isolate die Fähigkeit Sorbit zu fermentieren und erwiesen sich als Indol positiv. Ein Isolat zeigte weder die Fähigkeit Sorbit, noch Tryptophan in Indol zu verstoffwechseln und war β -D-Glucuronidase negativ. 77 der Isolate wiesen β -D-Glucuronidase Aktivität auf und zeigten unter UV-Licht eine Fluoreszenz, wohingegen zwei Isolaten diese Eigenschaft fehlte (s. Tabelle 27).

Tabelle 27: Phänotypische Eigenschaften der 79 VTEC-Isolate.

Substrat	Substratumsatz	
	positiv	negativ
Sorbit	75	4
Tryptophan	78	1
4-Methylumbelliferyl- β -Glucuronid	77	2

Eine ausführliche Darstellung der aus den einzelnen Kotproben gewonnenen Isolate findet sich im Anhang in Tabelle 42.

4.1.8.2 Verteilung der Virulenzgene

In Tabelle 28 und Tabelle 29 ist die Verteilung der Verotoxin-Subtypen bei den VTEC-Isolaten der Rehe aufgeführt. Bei der vtx 1-Subtypisierung wurden drei verschiedene Subtypen gefunden. Hierbei konnte das vtx 1c-Gen aus 10 (12,66 %) der 79 gewonnen Isolate detektiert werden und war der häufigste VT 1-Subtyp. Der Subtyp VT 1d wurde neunmal (11,39 %) und der Subtyp VT 1a viermal (5,06 %) nachgewiesen (s. Tabelle 28). Bei einem Isolat wurde bei den eigenen Untersuchungen das vtx 1 detektiert, jedoch konnte nach Subkultivierung für die Untersuchung im Rahmen der Sero- und Subtypisierung in den Referenzzentren das vtx 1-Gen nicht mehr nachgewiesen und somit subtypisiert werden.

Das Virulenzgen *eae* kam nur bei einem Isolat (1,27 %) vor. Bei diesem Isolat handelte es sich um das Isolat, welches durch die Subkultivierung das vtx 1-Gen verloren hatte. Das Virulenzgen Enterohämölysin wurde bei 27 Isolaten (34,18 %) nachgewiesen (s. Tabelle 28).

Tabelle 28: Häufigkeit der VT 1-Subtypen sowie des *eae*- und Enterohämolysin-Genes bei VTEC-ausscheidenden Rehen.

Virulenzgene	vtx 1 (Σ)				<i>eae</i> -Gen (Σ)	Enterohämolysin-Gen (Σ)
	vtx 1*	vtx 1a	vtx 1c	vtx 1d		
<i>E. coli</i> Isolate (Σ)	1	4	10	9	1	27

* Dieses Isolat hat durch die Subkultivierung zur Archivierung und Versendung der Proben an das Referenzzentrum das vtx 1-Gen verloren, welches in den eigenen Untersuchungen jedoch nachgewiesen werden konnte.

Bei der VT 2-Subtypisierung konnte 30mal (37,97 %) der Subtyp VT 2b-, 24mal (30,38 %) der Subtyp VT 2g- und 5mal (6,33 %) der Subtyp VT 2d nachgewiesen werden (s. Tabelle 29). Bei den Isolaten, bei denen das vtx 2d-Gen detektiert wurde, handelt es sich um Isolate, bei denen nach Subkultivierung für die Untersuchung im Rahmen der Sero- und Subtypisierung in den Referenzzentren das vtx 2d-Gen nicht mehr nachgewiesen und somit nicht erneut von den Referenzzentren subtypisiert werden konnten (s. Tabelle 29). Das vtx 2c-, vtx 2 klassisch-, vtx 2_{aktivatable}- und das vtx 2e-Gen wurden nicht nachgewiesen.

Tabelle 29: Häufigkeit der vtx 2-Virulenzgene bei VTEC-ausscheidenden Rehen.

Virulenzgene	vtx 2 (Σ)						
	vtx 2b	vtx 2 kl.*	vtx 2c	vtx 2d**	vtx 2d _{aktivatable}	vtx 2e	vtx 2g
<i>E. coli</i> Isolate (Σ)	30	0	0	5	0	0	24

* vtx 2 kl. = vtx 2 klassisch

** Alle 5 Isolate hatten durch die Subkultivierung zur Archivierung und Versendung der Proben an das Referenzzentrum das vtx 2d-Gen verloren, welches in den eigenen Untersuchungen jedoch nachgewiesen werden konnte.

Hinsichtlich der Genkombinationen war das vtx 2b-Gen bei den 79 Isolaten mit 21 mal (26,58 %) am häufigsten vertreten, gefolgt von dem vtx 2g-Gen mit 15 mal (18,99 %) und der Kombination vtx 2g + Enterohämolysin-Gen (11,39 %) und dem vtx 1d (11,39 %). Insgesamt wurden 12 verschiedene Genkombinationen bei den 79 Isolaten gefunden (s. Tabelle 30).

In Tabelle 30 ebenfalls dargestellt ist die Verteilung der Genkombinationen hinsichtlich des Geschlechts und des Alters. Das am häufigsten vorkommende vtx 2b-Gen sowie die Kombination vtx 2b + Enterohämolysin-Gen sind dabei bei allen Altersstufen und beiden Geschlechtern zu finden, wobei die weiblichen Tiere mit 65,5 % den größten Anteil ausmachen. Anders sieht es für das vtx 2g-Gen sowie die Kombination vtx 2g +

Enterhämolysin-Gen aus. Diese Genkombinationen konnten vor allen bei den juvenilen weiblichen sowie männlichen Rehen nachgewiesen werden (62,5 %). Das ebenfalls relativ häufig vorkommende vtx 1d konnte nur bei weiblichen Tieren gefunden werden, wobei die juvenilen weiblichen Rehe mit 77,8 % den größten Anteil ausmachten. Die Genkombination vtx 1a + vtx 1c + Enterohämolysin-Gen wurde nur bei adulten weiblichen Rehen nachgewiesen. Zur Untersuchung einer Abhängigkeit für das Vorkommen bestimmter Virulenzgene hinsichtlich eines Geschlechts oder eines Alters wurden diese Faktoren entsprechend einzeln zueinander in Beziehung gesetzt. In der statistischen Auswertung konnte lediglich für die Subtypen VT 1a und VT 1c eine Abhängigkeit hinsichtlich des Alters festgestellt werden. So kommen beide Verotoxine signifikant häufiger bei adulten Tieren vor ($p < 0,05$ Fisher's Exakt Test). Für die anderen Virulenzgene konnte weder hinsichtlich des Alters noch des Geschlechts eine Abhängigkeit nachgewiesen werden.

Tabelle 30: Genkombinationen bei den 79 VTEC-Isolaten. Zusätzlich dargestellt ist die Verteilung der Genkombinationen hinsichtlich des Geschlechts und des Alters.

Genkombination ¹⁾	Anzahl Isolate	Anzahl Isolate für das Geschlecht und Alter ²⁾					
		juvenil		subadult		adult	
		w	m	w	m	w	m
<i>vtx</i> 2b ³⁾	21	5	5	1	1	7	1
<i>vtx</i> 2b + <i>e-hly</i>	8	2	2	2	0	2	0
<i>vtx</i> 2d ⁴⁾	3	1	0	0	0	2	0
<i>vtx</i> 2d + <i>e-hly</i> ⁴⁾	2	1	0	1	0	0	0
<i>vtx</i> 2g	15	5	4	3	0	3	0
<i>vtx</i> 2g + <i>e-hly</i>	9	3	3	2	0	1	0
<i>vtx</i> 1 + <i>eae</i> + <i>e-hly</i>	1	0	0	0	0	1	0
<i>vtx</i> 1a + <i>vtx</i> 1c + <i>e-hly</i>	4	0	0	0	0	4	0
<i>vtx</i> 1c	1	0	1	0	0	0	0
<i>vtx</i> 1c + <i>e-hly</i>	4	1	0	0	0	3	0
<i>vtx</i> 1d	9	7	0	1	0	1	0
<i>vtx</i> 1c + <i>vtx</i> 2b	1	0	0	0	0	1	0
MK1/MK2 positiv ⁵⁾	1	0	0	1	0	0	0
GESAMT	79	25	15	11	1	25	1

¹⁾*e-hly* = Enterohämolsin-Gen

²⁾ **Gelb unterlegte Werte:** Diese Werte zeigen die Anzahl der Isolate für die jeweilige Genkombination für das Alter und das Geschlecht an.

³⁾ Bei diesem Virulenzgen war bei einem Reh (Re 205) das Alter nicht bekannt, so dass dies bei der Anzahl der Isolate für das Geschlecht und Alter nicht mitaufgeführt wird.

⁴⁾ Diese Isolate hatten durch die Subkultivierung zur Archivierung und Versendung der Proben an das Referenzzentrum das *vtx* 2d-Gen verloren, welches in den eigenen Untersuchungen jedoch nachgewiesen werden konnte - sie konnten nicht erneut durch die Referenzzentren typisiert werden.

⁵⁾ Dieses Isolat war im molekularbiologischen Screening positiv auf VTEC, jedoch konnte weder in den eigenen molekularbiologischen Untersuchungen noch im Rahmen der Serotypisierung ein Virulenzgen für VTEC identifiziert werden.

Bei sieben Tieren konnten sogar VTEC-Stämme mit unterschiedlichen Genkombinationen detektiert werden. Jeweils zwei Isolate von zwei Rehen besitzen entweder das *vtx* 2b-Gen oder die Kombination *vtx* 1a + *vtx* 1c + Enterohämolsin-Gen. Bei einem weiteren Reh konnte ein Isolat mit *vtx* 2b sowie ein Isolat mit *vtx* 2g nachgewiesen werden. Des Weiteren wurden bei einem Reh zwei Isolate gefunden, welche einmal die Gene *eae*, *e-hly* und *vtx* 1 bzw. *vtx* 1c und *e-hly* trugen. Bei zwei weiteren Rehen wurden sowohl die Genkombinationen *vtx* 2g und *vtx* 2g + *e-hly* sowie *vtx* 2b und *vtx* 2b + *e-hly* detektiert. Zusätzlich wurden bei einem weiteren Reh zwei unterschiedliche Isolate nachgewiesen, wobei bei dem einen Isolat *vtx* 2b und bei dem anderen Isolat *vtx* 2d und das *e-hly* detektiert wurden.

Im Rahmen der eigenen molekularbiologischen Untersuchungen wurden hinsichtlich der Verotoxin-Gene andere Ergebnisse erhalten als in der sich anschließenden Typisierung durch die beiden Referenzzentren. Alle in den eigenen Untersuchungen als *vtx* 2d typisierten Stämme erwiesen sich nach der Typisierung der Referenzzentren stattdessen als *vtx* 2b positiv. Ebenso wurde bei allen Isolaten, die in den eigenen Untersuchungen als *vtx* 2 klassisch positiv identifiziert werden konnten, durch die Referenzzentren das *vtx* 2g-Gen nachgewiesen.

Zur Identifizierung der Ursache der unterschiedlichen Ergebnisse wurden die Sequenzen, die als Grundlage für das Primerdesign der Primer VTAM I/VTAM II sowie GK3/GK4 des jeweiligen Verotoxin-Subtypens VT 2d und VT 2 klassisch dienten sowie die entsprechenden Sequenzen der von den Referenzzentren stattdessen identifizierten Subtypen VT 2b und VT 2g in einem Alignment dargestellt (s. Anhang Abbildung 18 und Abbildung 19) und auf Basenunterschiede untersucht. Zusätzlich im Alignment dargestellt sind die im Rahmen der Untersuchung verwendeten Primer sowie Primer für den jeweilige Verotoxin-Subtypen aus SCHEUTZ ET AL. (2012) bzw. BEUTIN ET AL. (2007). Im Folgenden wird auf die Ursache der Unterschiede in den Ergebnissen näher eingegangen.

Alignment – *vtx* 2d / *vtx* 2bTypisierung

Zur Analyse der Sequenzunterschiede zwischen den Verotoxin-Subtypen VT 2b und VT 2d wurden die im Anhang in der Abbildung 18 dargestellten Sequenzen verwendet. Als erstes dargestellt ist die Sequenz (Acc. No. L11078), die in ABDULMAWJOOD UND BÜLTE (2000) als Grundlage für das Design der sog. *vtx* 2d Primer (VTAM-I und VTAM-II) verwendet wurde. Da diese Primer im Rahmen der Untersuchung zur Detektion des Subtypen VT 2d eingesetzt wurden, dient diese Sequenz, welche als Grundlage für das Primerdesign verwendet wurde, in der gesamten Abbildung 18 als Vergleich zu den anderen Sequenzen und ist komplett in seiner Basenabfolge für den relevanten Sequenzabschnitt dargestellt. Die darauffolgenden drei Sequenzen der Stämme EH250 (Acc. No. AF043627), 5293/98 (Acc. No. AJ567997) und 24196/97 (Acc. No. AJ567995) sind *E. coli* Stämme, die das Gen für *vtx* 2b laut SCHEUTZ ET AL. (2012) tragen. Die Stämme 5293/98 und 24196/97 wurden ursprünglich in ZHANG ET AL. (2005) als *vtx* 2d positive Stämme deklariert, stellten sich in der Studie von SCHEUTZ ET AL. (2012) jedoch als *vtx* 2b positiv dar. Nachfolgend in der Abbildung dargestellt ist die aktuelle Sequenz für das *vtx* 2d-Gen des *E. coli* Stammes C466-01B (Acc. No. DQ235775) aus SCHEUTZ ET AL. (2012). Zusätzlich im Alignment aufgeführt sind die in der eigenen Studie verwendeten Primer VTAM I und II sowie das Primersystem *stx* F1 / R1, die in der Arbeit

von SCHEUTZ ET AL. (2012) zur Typisierung des Gens *vtx 2b* verwendet wurden. Um Abweichungen zwischen den verschiedenen Sequenzen leichter erkennen zu können, wurde eine Darstellung gewählt, in der nur Basen aufgeführt sind, die von der Sequenz „*vtx 2d*“ aus ABDULMAWJOOD UND BÜLTE ET AL. (2000) abweichen (grau hinterlegt). Die Punkte stellen Übereinstimmungen mit dieser „*vtx 2d*“ Sequenz dar. Striche hingegen zeigen Lücken auf – hier existiert keine passende Base.

Aus dem Alignment (s. Anhang Abbildung 18) ist ersichtlich, dass die Vergleichssequenz „*vtx 2d*“ sich im dargestellten Bereich mit den Sequenzen der *vtx 2b* positiven Stämme EH250 und 5293/98 in nur einer Base unterscheiden. Die Sequenz des *E. coli* Stammes 24196/97 zeigt im dargestellten Bereich sogar eine komplette Übereinstimmung. Hingegen gibt es im Vergleich zur Sequenz des *vtx 2d* Stammes C466-01B 42 Basenunterschiede. Auch die beiden Primersysteme liegen in einem Abschnitt der *vtx 2d* Sequenz des Stammes C466-01B, in welchem sowohl für den forward als auch für den reverse Primer beider Primersysteme jeweils mehrere Basenunterschiede existieren, so dass die Primersysteme für diese Sequenz bzw. diesen Verotoxin-Subtypen nicht spezifisch sind. Im Gegensatz hierzu können beide Primersysteme spezifisch an die anderen dargestellten Sequenzen des Toxintyps VT 2b sowie der Vergleichssequenz binden und das entsprechende Zieltarget amplifizieren. Hieraus ist ersichtlich, dass die Sequenz, die als Grundlage für den Design der Primer VTAM-I und VTAM-II verwendet wurde, nach dem aktuellen Stand der Wissenschaft dem Toxintyp VT 2b zuzuordnen ist und somit im Rahmen der eigenen Untersuchungen das Ergebnis der Referenzzentren bestätigt werden kann.

Alignment – *vtx 2* klassisch / *vtx 2g* Typisierung

Zur Analyse der Sequenzunterschiede zwischen den Verotoxin-Subtypen VT 2 klassisch und VT 2g wurden die im Anhang in der Abbildung 19 (s. Kap. 10.5) dargestellten Sequenzen verwendet. Als erstes dargestellt ist die Sequenz *vtx 2* (Acc. No. X07865), die in ABDULMAWJOOD UND BÜLTE (2000) für das Design spezifischer *vtx 2* Primer herangezogen wurde. Diese Sequenz, welche nach dem damaligen Forschungsstand der Verotoxin-Variante VT 2 klassisch zugeschrieben wurde, dient in der gesamten Abbildung 19 als Vergleichssequenz und ist komplett in seiner Basenabfolge für den relevanten Sequenzabschnitt dargestellt. Darauf folgend dargestellt ist die *vtx 2g* Sequenz (Acc. No. AY286000) aus LEUNG ET AL. (2003). Zusätzlich im Alignment aufgeführt sind die in der Studie verwendeten Primer GK3 / GK4 sowie das Primersystem *stx 2g* 209F / 781R, die in der Arbeit von BEUTIN ET AL. (2007) zur Typisierung des Gens *vtx 2g* verwendet wurden. Um

Abweichungen zwischen den verschiedenen Sequenzen leichter erkennen zu können, wurde ebenfalls eine Darstellung gewählt, in der nur Basen aufgeführt sind, die von der Sequenz „vtx 2“ aus ABDULMAWJOOD UND BÜLTE ET AL. (2000) abweichen (grau hinterlegt). Die Punkte stellen Übereinstimmungen mit dieser „vtx 2“ Sequenz dar. Striche hingegen zeigen Lücken auf – hier existiert keine passende Base.

Das Alignment in Abbildung 19 (s. Anhang Kap. 10.5) zeigt, dass die Vergleichssequenz „vtx 2“ sich im dargestellten Bereich mit der vtx 2g Sequenz in einigen Basen unterscheidet. Ebenso existieren hinsichtlich der vtx 2 Sequenz für das Primersystem stx 2g 209F/781R für den forward Primer 209F zwei mismatches sowie für den reverse Primer 781R vier mismatches. Somit sind diese Primer alleinig für den Subtypen VT 2g spezifisch. Hingegen liegt das im Rahmen der eigenen Untersuchungen verwendete Primersystem GK3/GK4 in einer konservierten Region der beiden Sequenzen, in welchem keine Sequenzunterschiede zwischen vtx 2 und vtx 2g zu finden sind. Aufgründdessen konnte bei den eigenen Untersuchungen mithilfe dieses Primersystems keine eindeutige Differenzierung der Verotoxin-Subtypen stattfinden.

4.1.9 Ergebnisse der vtx 2_{d_{activatable}} PCR

Im Rahmen der eigenen Untersuchungen wurden alle vtx 2 positiven Isolate auf das Vorhandensein des Gens vtx 2_{d_{activatable}} überprüft. Hierfür wurde das Protokoll in Anlehnung an ZHENG ET AL. (2008) verwendet. Es wurden jedoch die Zeiten für die Denaturierung, das Annealing und die Elongation im Zuge der Anpassung der PCR geringfügig verändert. Die entsprechenden Änderungen sind in Tabelle 31 dargestellt.

Tabelle 31: Änderungen der vtx 2_{d_{activatable}} PCR in Anlehnung an ZHENG ET AL. (2008).

	ZHENG ET AL. (2008)	Eigene Untersuchungen	Zyklusanzahl
Initiale Denaturierung	10 min. bei 94 °C	10 min. bei 94 °C	} 30
Denaturierung	für 60 s bei 94 °C	für 30 s bei 94 °C	
Annealing	für 60 s bei 54 °C	für 45 s bei 54 °C	
Elongation	für 60 s bei 72 °C	für 45 s bei 72 °C	
Finale Elongation	10 min. bei 72 °C	10 min. bei 72 °C	

Bei der Auswertung der Ergebnisse erwiesen sich alle Isolate, bei denen in den eigenen Untersuchungen das Gen für die Verotoxin-Subtypen VT 2 klassisch bzw. in den Referenzzentren das VT 2g nachgewiesen werden konnte, als positiv für das vtx 2_{d_{activatable}} – Gen. Aufgrund dieses Ergebnisses wurden zusätzlich acht typisierte Kontrollstämme

(s. Tabelle 14) der institutseigenen Stammsammlung, die ebenfalls laut Typisierung *vtx 2* klassisch positiv sein sollten, auf das Vorhandensein des *vtx 2d_{activatable}*-Gens überprüft. Bis auf einen Stamm, bei welchem ein Verlust des *vtx 2* klassisch-Gens vorlag, waren alle anderen sieben Stämme positiv auf das *vtx 2d_{activatable}*-Gen. Zusätzlich wurden alle eingesetzten Kontrollstämme, auch der *vtx 2d_{activatable}*-Referenzstamm, auf das Vorhandensein von *vtx 2* mithilfe des Primerpaares GK3/GK4 überprüft. Auch hier erwiesen sich alle Stämme als positiv. Aufgrund dieses Ergebnisses wurden alle *vtx 2g* bzw. *vtx 2* klassisch positiven Isolate zur Sequenzierung gegeben. Zusätzlich wurde ein Alignment der *vtx 2d_{activatable}* - und *vtx 2g* - Gensequenzen sowie der entsprechenden Primersysteme vorgenommen. Hintergrund ist die Analyse der widersprüchlichen molekularbiologischen Ergebnisse.

Zur Analyse der Sequenzunterschiede zwischen den Verotoxin-Subtypen *vtx 2d_{activatable}* und *vtx 2g* wurden die in der Abbildung 10 dargestellten Sequenzen verwendet. Als erstes dargestellt ist die Sequenz *vtx 2d_{activatable}* (Acc. No. AF 479829), die in ZHENG ET AL. (2008) für das Design spezifischer *vtx 2d_{activatable}* Primer herangezogen wurde. Diese Sequenz dient in der gesamten Abbildung 10 als Vergleichssequenz und ist komplett in seiner Basenabfolge für den relevanten Sequenzabschnitt dargestellt. Darauf folgend ist die *vtx 2g* Sequenz (Acc. No. AY286000) aus LEUNG ET AL. (2003) dargestellt. Zusätzlich im Alignment aufgeführt sind die in der Studie verwendeten Primer *stx 2d_{activatable}* und CKS2 sowie das Primersystem *stx 2g* 209F / 781R und *stx 2g*-F1 / *stx 2g*-R1, die in der Arbeit von BEUTIN ET AL. (2007) bzw. SCHEUTZ ET AL. (2012) zur Typisierung des Gens *vtx 2g* verwendet wurden. Um Abweichungen zwischen den verschiedenen Sequenzen leichter erkennen zu können, wurde auch hier eine Darstellung gewählt, in der nur Basen aufgeführt sind, die von der Sequenz *vtx 2d_{activatable}* abweichen (grau hinterlegt). Die Punkte stellen Übereinstimmungen mit der *vtx 2d_{activatable}* Sequenz dar. Striche hingegen zeigen Lücken auf – hier existiert keine passende Base.

Abbildung 10: Sequenzunterschiede (grau hinterlegt) zwischen den Verotoxin-Subtypen VT 2d_{aktivatable} und VT 2g. Zusätzlich dargestellt sind die Primersysteme, welche im Rahmen der eigenen Untersuchungen eingesetzt (grün hinterlegt) sowie in BEUTIN ET AL. (2007) und SCHEUTZ ET AL. (2012) zur Subtypisierung des vtx 2g Toxintyps (rot & gelb hinterlegt) verwendet wurden.

Abbildung 10: Fortsetzung.

		4470	4480	4490	4500	4510	
4464	TATGGGAAAGTAATACAGCAGCAGCGTTTCTGAACAGAAAATCACAGTCT						vtx 2d _{aktivatable} Sequenz
1080	A.....G.....H.....						vtx 2g Sequenz
1							stx 2d _{aktivatable} Primer
1							CKS2 Primer
21							stx 2g Primer 209F
17							stx 2g Primer 781R
29							stx 2g Fl Primer
23							stx 2g Rl Primer
		4520	4530	4540	4550	4560	
4514	TTATATACAACGGGTGAAT-AAAGGAGTTAAGTATGAAGAAGATGTTTAT						vtx 2d _{aktivatable} Sequenz
1130	G.....H.....						vtx 2g Sequenz
3							stx 2d _{aktivatable} Primer
1							CKS2 Primer
21							stx 2g Primer 209F
17							stx 2g Primer 781R
29							stx 2g Fl Primer
23							stx 2g Rl Primer
		4570	4580	4590	4600	4610	
4563	GGCGGTTTTATTTGCATTAGTTTCTGTTAATGCAATGCGCGGATTGCG						vtx 2d _{aktivatable} Sequenz
1180	H.....						vtx 2g Sequenz
18							stx 2d _{aktivatable} Primer
1							CKS2 Primer
21							stx 2g Primer 209F
17							stx 2g Primer 781R
29							stx 2g Fl Primer
23							stx 2g Rl Primer
		4620	4630	4640	4650	4660	
4613	CTAAAGGTAAATTGAGTTTTTCCAAGTATAATGAGAAATGATACATTCA						vtx 2d _{aktivatable} Sequenz
1230	A.....G.....H.....						vtx 2g Sequenz
18							stx 2d _{aktivatable} Primer
1							CKS2 Primer
21							stx 2g Primer 209F
17							stx 2g Primer 781R
29							stx 2g Fl Primer
23							stx 2g Rl Primer
		4670	4680	4690	4700	4710	
4663	GTAAGAGTGGCGGGGAAAGAACTACTGGACCAGTCGCTGGAATCTGCAACC						vtx 2d _{aktivatable} Sequenz
1280	G.....H.....						vtx 2g Sequenz
18							stx 2d _{aktivatable} Primer
1							CKS2 Primer
21							stx 2g Primer 209F
17							stx 2g Primer 781R
29							stx 2g Fl Primer
23							stx 2g Rl Primer
		4720	4730	4740	4750	4760	
4713	GTTACTGCAAAGTGCTCAGCTGACAGGAATGACTGTCACAATCAATCCA						vtx 2d _{aktivatable} Sequenz
1330	H.....						vtx 2g Sequenz
18							stx 2d _{aktivatable} Primer
1							CKS2 Primer
21							stx 2g Primer 209F
17							stx 2g Primer 781R
29							stx 2g Fl Primer
23							stx 2g Rl Primer
		4770	4780	4790	4800	4810	
4763	GTACCTGTGAATCAGGCTCCGGATTGCTGAAGTGCAAGTTTAATAATGAC						vtx 2d _{aktivatable} Sequenz
1380	A.....H.....						vtx 2g Sequenz
18							stx 2d _{aktivatable} Primer
1							CKS2 Primer
21							stx 2g Primer 209F
17							stx 2g Primer 781R
29							stx 2g Fl Primer
23							stx 2g Rl Primer

Abbildung 10: Fortsetzung.

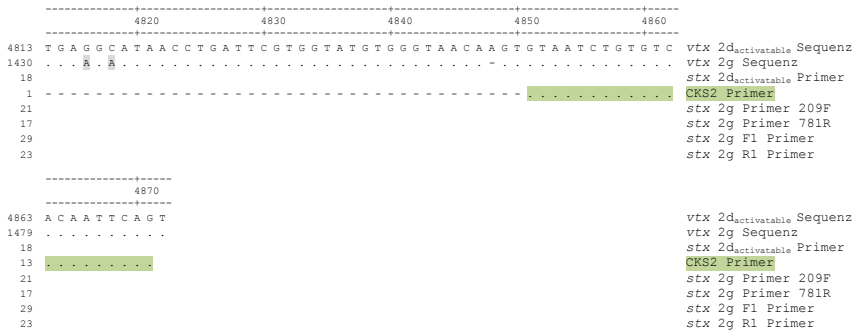


Abbildung 10: Fortsetzung.

Aus dem Alignment ist ersichtlich, dass die Vergleichssequenz *vtx 2d_{activatable}* sich im dargestellten Bereich mit der *vtx 2g* Sequenz in einigen Basen unterscheidet. Ebenso existieren hinsichtlich der *vtx 2d_{activatable}* Sequenz für die Primersysteme *stx 2g 209F/781 R* sowie *stx 2g-F1/stx 2g-R1* mehrere mismatches. Somit sind diese beiden Primersysteme zwar für die *vtx 2g* Sequenz spezifisch, jedoch hinsichtlich der *vtx 2d_{activatable}* Sequenz unspezifisch. Hingegen liegt das im Rahmen der eigenen Untersuchungen verwendete Primersystem *stx 2d_{activatable}/CKS2* in einer konservierten Region der beiden Sequenzen, in welchem nur ein Basenunterschied innerhalb der Sequenzen zwischen *vtx 2d_{activatable}* und *vtx 2g* zu finden sind. Aufgründessen konnte bei den eigenen Untersuchungen mithilfe dieses Primersystems keine eindeutige Differenzierung des Verotoxin-Subtypens stattfinden, da es sich entgegen der Ansicht aus ZHENG ET AL. (2008) nicht als spezifisch für den Verotoxin-Subtypen *vtx 2d_{activatable}* erwies. Eine Aussage über das Vorliegen eines Isolates mit einer *vtx 2d_{activatable}* Gen-Sequenz ist somit nur über die Auswertung der mithilfe der aus ZHENG ET AL. (2008) verwendeten Primersysteme generierten Sequenzen möglich (s. Kap. 4.1.9.1).

4.1.9.1 Ergebnisse der Sequenzierung

Nukleotidsequenz

Insgesamt wurden die Produkte von 20 Isolaten – meist 316 bp lang –, die mithilfe des Primersystems *stx 2d_{activatable} / CKS2* amplifiziert wurden, in einem externen Labor (Seqlab-Sequence Laboratories Göttingen GmbH) sequenziert. In Abbildung 11 sind die Ergebnisse der Sequenzierungen in einem Alignment dargestellt. Im Alignment sind nur die Sequenzen, die mithilfe des reversen Primers *stx 2d_{activatable}* sequenziert wurden, aufgeführt. Mithilfe dieses Primers kann im Gegensatz zu dem anderen Primer *CKS2* der sog. „aktivierbare Teil“ des Toxins *VT 2d_{activatable}* sequenziert werden. Dieser Genabschnitt sowie die sich direkt

anschließende Sequenz sind elementar, um eine Aussage über das Vorliegen eines VT 2d_{activatable}-Genotypen treffen zu können.

In Abbildung 11 ist für jeden unterschiedlichen Sequenztyp der untersuchten Stämme stellvertretend je ein Isolat aufgeführt. Um eine Aussage über den Genotyp treffen zu können, dient in Abbildung 11 die Sequenz *vtx 2d_{activatable}* (Acc. No. AF 479829) des Stammes B2F1 sowie des Referenzstammes W 89/11. Die Sequenz *vtx 2d_{activatable}* ist in der Darstellung in seiner Basenfolge komplett dargestellt. Für einen weiterführenden Vergleich mit der Sequenz *vtx 2g* (Acc. No. AY286000 aus LEUNG ET AL. (2003)) ist diese ebenfalls nachfolgend dargestellt. Um Abweichungen zwischen den verschiedenen Sequenzen leichter erkennen zu können, wurde auch hier eine Darstellung gewählt, in der nur Basen aufgeführt sind, die von der Sequenz *vtx 2d_{activatable}* abweichen (grau hinterlegt). Die Punkte stellen Übereinstimmungen mit der *vtx 2d_{activatable}* Sequenz dar. Striche hingegen zeigen Lücken auf – hier existiert keine passende Base.

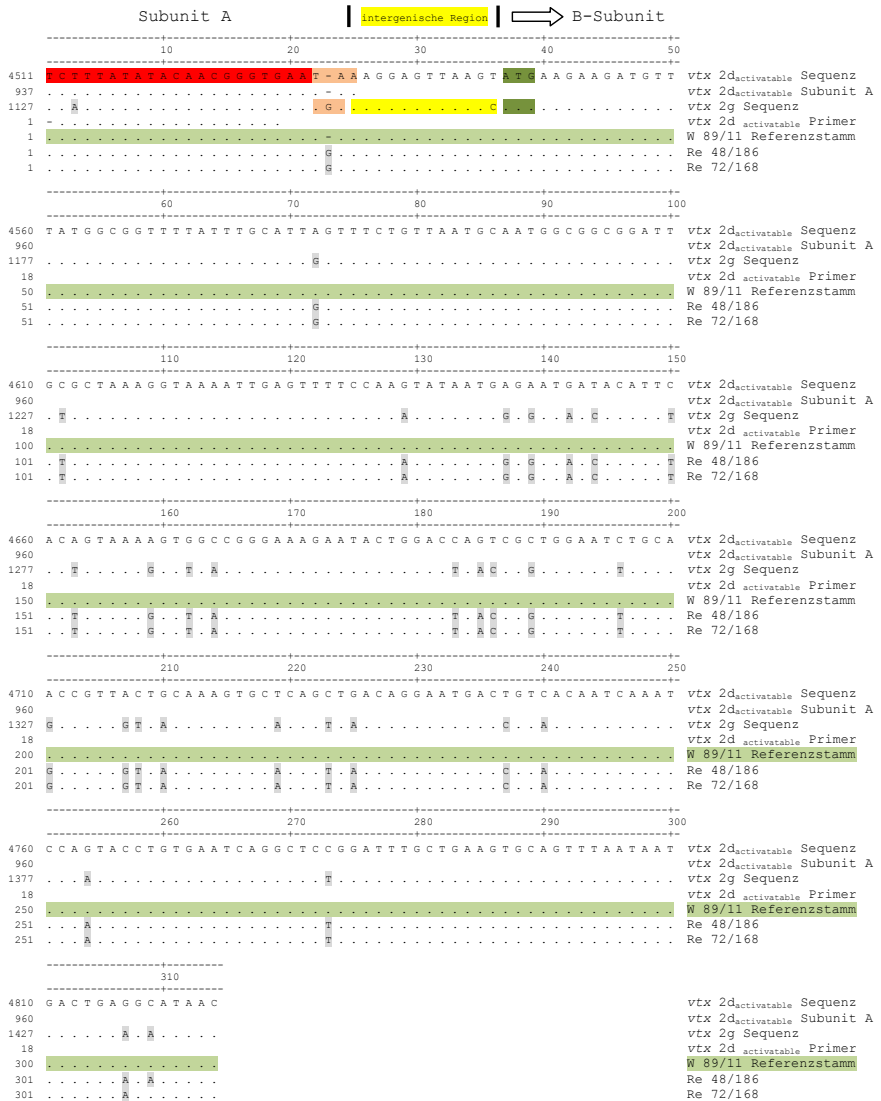


Abbildung 11: Alignment der Sequenzierungsergebnisse der in der molekularbiologischen Untersuchung vtx 2d_{activatable} positiven Isolate. Dargestellt ist das C-terminale Ende der A-Subunit, das Stopcodon der A-Subunit (rosa hinterlegt), die intergenische Region der Sequenz vtx 2g zwischen Subunit A & B (gelb hinterlegt), das Startcodon der Subunit B (dunkelgrün hinterlegt) sowie die Sequenz der B-Subunit inclusive des Signalpeptids. Die Sequenz des Referenzstammes W 89/11 (hellgrün hinterlegt) dient zusätzlich als Vergleich.

Aus Abbildung 11 ist ersichtlich, dass keines der Reh-Isolate die Sequenz des aktivierbaren Typs des Verotoxin-Subtyp VT 2d_{activatable} besitzt. Insgesamt wurden bei den 20 Isolaten zwei unterschiedliche Sequenztypen gefunden, die aufgrund ihrer Nukleotidsequenz jedoch alle dem Verotoxin-Subtyp VT 2g zuzuschreiben sind. Der Sequenztyp des Isolates Re 48/189 wurde insgesamt 19mal identifiziert. Hingegen wurde die Sequenz des Isolats Re 72/168 nur einmal gefunden. Sie unterscheidet sich von den anderen in nur einer Base.

Aminosäuresequenz (AS)

Um eine Aussage über das Vorliegen des „aktivierbaren Teils“ der Subunit A von vtx 2d_{activatable} treffen zu können, wurden die entsprechend analysierten Nukleotidsequenzen in ihre AS-Sequenz übersetzt.

Bei der Auswertung ausschlaggebend sind laut SCHEUTZ ET AL. (2012) die letzten 10 Aminosäuren des C-terminalen Endes der A₂-Subunit. Diese befinden sich an Position 288 bis 297 der Subunit A und wurden als KSQSLYTTGE identifiziert. In den eigenen Untersuchungen wurden jedoch nur die letzten sieben AS durch die Amplifikation und Sequenzierung erfasst. Die Positionen der beiden ausschlaggebenden AS Serin (S) und Glutaminsäure (E) an Position 291 bzw. 297, welche die Erkennungsstellen für die Aktivierung des Toxins durch die Elastase darstellen, sind in den eigenen Untersuchungen amplifiziert und somit berücksichtigt worden.

Abbildung 12 stellt die Übersetzung der Nukleotidsequenzen aus Abbildung 11 in ihre AS-Sequenzen dar. Um Abweichungen zwischen den verschiedenen AS-Sequenzen leichter erkennen zu können, wurde auch hier eine Darstellung gewählt, in der nur AS aufgeführt sind, die von der AS-Sequenz vtx 2d_{activatable} abweichen (grau hinterlegt). Die Punkte stellen Übereinstimmungen mit der vtx 2d_{activatable} Sequenz dar.

Aus Abbildung 12 ist zu erkennen, daß die beiden stellvertretenden Isolate Re 48/186 und Re 72/168 sowie die vtx 2g Sequenz aus LEUNG ET AL. (2003) die Erkennungsstellen des aktivierbaren Typs besitzen. Somit besitzen alle in der vorliegenden Arbeit isolierten vtx 2g-Stämme den aktivierbaren Typ, obwohl sie nicht dem Subtypen VT 2d_{activatable} zuzuordnen sind. Laut SCHEUTZ ET AL. (2012) ist jedoch nicht nur der aktivierbare Teil der Subunit A für die aktivierbaren Eigenschaften des Toxins verantwortlich, sondern scheint die Kombination dieses aktivierbaren Teils mit dem Motiv END der Subunit B an Position 15-17 ausschlaggebend für die Aktivierung zu sein. Wie aus Abbildung 12 ersichtlich, haben die untersuchten Isolate an den Positionen 15-17 ein anderes Motiv als die vtx 2d_{activatable}-Sequenz. Statt dem Motiv END liegt die AS-Abfolge GDN vor.

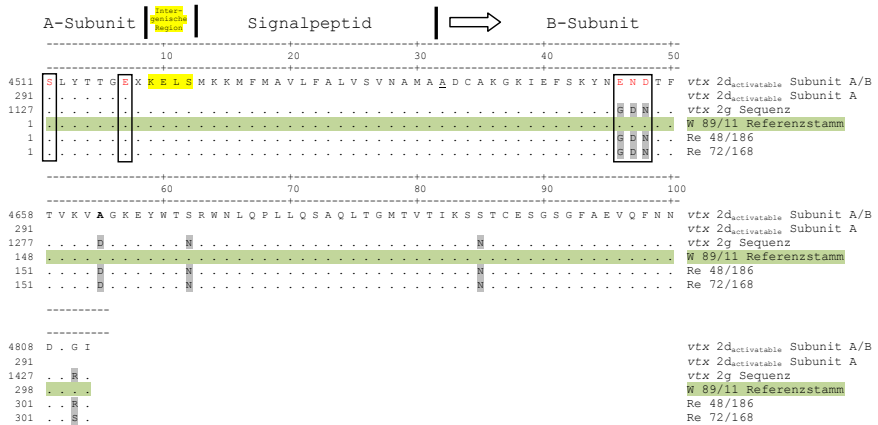


Abbildung 12: Alignment der abgeleiteten AS-Sequenzen des C-terminalen Ende der Subunit A sowie der Subunit B der analysierten vtx 2g-Sequenzen. Dargestellt ist das C-terminale Ende der A-Subunit, die intergenische Region zwischen Subunit A & B (gelb hinterlegt) sowie ein Teilabschnitt der B-Subunit inclusive des Signalpeptids. Die in der Subunit A der vtx 2d_{activatable} in roter Schrift gekennzeichneten und umrahmten AS an Position 291 (S = Serin) und 297 (E = Glutaminsäure) stellen die Erkennungsstellen für die Aktivierung des Toxins durch die Elastase dar. Zusätzlich in roter Schrift und umrahmt dargestellt, ist das Motiv END der Subunit B an Position 15-17, welches laut SCHEUTZ ET AL. (2012) in Kombination mit dem aktivierbaren Teil der Subunit A verantwortlich für die aktivierbaren Eigenschaften des Toxins sind. Die Sequenz des Referenzstammes W 89/11 (hellgrün hinterlegt) dient zusätzlich als Vergleich.

4.2 Serotypisierung

Die 79 Isolate der Rehe ließen sich 27 verschiedenen Serovaren zuordnen. Insgesamt traten hierbei 17 verschiedene O-Serotypen (O1, O2, O11, O21, O36, O43, O74, O75, O103, O110, O117, O128, O141, O146, O154, O174, O178) und 12 verschiedene H-Typen (H2, H4, H5, H7, H8, H10, H14, H21, H28, H31, H45, H48) auf. Vier Isolate wiesen ein nicht typisierbares O-Antigen auf (s. Tabelle 32) – eins von diesen Isolaten war zusätzlich unbeweglich. Bei drei Isolaten konnte weiterhin das H-Antigen nicht typisiert werden.

Die Serovare O21:H21 und O74:H28 wurden unter den 79 Isolaten mit 13mal (16,46 %) am häufigsten gefunden, gefolgt von den Serovaren O36:H14 mit 8,86 %, O146:H28 mit 7,59 % und O174:H8 und O154:H31 mit jeweils 6,33 % (s. Tabelle 32).

Tabelle 32 gibt zusätzlich eine Übersicht über das Virulenzprofil der einzelnen Serovare.

Tabelle 32: Übersicht über die Virulenzgenprofile der einzelnen Serovare.

Serovar	Gesamtanzahl		Virulenzgenprofil						
			vtx 1a	vtx 1c	vtx 1d	vtx 2b	vtx 2g	eae	e-hly
O21:H21	13	12	-	-	-	+	-	-	-
		1	-	-	-	+	-	-	+
O74:H28	13	8	-	-	-	-	+	-	-
		5	-	-	-	-	+	-	+
O36:H14	7	4	-	-	-	-	+	-	+
		3	-	-	-	-	+	-	-
O146:H28	6	4	-	-	-	+	-	-	+
		2	-	-	-	+	-	-	-
O174:H8	5	4	+	+	-	-	-	-	+
		1	-	+	-	-	-	-	+
O154:H31	5		-	-	+	-	-	-	-
O43:H2	3		-	-	-	+	-	-	+
O110:H31	3		-	+	-	+	-	-	-
O11:H48	3		-	-	+	-	-	-	-
O2:HNT	2		-	-	-	+	-	-	-
ONT:H14	2		-	-	-	-	+	-	-
O128:H2	2	1	-	-	-	+	-	-	-
		1	-	+	-	-	-	-	-
O178:H7*	1		-	-	-	-	-	-	-
O1:H7	1		-	-	-	-	+	-	-
O2:HNM	1		-	-	-	+	-	-	-
O75:H8	1		-	+	-	-	-	-	+
ONT:H48	1		-	-	+	-	-	-	-
ONT:H7	1		-	-	-	-	+	-	-
ONT:HNM	1		-	+	-	-	-	-	+
O103:H7**	1		-	-	-	-	-	-	-
O110:H45	1		-	-	-	+	-	-	+
O110:HNT	1		-	-	-	+	-	-	-
O117:H4*	1		-	-	-	-	-	-	+
O11:H5*	1		-	-	-	-	-	-	-
O11:HNT*	1		-	-	-	-	-	-	+
O128:H8***	1		-	-	-	-	-	+	+
O141:H10*	1		-	-	-	-	-	-	-

* Bei den Isolaten mit den vorliegenden Serotypen konnte in den eigenen molekularbiologischen Untersuchungen der Verotoxin-Subtyp vtx 2d detektiert werden. Durch die Subkultivierung der entsprechenden Isolate sowohl für die Archivierung als auch für die Untersuchung in den Referenzlaboren ist das Gen zur Bildung des Verotoxins verloren gegangen.

** Bei diesem Isolat war in den eigenen molekularbiologischen Untersuchungen die Untersuchung auf Virulenzgene positiv. Es konnte jedoch sowohl mit den eigenen Primersystemen als auch mit den Primersystemen der Referenzlabore kein bestimmtes Virulenzgen identifiziert werden.

***Bei diesem Isolat konnte in den eigenen molekularbiologischen Untersuchungen das Gen für vtx 1 und das eae identifiziert werden. Durch die Subkultivierung des entsprechenden Isolats sowohl für die Archivierung als auch für die Untersuchung für das Referenzlabor ist das Gen zur Bildung des Verotoxins verloren gegangen.

ONT = O-Antigen nicht typisierbar

HNM = unbeweglich (non-motile)

HNT = H-Antigen nicht typisierbar

4.3 Kultureller Nachweis von VTEC

4.3.1 Vergleich der eingesetzten Anreicherungsmedien der ersten Versuchsphase

Von den insgesamt 353 untersuchten Kotproben wurden 50 Kotproben sowohl in BPW als auch in mTSB + N angereichert und mithilfe des EIA und des Duopath® Verotoxin-Tests auf Verotoxine untersucht. Hierbei konnte aus den 50 Proben lediglich aus einer Probe (2 %) über den EIA ein VTEC-Stamm isoliert werden. Die beiden anderen positiven Proben wurden mittels Duopath® Verotoxin-Test erzielt.

Die positive Probe zeigte im EIA sowohl nach Anreicherung in mTSB + N als auch in BPW eine gelbliche Verfärbung – ein Hinweis auf das Vorhandensein von Verotoxin, die jedoch unterhalb des festgelegten OD-Wertes von $\geq 0,150$ lag. Aus beiden Anreicherungsmedien konnte der identische VTEC-Stamm isoliert werden. Nach Untersuchungen von BEUTIN ET AL. (2010) erwies sich BPW als besser zur Kultivierung, eventuell auch durch das Einfrieren vorgeschädigter VTEC-Stämme, geeignet. Für die Untersuchung der restlichen 303 Kotproben wurde daher alleinig dieses Anreicherungsmedium eingesetzt.

4.4 Nachweis von VTEC mit den immunologischen Testsystemen

In den beiden Testsystemen Duopath® Verotoxin und NOVITEC® Verotoxin wurden insgesamt 186 Kotproben als positiv auf das Vorhandensein von VTEC identifiziert (s. Tabelle 33 und Tabelle 37). Von diesen 186 immunologisch positiv getesteten Kotproben konnten nur 68 gleichzeitig kulturell, biochemisch und molekularbiologisch bestätigt werden.

4.4.1 Immunochromatographischer Duopath® Verotoxin-Test

Die Auswertung dieses Testsystems war für die Kotproben des Rehwildes nicht immer eindeutig. Laut Herstellerangaben soll eine Probe als positiv bewertet werden, wenn in den Testzonen (Verotoxin 1 und/oder Verotoxin 2) und in der Kontrollzone innerhalb von 10 min. eindeutig rotgefärbte Linien erscheinen (s. Anhang Abbildung 13). Eine dunkle aber nicht rot gefärbte Linie ist als negativ zu bewerten. Die Beschreibung der Stärke der rotgefärbten Linien erfolgte anhand einer Farbskala (s. Anhang Abbildung 13).

Bei der Auswertung der Rehwild-Kotproben war von Anfang an auffällig, dass zum einen die Bandenstärke oftmals nicht sehr ausgeprägt war und zum anderen die Farbintensität keine Differenzierung hinsichtlich eines positiven bzw. negativen Ergebnisses zuließ. So stellte sich während der Untersuchungen heraus, dass sowohl eine braune als auch eine rötliche Bande

ein positives wie auch ein negatives Ergebnis darstellen konnte (s. Anhang Abbildung 14 bis 17).

Daher wurden auch zweifelhafte Testergebnisse weiter verfolgt. Hierbei konnten im Duopath® Verotoxin Test 184 Kotproben positiv auf Verotoxine getestet werden. Von diesen 184 Tieren waren jedoch 114 Proben im molekularbiologischen Screening negativ, die im Rahmen dieser Untersuchung als falsch-positiv bewertet wurden (s. Tabelle 33). Zusätzlich erwiesen sich bei den biochemischen Untersuchungen vier weitere Kotproben, die sowohl im Duopath® als auch in der MK-PCR positiv gewesen waren, als nicht zu der Spezies *E. coli* zugehörig. Somit wurden insgesamt 118 (63,44 %) Tiere als falsch-positiv eingestuft.

Tabelle 33: Vergleichende Übersicht über die Ergebnisse des Duopath® Verotoxin-Tests und des molekularbiologischen Screenings mithilfe der MK-Primer.

Ergebnis Duopath®	Ergebnis MK-PCR		GESAMT
	negativ	positiv	
negativ	0	2	2
%	0,00	1,08	1,08
positiv	114	70	184
%	61,30	37,63	98,92
GESAMT	114	72	186
%	61,30	38,71	100,00

4.4.1.1 Wachstum auf SMAC-Agar

Vor Durchführung des Duopath® Verotoxin-Tests wurden die Kotmengen mithilfe eines Wattetupfers auf SMAC-Agar ausgestrichen und anschließend für 24 h bei 37 °C bebrütet. Es fiel auf, dass von den SMAC-Platten, auf denen kein sichtbares Koloniewachstum bzw. nur eine geringe Anzahl an Kolonien gewachsen waren, oftmals ein positives Ergebnis im Duopath® Verotoxin-Test erzielt wurde. Aufgrund dieser Beobachtung wurde dieser Sachverhalt statistisch ausgewertet.

Für die statistische Auswertung von 303 Proben wurden das Wachstum auf dem SMAC-Agar in drei Klassen unterteilt (s. Tabelle 34). Die Auswertung ergab für die drei Klassen einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$ Chi-Quadrat-Test). So konnte von 113 Kotproben, bei denen kein sichtbares Koloniewachstum auf dem SMAC-Agar zu verzeichnen war, 33 (10,89 %) als positiv und 80 (26,40 %) als negativ für VTEC identifiziert werden. In den Klassen 2 und 3 hingegen konnten nur 5,61 % bzw. 5,28 % der untersuchten Kotproben als positiv für VTEC bestätigt werden.

Tabelle 34: Koloniewachstum auf SMAC-Agar aus Kotproben, einschließlich Ergebnis im Duopath® Verotoxin-Test.

Klassen	Ergebnis Duopath® Verotoxin-Test		GESAMT (%)
	negativ (%)	positiv (%)	
1 ¹⁾	80 (26,40)	33 (10,89)	113 (37,29)
%	70,80	29,20	100
2 ²⁾	58 (19,14)	17 (5,61)	75 (24,75)
%	77,33	22,67	100
3 ³⁾	99 (32,67)	16 (5,28)	115 (37,95)
%	86,09	13,91	100
GESAMT (%)	237 (78,22)	66 (21,78)	303 (100)

¹⁾ Wachstum auf SMAC-Agar = 0

²⁾ Wachstum auf SMAC-Agar = 1 bis 10 Kolonien

³⁾ Wachstum auf SMAC-Agar = 11 bis > 100

4.4.1.3 Übereinstimmung der Ergebnisse für die beiden Verotoxine vtx 1 und vtx 2 im Duopath® Verotoxin Testsystem und der molekularbiologischen Untersuchung

Mithilfe des Duopath® Verotoxin-Tests ist es laut Herstellerangaben möglich, sowohl das Verotoxin 1 als auch das Verotoxin 2 qualitativ in einer Probe nachzuweisen. Die hierbei positiven Ergebnisse wurden mit den molekularbiologischen Ergebnissen verglichen. In diesem Zusammenhang sei erwähnt, dass im molekularbiologischen Screening (Primersystem MK1/MK2) negative Proben nicht weitergehend untersucht wurden. Somit wurden nur im molekularbiologischen Screening positive Kotproben molekularbiologisch weitergehend berücksichtigt. Auch die sich bei weitergehenden biochemischen Untersuchungen als nicht zu der Spezies *E. coli* zugehörigen vier Isolate, die sowohl im Duopath® Verotoxin Testsystem als auch in der MK-PCR positiv gewesen waren, wurden bei der vergleichenden Betrachtung außer Acht gelassen. Insgesamt konnten somit 68 Kotproben von 353 Rehen sowohl mikrobiologisch als auch immunologisch und molekularbiologisch als positiv für VTEC ermittelt werden.

Tabelle 35 und Tabelle 36 geben eine Übersicht über die Übereinstimmungen der Ergebnisse für die beiden Verotoxine vtx 1 und vtx 2, die sowohl mithilfe des Duopath® Verotoxin Tests als auch durch die molekularbiologische Untersuchung gewonnen werden konnten.

Tabelle 35: Übersicht über die Übereinstimmungen der Ergebnisse für das Verotoxin 1 im Duopath® Verotoxin-Test und in der molekularbiologischen Untersuchung.

Duopath® vtx 1	Molekularbiologische Untersuchung auf vtx 1		GESAMT
	negativ	positiv	
negativ	41	8	49
%	60,29	11,76	72,06
positiv	8	11	19
%	11,76	16,18	27,94
GESAMT	49	19	68
%	72,06	27,94	100,00

Bei der Untersuchung mithilfe des Duopath® Verotoxin-Tests wurden acht Kotproben der 68 weitergehend untersuchten Proben, als falsch-negativ für das Verotoxin 1 ermittelt. Insgesamt konnten durch das immunologische Testsystem 83,67 % der 49 für das Verotoxin 1 als negativ eingestuften Proben als richtig negativ bestimmt werden. Hingegen wurden acht Proben, die das Verotoxin 1 enthalten sollten, als falsch positiv eingestuft, da diese in der molekularbiologischen Untersuchung nicht bestätigt werden konnten. Somit wurden von den 19 Proben, die aufgrund des Duopath® Verotoxin-Tests als positiv für das Verotoxin 1 eingeordnet wurden, zu 57,89 % molekularbiologisch bestätigt.

Tabelle 36: Übersicht über die Übereinstimmungen der Ergebnisse für das Verotoxin 2 im Duopath® Verotoxin-Test und in der molekularbiologischen Untersuchung.

Duopath® vtx 2	Molekularbiologische Untersuchung auf vtx 2		GESAMT
	negativ	positiv	
negativ	7	6	13
%	10,29	8,82	19,12
positiv	15	40	55
%	22,06	58,82	80,88
GESAMT	22	46	68
%	32,35	67,65	100,00

Bei der immunologischen Untersuchung auf das Verotoxin 2 wurden sechs Kotproben, bei denen in der nachfolgenden molekularbiologischen Untersuchung das vtx 2 detektiert werden konnte, als falsch-negativ eingestuft. Durch den Duopath® Verotoxin-Test konnten weiterhin 53,85 % der 13 Proben, die als negativ für das Verotoxin 2 eingeordnet wurden, als richtig negativ für das Verotoxin 2 bzw. Verotoxingen 2 bestimmt werden. Bei 15 Kotproben jedoch, die nach Auswertung des immunologischen Testsystems positiv für das Verotoxin 2 waren, konnte in der molekularbiologischen Untersuchung dieses Ergebnis nicht bestätigt werden – diese Proben wurden somit durch den Duopath® Verotoxin-Test falsch-positiv bestimmt. Von

den 55 Kotproben, die positiv für das Verotoxin 2 bzw. das Verotoxingen 2 sein sollten, konnten 72,73 % molekularbiologisch bestätigt werden.

4.4.2 NOVITEC® Verotoxin-Test

Im NOVITEC® Verotoxin-Test konnten 13 Kotproben positiv auf Verotoxine getestet werden. Im molekularbiologischen Screening konnten von diesen 13 Rehen 10 als Ausscheider von VTEC identifiziert werden (s. Tabelle 37 und Tabelle 38). Die weiteren 62 im molekularbiologischen Screening positiven Koproben konnten hingegen nicht von diesem Testsystem detektiert werden. Vier von diesen 62 Kotproben erwiesen sich jedoch bei weitergehenden biochemischen Untersuchungen als nicht zu der Spezies *E. coli* zugehörig. Somit wurden anhand dieses Testsystems 58 Tiere (31,18 %) als falsch-negativ für die Ausscheidung von VTEC bewertet.

Tabelle 37: Vergleichende Übersicht über die Ergebnisse des NOVITEC® Verotoxin-Tests und des molekularbiologischen Screenings mithilfe der MK-Primer.

Ergebnis NOVITEC®	Ergebnis MK-PCR		GESAMT
	negativ	positiv	
negativ	111	62	173
%	59,68	33,33	93,01
positiv	3	10	13
%	1,61	5,38	6,99
GESAMT	114	72	186
	61,30	38,71	100,00

Bei der Betrachtung der Virulenzprofile der 10 positiv getesteten Tiere fällt auf (s. Tabelle 38), dass prinzipiell das Verotoxin VT 1 am häufigsten durch den NOVITEC® Verotoxin-Test nachgewiesen werden konnte. Die VT 1a-positiven Isolate ($n_{\text{gesamt}} = 4$) konnten von diesem Testsystem in 100 % der Fälle identifiziert werden. Anders sieht es bei den restlich detektierten Isolaten aus. So wurde der Subtyp VT 1c ($n_{\text{gesamt}} = 10$) in 60 % der Fälle, die VT 1d-positiven Isolate ($n_{\text{gesamt}} = 9$) in 11,11 % der Fälle sowie der Subtyp VT 2b ($n_{\text{gesamt}} = 30$) und VT 2g ($n_{\text{gesamt}} = 24$) in 10 % bzw. in 12,5 % der Fälle identifiziert. Auffällig ist, dass der Subtyp vtx 2b nur bei Isolaten detektiert werden konnte, bei denen entweder kombiniert das vtx 1c vorlag oder aber aus dem Kot eines Rehes zwei Isolate nachgewiesen werden konnten, von welchem eines der Isolate die Kombination vtx 1a und vtx 1c trug.

Tabelle 38: Übersicht über die Virulenzgenprofile der VTEC-Stämme aus den zehn positiv getesteten Rehen.

Tiernr.	EIA-Ergebnis	Verotoxin-Gen(e)	eae-Gen	Entero-hämolysin-Gen	Serovar	Gesamtergebnis
Re 94	0,55	vtx 1a, vtx 1c	-	+	O174:H8	+
Re 115	1,85	vtx 1a, vtx 1c	-	+	O174:H8	+
		vtx 2b	-	-	O146:H28	+
Re 203	0,14*	vtx 1a, vtx 1c	-	+	O174:H8	+
Re 311	0,17	vtx 1a, vtx 1c	-	+	O174:H8	+
		vtx 2b	-	-	O21:H21	+
Re 321	0,04*	vtx 1c, vtx 2b	-	-	O110:H31	+
Re 324	0,06*	vtx 2g	-	+	O36:H14	+
Re 333	0,18	vtx 1c	-	+	ONT:H ⁻	+
Re 335	0,07*	vtx 2g	-	+	O74:H28	+
Re 346	0,05*	vtx 1d	-	-	O11:H48	+
Re 382	0,17	vtx 2g	-	-	O146:H28	+

*Diese Proben zeigten einen Extinktionswert < 0,150 auf, jedoch wiesen die jeweiligen Kavitäten im EIA eine distinkte gelbe Verfärbung auf, so dass sie weitergehend molekularbiologisch untersucht wurden.

4.4.3 Übereinstimmung der beiden Testsysteme

Mithilfe des NOVITEC[®] Verotoxin-Tests erwiesen sich lediglich 13 Tiere als positiv, wobei nur von 10 Kotproben VTEC-Stämme isoliert werden konnten. Bei der Untersuchung des Kots mit dem Duopath[®] Verotoxin-Test erwiesen sich 184 Rehe als Verotoxin-positiv. Insgesamt konnten jedoch nur 68 Tiere molekularbiologisch als Ausscheider von VTEC identifiziert werden – von diesen Tieren konnten auch VTEC-Stämme isoliert werden. Die Übereinstimmung beider Testsysteme wurde statistisch mithilfe des Kappa-Koeffizienten – ein Maß für die Übereinstimmung – geprüft (s. Tabelle 39). Der vorliegende Kappa-Koeffizient von 0,0460 zeigt in Anlehnung an die Definition von GROUVEN ET AL. 2007 eine nur geringfügige Übereinstimmung der Ergebnisse der beiden Testsysteme.

Tabelle 39: Übereinstimmungsmatrix der beiden Testsysteme.

		NOVITEC [®] Verotoxin Test				Kappa-koeffizient	Standardfehler
Duopath [®] Verotoxin Test			negativ	positiv	SUMME		
	Häufigkeit	negativ	167	2	169	0,0460	0,0188
	%		47,31	0,57	47,88		
	Häufigkeit	positiv	173	11	184		
	%		49,01	3,12	52,12		
	Häufigkeit	SUMME	340	13	353		
	%		96,32	3,68	100,00		

5. Diskussion

5.1 Prävalenzdaten

Insgesamt ist die Datenlage für eine risikoorientierende Bewertung der Situation für VTEC bei Rehwild noch nicht ausreichend. In diesem Zusammenhang sollte in den eigenen Untersuchungen ein Beitrag zur Prävalenz von VTEC-Stämmen bei Rehwild, unter Berücksichtigung darunter befindlicher potentiell virulenter Stammformen, im Bundesland Hessen geleistet werden. Zur Untersuchung des Zusammenhangs der gegenseitigen horizontalen Infektion von Hauswiederkäuern und Rehwild durch die Nutzung gleicher Flächen bzw. den Eintrag von Kot auf gemeinsam genutzten Flächen, wurde zusätzlich der Einfluss der Anzahl Tiere (Rind, Schaf und Ziege) pro Hektar landwirtschaftliche Nutzfläche auf die Prävalenz statistisch ausgewertet. Durch die Kombination dieses Sachverhalts mit den molekularbiologischen Ergebnissen von den im Rahmen der eigenen Untersuchungen gewonnenen VTEC-Stämme soll eine wechselseitige Übertragung von Rehwild und Hauswiederkäuer beleuchtet und interpretiert werden.

Im Folgenden werden die ermittelten Prävalenzdaten für das Bundesland Hessen sowie die Prävalenzen auf Ebene der Regierungsbezirke und Landkreise dargestellt und diskutiert. Mit dem Hintergrund der Interpretation einer wechselseitigen Übertragung zwischen Rehwild und Hauswiederkäuer wird zusätzlich aufgezeigt, ob die ermittelten Prävalenzen eine Abhängigkeit hinsichtlich der Anzahl Tiere pro Hektar landwirtschaftliche Nutzfläche zeigen.

5.1.1 Prävalenzdaten für das Bundesland Hessen

In der vorliegenden Arbeit konnte für das Bundesland Hessen eine Prävalenz von VTEC von 19,26 % ermittelt werden. Von den 353 untersuchten Rehen konnten insgesamt 68 Tiere als Ausscheider von VTEC identifiziert werden. Ähnliche Ergebnisse sind auch in der Literatur zu finden, wobei aber auch wesentlich höhere Prävalenzen, vor allem aus Deutschland, beschrieben werden. Im Hinblick auf die Vergleichbarkeit mit Ergebnissen aus der Literatur muss jedoch erwähnt werden, dass eine zur eigenen vergleichbare Studie in der Literatur nach momentanem Kenntnisstand bisher nicht beschrieben wurde. In Deutschland bzw. im deutschsprachigen Raum konnten bei Wildwiederkäuern im Rahmen von Untersuchungen, Prävalenzen von VTEC von 7,5 % bis 73 % gefunden werden. In keiner der Studien wurde jedoch gezielt nur das Reh bzw. eine Wildwiederkäuerart für eine bestimmte Region auf das Vorkommen von VTEC untersucht und entsprechend ausgewertet. In einer Untersuchung von THOMS (1999) wurden zwar während einer Jagdsaison 53 Rehfleischproben aus ganz Niedersachsen auf VTEC untersucht, diese geographisch aber nicht weitergehend

berücksichtigt. Im Rahmen dieser Studie konnten aus vier der Rehfleischproben (7,5 %) VTEC isoliert werden; eine im Vergleich zu anderen Untersuchungen vergleichsweise niedrige Prävalenz. Zwei der Isolate waren laut THOMS (1999) Serovaren zuzuordnen, die bereits bei menschlichen Infektionen nachgewiesen wurden. In der Schweiz hingegen wurde für das Rehwild eine Prävalenz für VTEC von etwa 23 % nachgewiesen (HOFER ET AL., 2012). Somit konnte in dieser Studie eine mit den eigenen Daten vergleichbar hohe Prävalenz von VTEC für das Reh gefunden werden. Es sei erwähnt, dass im Rahmen dieser Untersuchung zwar insgesamt 239 Tiere beprobt, aber nur 64 Kotproben von Rehen untersucht wurden. Bei den anderen Tierarten handelte es sich um Rotwild (n = 84), Gamswild (n = 64) und Steinwild (n = 27). Insgesamt betrachtet konnte für die Gesamtheit der vier untersuchten Wildwiederkäuerarten eine vergleichbare Prävalenz von etwa 22 % ermittelt werden. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen konnten LEHMANN ET AL. (2006) bei 51,8 % der untersuchten Kotproben von frisch erlegten Reh-, Rot- und Damwild aus Jagdgebieten des Bundeslandes Sachsen-Anhalt VTEC nachweisen. Im Rahmen dieser Studie wurden insgesamt 56 Kotproben von drei verschiedenen Wildarten beprobt, welche bei fünf Treibjagden in fünf verschiedenen Jagdgebieten erlegt wurden, so dass die Ergebnisse mit denen der eigenen Untersuchung nicht vergleichbar sind. Dieses resultiert unter anderem daraus, dass die Anzahl der einbezogenen Rehe in der Veröffentlichung nicht dargelegt wurde. Überdies wurde in den eigenen Untersuchungen ein wesentlich umfangreicheres Probenkontingent einbezogen, welches auf Basis statistischer Verfahren für das Bundesland Hessen repräsentativ ausgewählt wurde. Insgesamt wurden in den eigenen Untersuchungen auf 65 Jagden in 46 verschiedenen Revierbezirken von 353 Rehen Kotproben genommen.

Eine höhere Prävalenz von VTEC für das Rehwild wurde aus dem Nationalpark des Bayerischen Waldes ermittelt. In dieser Studie wurden insgesamt 30 Kotproben von lebenden Rehen gesammelt, die sowohl im Zuge eines Projektes mit Transpondern ausgestattet worden waren als auch von Tieren, die sich in unmittelbarer Umgebung der besenderten Tiere aufhielten. Insgesamt konnten von den 30 Rehen 22 Rehe (73 %) positiv auf *vtx* getestet werden (EGGERT, 2011). Die hohe Prävalenz im Rahmen der Studie wird jedoch dadurch erklärt, dass die Rehe im Rahmen eines Kennzeichnungsprojektes mit Futter angelockt wurden. Laut EGGERT (2011) besteht hierdurch ein erhöhtes Übertragungsrisiko von VTEC durch orale Aufnahme von Kot *vtx*-positiver Tiere. Aufgrund dieser Begebenheiten handelte es sich bei den untersuchten Rehen um eine nicht repräsentative Stichprobe der Rehwildpopulation des bayerischen Waldes.

Im Rahmen von Lebensmittelplanproben untersuchtes Wildfleisch wies in den Jahren zwischen 2005 und 2010 eine VTEC-Prävalenz von etwa 9 bis 15 Prozent auf (BfR, 2007; BfR, 2008; BfR, 2012). Für das Jahr 2010 wurde für die Wildfleischplanproben erstmalig eine Länderverteilung angegeben. Die positiven Nachweise stammen dabei aus fünf Bundesländern, wobei in Hessen kein VTEC nachgewiesen wurde (BfR, 2012). In den Zoonoseberichten des BfR gibt es jedoch keine detaillierten Angaben zu den jeweilig untersuchten Wildtierarten, so dass anhand dieser Ergebnisse kein direkter Bezug zu den eigenen Ergebnissen hergestellt werden kann. Am bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit wurden im Jahr 2008 im Rahmen der amtlichen Probenplananforderung bei 31 % der Wildfleischproben von Rehwild VTEC nachgewiesen (DIEPOLDER, 2008). Somit konnte für Bayern eine etwas höhere Prävalenz von VTEC bei Rehwild nachgewiesen werden als in den eigenen Untersuchungen in Hessen. Zwar handelte es sich bei dem Untersuchungsmaterial um Wildfleisch und nicht um Kot, aber in einer Untersuchung von MARTIN UND BEUTIN (2011) konnten zwischen den Virulenzgenprofilen und Serotypen von VTEC, die von einer Tierart sowohl in dessen Kot als auch von diesen stammenden Lebensmitteln isoliert werden konnten, bemerkenswerte Ähnlichkeiten aufgezeigt werden.

Aus anderen Ländern liegen bisher nur vereinzelt Prävalenzdaten über VTEC von Wildwiederkäuern vor. Zusätzlich beschränken sich viele Untersuchungen häufig auf das Serovar *E. coli* O157:H7 (FISCHER ET AL., 2001; RABATSKY-EHR ET AL., 2002; RICE ET AL., 2003; GARCÍA-SÁNCHEZ ET AL., 2007; SÁNCHEZ ET AL., 2010). Darüber hinaus ist das Rehwild eher selten Gegenstand solcher Untersuchungen gewesen. In etlichen Studien ist darüber hinaus keine Differenzierung der einzelnen Tierarten erfolgt, so dass keine Rückschlüsse auf die Prävalenzen für die jeweilige Tierart gezogen werden kann. Gerade bei den Wildwiederkäuerarten ist dieses von Bedeutung, da sie je nach Spezies ein anderes Nahrungsverhalten zeigen. So ist Rehwild ein klassischer Konzentratselektierer, der sich im Gegensatz zum Rotwild, einem intermediären Äsungstyp (HOFMANN, 2007), wesentlich seltener von Gras ernährt. Stattdessen bevorzugt das Reh Blätter, Kräuter und Früchte und kommt somit wesentlich seltener beim Äsen mit dem Boden in Kontakt. Aufgrund ihrer selektiven Äsungsweise und den hochentwickelten Speicheldrüsen können sie zudem auch Pflanzen, wie z. B. Lupinenblüten, aufnehmen, die andere Wildwiederkäuer bzw. Wiederkäuer meiden (HOFMANN, 2007). Durch die Unterschiede im Äsungsverhalten der einzelnen Tierarten ist verschiedenartiger Kontakt mit VTEC durch die Nahrung denkbar.

In Untersuchungen aus Belgien wurden von PIÉRARD ET AL. (1997) und BARDIAU ET AL. (2010) neben Rotwild auch das Rehwild sowohl auf VTEC O157 als auch auf VTEC non-O157 untersucht. Dabei konnte PIÉRARD ET AL. (1997) im Fleisch des Rehwildes molekularbiologisch eine VTEC-Prävalenz von 79 % nachweisen, wobei nur aus 21 % der untersuchten Proben schließlich auch Isolate gewonnen werden konnten. Damit stellten die Autoren *vtx*-positive Proben bei Fleisch von Rehwild deutlich häufiger fest als im Fleisch der anderen von ihnen untersuchten Tierarten. Der molekularbiologische Nachweis von VTEC hingegen für Rotwild war mit 41 % deutlich niedriger als für Rehwild, wohingegen im Fleisch von Rotwild mit einer Prävalenz von 16 % annähernd so viele Isolate kultiviert werden konnten wie für das Rehfleisch. Somit sprechen diese Ergebnisse dafür, dass Kotverschmutzungen, die durch den Schuss aber auch die Technik des Aufbrechens bedingt sein können, für die Kontamination mit VTEC von großer Bedeutung sind. Die Tatsache, dass u.a. bei den Rehen zwar bei 79 % der Rehe das *vtx*-Gen molekularbiologisch nachgewiesen werden, aber in nur 21 % der Fälle VTEC kulturell isoliert werden konnte, spricht laut Autoren dafür, dass bei der Anzucht entweder ein unvorteilhaftes Verhältnis von VTEC gegenüber anderen *E. coli*-Stämmen vorlag oder aber ein Verlust des *vtx*-Gens durch Subkultivierung bei einigen präsumtiven VTEC-Stämmen stattgefunden hat. BARDIAU ET AL. (2010) hingegen fanden im Kot von erlegtem Rehwild nur eine Prävalenz für VTEC von 13,5 %. In diesem Zusammenhang muss erwähnt werden, dass in dieser Studie nur 52 Rehe beprobt wurden und es sich bei lediglich 15 Tieren um juvenile Rehe handelte. Anhand der eigenen Ergebnisse (s. Kap. 4.1.2) und vieler Studien, die sich mit VTEC bei Kälbern beschäftigt haben (KUHNERT ET AL., 2005; RUGBJERG ET AL., 2003), kann vermutet werden, dass auch bei Rehwild besonders die Jungtiere als VTEC-Ausscheider anzusehen sind (s. Kap. 5.2). Somit könnte die Prävalenz in der Studie von BARDIAU ET AL. (2010) aufgrund der Auswahl der Tiere während der Probennahme möglicherweise unterschätzt worden sein. Drei weitere Studien, in welchen Wildwiederkäuer auf das Vorkommen von VTEC untersucht wurden, kommen aus Spanien (GARCÍA-SÁNCHEZ ET AL., 2007; SÁNCHEZ ET AL., 2009; MORA ET AL., 2012). In den Untersuchungen von GARCÍA-SÁNCHEZ ET AL. (2007) und SÁNCHEZ ET AL. (2009) wurden insgesamt 243 Kotproben von Wildwiederkäuern sowohl auf VTEC O157 als auch auf VTEC non-O157 untersucht. GARCÍA-SÁNCHEZ ET AL. (2007) konnten in ihren Untersuchungen beim Rotwild eine Prävalenz für das Serovar O157 von 1,5 % detektieren. Im Gegensatz dazu erwiesen sich die ebenfalls untersuchten Spezies Rehwild, Damwild sowie Mufflon als negativ für dieses Serovar. Bei der Untersuchung auf VTEC non-O157 wurden diese bei 24,7 % des untersuchten Rotwildes, bei 5 % der Rehe, bei 33,2 % des Damwildes

sowie bei 36,4 % der Mufflons gefunden. Die Ergebnisse für die Tierarten Reh, Damwild sowie Mufflon müssen jedoch kritisch betrachtet werden. Die angegebenen Prävalenzdaten beruhen für das Rehwild auf 20 Tieren sowie für das Damwild und Mufflon sogar auf nur sechs bzw. 11 Tieren. Im Gegensatz hierzu wurden für den Rothirsch insgesamt 206 Tiere auf das Vorkommen von VTEC untersucht (SÁNCHEZ ET AL., 2009). Demgegenüber konnten MORA ET AL. (2012) bei Rehwild eine Prävalenz für VTEC von 53 % detektieren. Das Ergebnis beruht ähnlich wie in den eigenen Untersuchungen auf einer relativ hohen Anzahl an untersuchten Rehen ($n = 179$), so dass dieser Prävalenz eine größere Aussagekraft zugesprochen werden kann. Eine ähnlich hohe Anzahl an Kotproben von Rehwild untersuchten Arbeitsgruppen aus Norwegen ($n = 206$) (LILLEHAUG ET AL., 2005) und Schweden ($n = 200$) (WAHLSTRÖM ET AL., 2003), um VTEC bzw. VTEC O157 nachzuweisen. Im Gegensatz zu den anderen Studien konnten sie aus keiner der Kotproben VTEC und somit auch keine O157-Stämme isolieren (WAHLSTRÖM ET AL., 2003; LILLEHAUG ET AL., 2005).

Anhand der vorliegenden Studien über das Vorkommen von VTEC bei Rehwild und den teilweise doch sehr unterschiedlichen Prävalenzen, ist zu erkennen, dass die Prävalenz für VTEC von einigen Faktoren abzuhängen scheint. Bedeutende Punkte sind sicherlich die geographische Herkunft der Proben, die Probenanzahl, die Probennahme, die Probenmenge sowie auch die Auswahl der Proben und das methodische Vorgehen zur Detektion von VTEC. Aber gerade das unterschiedliche analytische Vorgehen, vor allem bei der kulturellen aber auch molekularbiologischen Detektion von VTEC macht es schwierig, die Ergebnisse unterschiedlicher Studien miteinander zu vergleichen.

Zur Ermittlung einer belastbaren Prävalenz ist zudem zu beachten, dass VTEC im Kot vor allem bei Rindern intermittierend und oftmals transient ausgeschieden werden, so dass sie nicht jederzeit nachgewiesen werden können (RENTER ET AL., 2001; BÜLTE, 2004A). Ähnliche Ausscheidungsmuster konnten beim Damhirsch für VTEC O157:H7 nachgewiesen werden (FISCHER ET AL., 2001). Geht man davon aus, dass VTEC auch bei Rehwild transient und intermittierend ausgeschieden wird, führt eine einmalige Probennahme zur Untersuchung zum Vorkommen von VTEC zu einer Unterschätzung der Prävalenz. Solche „cross-sectionalen“ Untersuchungen, die lediglich Punktmäße generieren, haben somit keine genaue Aussagekraft über die reale Prävalenz innerhalb der Rehpopulation in Hessen. Um einen umfassenden Überblick über die Prävalenz und Ökologie dieses Erregers für Hessen zu erlangen, wäre eine simultane Beprobung von angrenzenden Rinderherden, dem Wasser und anderen möglichen

VTEC Quellen der entsprechenden Regionen und der genetische Vergleich aller positiven VTEC-Stämme vorteilhaft gewesen.

Im Zusammenhang mit der Ermittlung der Prävalenz für das Vorkommen von VTEC in Hessen muss auch die Problematik der Stichprobe angesprochen werden. In der vorliegenden Studie handelt es sich bei den untersuchten Proben nicht um eine im statistischen Sinne zufällig ausgewählte Stichprobe. Allgemein sind die Kriterien einer statistischen Zufallsprobe bei einer Stichprobe von Wildtieren sowieso generell schwierig zu erhalten. Somit können die diskutierten Aspekte nur als Hinweis auf einen bestimmten Zusammenhang in der Gesamtpopulation verstanden werden. Grundsätzlich sind epidemiologische Untersuchungen an freilebenden Wildtieren nicht so systematisch und strukturiert durchführbar wie bei Haustierpopulationen (FRÖLICH, 2001). Im Rahmen der eigenen Untersuchung ist darauf hinzuweisen, dass aufgrund der vorwiegenden Probennahme in den Wintermonaten vor allen die männlichen adulten Tiere unter-, und die weiblichen Tiere aller Altersstufen überrepräsentiert waren. In den Sommermonaten hingegen wurden aufgrund des Abschussverbotes wesentlich weniger juvenile Rehe beprobt, so dass allein hierdurch eine Beeinflussung der Prävalenz vorliegen kann – die Kitze schieden in den eigenen Untersuchungen signifikant häufiger VTEC aus als die anderen Altersstufen. Aber nicht nur durch die eigene Auswahl, sondern auch durch die Auswahl der zu erlegenden Rehe durch die Jäger bzw. den entsprechenden Abschussvorgaben während einer Jagd, kommt es unter Umständen zu einer Selektion bestimmter Tiere. Im Zusammenhang mit der Auswahl der eigenen Proben ist zudem zu erwähnen, dass die Beprobungszahlen innerhalb jedes ausgewählten Forstamtes auf den Rehwildstrecken eines Jagdjahres bzw. mehrerer Jagdjahre beruhten und etwa 10 % der Rehe eines Jagdjahres je Forstamt ausmachen sollten. Aber allein die Zahlen solcher Jahresstrecken geben keinen Aufschluss über die tatsächliche Rehwildldichte in den entsprechenden Regionen. So verstehen Rehe sich je nach durchgeführter Jagdart, aber auch unterschiedlichen Witterungsbedingungen auf einer Jagd perfekt zu drücken und somit unerkannt die Jagd zu überdauern. Zudem werden sie umso „cleverer“, je häufiger gejagt wird (ANONYMOUS, 2012A). Dieses Verhalten des Reh's erschwert eine brauchbare Einschätzung der Rehwildbestände sowie eine Bestimmung der Wildldichte erheblich (ANONYMOUS, 2012A), so dass von der Anzahl erlegter Rehe eines Jagdjahres nicht auf die Rehwildldichte der einzelnen Regionen geschlossen werden kann. Somit sind die in der vorliegenden Arbeit ermittelte Anzahl an Proben für jedes Forstamt sowie die Probenentnahmen auf Jagden nicht repräsentativ für die Gesamtpopulation, und

Rückschlüsse aus den gewonnenen Erkenntnissen der untersuchten Stichproben sollten aufgrunddessen grundsätzlich relativiert werden (FRÖLICH, 2001).

Darüber hinaus ist es möglich, dass die Prävalenz in der vorliegenden Arbeit zusätzlich durch das Einfrieren der Kotproben bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ negativ beeinflusst wurde. Durch diesen Vorgang können VTEC subletal geschädigt oder gar abgetötet werden (MCDONOUGH ET AL., 2000; BEUTIN ET AL., 2010; EGGERT, 2011), so dass sie wesentlich schwerer oder gar nicht mehr anzuzüchten sind.

Dennoch kann festgehalten werden, dass die im Rahmen der eigenen Untersuchungen ermittelte Prävalenz aufgrund der Probennahme, der Probenanzahl und der untersuchten Probenmenge sowie ebenfalls der geographischen Verteilung der Proben trotz der genannten Schwachstellen als repräsentativ für das Bundesland Hessen angesehen werden kann.

5.1.2 Prävalenzdaten auf Ebene der Regierungsbezirke

Betrachtet man die Prävalenzen für VTEC auf Regierungsebene, so gibt es einen signifikanten Unterschied in den Prävalenzen zwischen den jeweiligen Regierungsbezirken Kassel (Nordhessen), Gießen (Mittelhessen) und Darmstadt (Süd Hessen). Die höchste Prävalenz für VTEC findet sich in Mittelhessen mit 27,18 %, gefolgt von Süd Hessen mit 21,15 % und einer vergleichsweise niedrigen Prävalenz in Nordhessen von 14,65 %. Auch die Ergebnisse der univariaten Varianzanalyse bestätigen, dass sich die Prävalenzen je nach Regierungsbezirk signifikant voneinander unterscheiden. Der Vorteil einer mehrfaktoriellen Varianzanalyse, welche im Rahmen der eigenen Untersuchungen zusätzlich durchgeführt wurde, gegenüber des Chi-Quadrat-Tests liegt in der Analyse der Interaktion der einfließenden Effekte sowie in der Reduktion des Versuchsfehlers. Somit bringen mehrfaktorielle Analysen präzisere Ergebnisse. Dieses bedeutet, dass die im Rahmen der Varianzanalyse ermittelten Prävalenzen die präziseren Prävalenzen darstellen. So liegt die geschätzte Prävalenz für Mittelhessen bei 26,07 %, für Süd Hessen bei 11,90 % und für Nordhessen bei 10,46 %. An diesen Ergebnissen ist zu erkennen, dass für den Regierungsbezirk Darmstadt die Prävalenz ohne Betrachtung aller einfließenden Faktoren überschätzt worden wäre. Der Grund hierfür ist u. a. sicherlich die im Vergleich zu den anderen beiden Regierungsbezirken relativ geringe Probenanzahl von nur insgesamt 52 Rehen sowie ein relativ hoher Anteil an juvenilen Rehen, die in diesem Regierungsbezirk beprobt wurden.

5.1.3 Prävalenzdaten auf Ebene der Landkreise und der Einfluss der Anzahl Tiere pro Hektar landwirtschaftliche Nutzfläche

Die Ergebnisse der Prävalenzen auf Landkreisebene und der Einfluss der Anzahl Tiere pro Hektar landwirtschaftliche Nutzfläche werden im Gesamten diskutiert, da eine unabhängige Betrachtung jedes einzelnen Ergebnisses als nicht sinnvoll erscheint.

Auf Ebene der Landkreise ergab sich ebenfalls ein signifikanter Unterschied in den jeweiligen Prävalenzen. Bevor diese Ergebnisse jedoch näher betrachtet werden sollen, muss auf das Vorkommen von VTEC in Abhängigkeit von der Anzahl Tiere pro Hektar landwirtschaftliche Nutzfläche eingegangen werden. Nur anhand der gemeinsamen Betrachtung und Kombination der Ergebnisse mit dem Hintergrund einer wechselseitigen Übertragung zwischen Reh und Hauswiederkäuern ist u. a. ein Rückschluss auf die möglichen Ursachen für die Prävalenzen zu ziehen. Allein anhand der Prävalenzdaten kann jedoch keine Aussage über die wechselseitige Übertragung getroffen werden. Erst die Kombination mit den molekularbiologischen Ergebnissen ermöglicht eine Interpretation der wechselseitigen Übertragung von VTEC zwischen Reh, Rind, Schaf und Ziege (s. Kap. 5.5).

Bei der einzelnen Betrachtung der Abhängigkeit der Anzahl Tiere pro Hektar landwirtschaftliche Nutzfläche für das Vorkommen von VTEC in den untersuchten Regionen mithilfe des Chi-Quadrat-Tests konnte kein signifikanter Einfluss gefunden werden. In Landkreisen, bei denen das Verhältnis $< 0,7$ war, lag die Prävalenz im Durchschnitt bei 22,27 %. Im Gegensatz hierzu lag die Prävalenz bei einem Verhältnis Gesamt-Tierzahl zur landwirtschaftlichen Fläche von $> 0,7$ durchschnittlich bei 14,79 %. Im Rahmen der Varianzanalyse hingegen erwies sich dieser Faktor als signifikant. Somit hat die Anzahl der Tiere pro Hektar landwirtschaftliche Nutzfläche einen Einfluss auf die Prävalenz für das Vorkommen von VTEC bei Rehwild. Dies kann als Hinweis auf eine wechselseitige Übertragung zwischen Reh und den Hauswiederkäuern gedeutet werden. Die geschätzte Prävalenz im Rahmen der Varianzanalyse beträgt für das Verhältnis $< 0,7$ 21,85 % und für das Verhältnis $> 0,7$ 10,10 %. Anhand dieses Ergebnisses kann davon ausgegangen werden, dass auch bei diesem Effekt durch den Chi-Quadrat die Prävalenz für das Verhältnis $> 0,7$ überschätzt wurde. Die Ursache liegt möglicher Weise darin begründet, dass die Probenanzahl für die jeweiligen Verhältnisse nicht gleichmäßig ist. So wurden 211 Rehe in Landkreisen beprobt, die ein Verhältnis $< 0,7$ für die Anzahl der Tiere pro Hektar landwirtschaftliche Nutzfläche aufwiesen, jedoch nur 142 Tiere in Landkreisen, bei denen ein Verhältnis von $> 0,7$ vorliegt. Eine weitere Ursache für die Überschätzung der Prävalenz könnte in der Verteilung der Altersstufen für die Verhältnisse $< 0,7$ bzw. $> 0,7$ liegen. Jedoch wurden

sowohl bei dem Verhältnis Gesamt-Tierzahl zur landwirtschaftlichen Fläche von $< 0,7$ als auch $> 0,7$ im Verhältnis die gleiche Anzahl an juvenilen Rehen beprobt; die Altersstufe mit der höchsten Prävalenz. Bei den beiden anderen Altersstufen „subadult“ und „adult“ hingegen waren die Verhältnisse für die Gesamt-Tierzahl zur landwirtschaftlichen Fläche von $< 0,7$ als auch $> 0,7$ verschoben. In den Landkreisen, in denen das Verhältnis Gesamt-Tierzahl zur landwirtschaftlichen Fläche $> 0,7$ ist, wurden im Gegensatz zu dem Verhältnis $< 0,7$ weniger subadulte, jedoch mehr adulte Rehe beprobt. Aufgrund dieser Datenlage scheint das Alter keinen großen Einfluss auf die Prävalenzen bei einem Verhältnis Gesamt-Tierzahl zur landwirtschaftlichen Fläche von $> 0,7$ bzw. $< 0,7$ zu haben.

Interessanterweise liegt die Prävalenz für VTEC höher, wenn das Verhältnis Tiere pro Hektar landwirtschaftliche Nutzfläche $< 0,7$ ist. Dies bedeutet, dass in den Landkreisen, in denen weniger Rinder, Schafe und Ziegen pro Hektar landwirtschaftliche Fläche gehalten werden, die Prävalenz für VTEC bei Rehwild höher liegt. Um in Kombination mit den molekularbiologischen Ergebnissen eine Aussage hinsichtlich einer wechselseitigen Übertragung von VTEC zwischen Rehwild und Hauswiederkäuern treffen zu können, muss dieser Sachverhalt näher beleuchtet werden.

Das vorliegende Ergebnis wäre somit ein Hinweis darauf, dass die Anzahl und damit auch die Anwesenheit der Hauswiederkäuer keinen direkten Einfluss auf die Ausscheidung von VTEC bei Rehwild hat. Nicht vergessen werden darf jedoch, dass eine Übertragung auch durch den ausgebrachten Kot zur Düngung der Felder stattfinden kann. Bei Betrachtung und Kombination der einzelnen Ergebnisse stellt sich dieser Zusammenhang jedoch wesentlich komplexer dar. In diesem Kontext muss erwähnt werden, dass laut Bruno Hespeler (ANONYMOUS, 2012A) Weideflächen von Rehwild gemieden werden. Aber nicht nur die Weideflächen, sondern auch die Wiesen an sich werden heutzutage viel weniger vom Rehwild genutzt. Die immer intensivere Nutzung hat sowohl die Artenvielfalt der Wiesenpflanzen als auch die Ruhephasen für das Reh gleichermaßen reduziert. Zudem wird der kaum noch nachwachsende Wiesenaufwuchs bis der Frost kommt gemäht und ist dadurch als Nahrungsgrundlage für das Reh verloren. Darüber hinaus gehen viele Wiesen frisch gegüllet in den Winter und stehen ebenfalls für die Rehe als Nahrungsgrundlage nicht mehr zur Verfügung (ANONYMOUS, 2012A). Diese Ausführungen von Bruno Hespeler geben gleichermaßen einen Hinweis darauf, dass Rehwild Flächen meidet, die extensiv von Hauswiederkäuern bzw. allgemein als Grünland genutzt werden. Als Grünland werden

landwirtschaftlich genutzte Flächen bezeichnet, auf denen Gras und krautige Pflanzen als Dauerkultur wachsen und die entweder beweidet oder durch Mähen beerntet werden.

Aber im Gegensatz zum Grünland nutzt das Reh interessanterweise aufgrund seiner Anpassungsfähigkeit landwirtschaftliche Flächen, die für den Ackerbau eingesetzt werden. Heutzutage unterscheidet man grundsätzlich zwischen dem Ökotypen „Waldreh“ und „Feldreh“. Während das Waldreh nach wie vor walddnahe Habitats besiedelt, lebt das Feldreh in der deckungsarmen offenen Agrarlandschaft und hat seine Ernährung überwiegend auf Feldfrüchte umgestellt (STUBBE, 2008). Somit äsen Rehe auf landwirtschaftlichen Nutzflächen, meiden aber scheinbar das für sie nicht mehr wertvolle Grünland. Besonders Raps gehört zu den Nutzpflanzen, die stark vom Reh verbissen werden. Diese Nutzpflanze spielt vor allem im Frühjahr eine große Rolle in der Ernährung der Rehe. Gerste wird ebenfalls gefressen, jedoch nur als junge Pflanze. Die kurzgrannigen Weizen- und Hafersorten stellen hingegen im Hochsommer eine bevorzugte Äsungspflanze dar (KURT, 2002). Die Pflanzen werden vom Reh vom Erdboden bis in eine Höhe von 120 Zentimeter bestä. Bevorzugt aufgenommen werden jedoch die Pflanzenteile, die etwa 75 Zentimeter über dem Boden stehen (ANDERSEN ET AL., 1998). In verschiedenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass sich auf den verschiedenen Pflanzenteilen, insbesondere auf Blättern, die gerne vom Rehwild aufgenommen werden, fest haftende Biofilme finden, in denen verschiedene Bakterienspezies miteinander kommunizieren und interagieren (MORRIS ET AL., 1997; FETT, 2000). Der für das Nahrungsverhalten des Rehwildes relevante Eintrag von Mikroorganismen auf Acker- und Grünlandflächen findet dabei während des Aufwuchses statt (THIEDE UND BECKMANN, 2004). Vor dem Hintergrund, dass laut BfR (2012) VTEC sogar in das Innere der Pflanzen eindringen und dort überleben können, ist, obwohl das Rehwild in seinem Nahrungsverhalten ein Konzentratsselektierer ist und somit weniger Gras aufnimmt, ein Kontakt mit VTEC während der Äsung durch verschiedene Arten möglich. All diese Sachverhalte über die Ökologie des Rehwildes unterstreichen vor dem Hintergrund einer wechselseitigen Übertragung das Ergebnis, dass die Prävalenz für VTEC höher ist, wenn weniger Rinder, Schafe und Ziegen pro Hektar landwirtschaftliche Fläche gehalten werden. Bei diesem Sachverhalt kann davon ausgegangen werden, dass die landwirtschaftliche Fläche hauptsächlich für den Ackerbau eingesetzt und zur Düngung dieser Flächen oftmals Gülle verwendet wird. Dieses Ergebnis unterstreicht, dass Rehwild landwirtschaftliche Flächen nutzt, die nicht bzw. selten als Grünland genutzt werden.

Zusätzlich zu dem erwähnten Effekt werden im Folgenden bei der Interpretation der Ergebnisse die Prävalenzen der jeweiligen Landkreise sowie auch das Verhältnis Grünland zur landwirtschaftlichen Fläche mitberücksichtigt. Hierdurch kann abgeschätzt werden, wieviel der restlichen Fläche unter Umständen für den Ackerbau eingesetzt wird und somit dem Reh als Nahrungsgrundlage dienen kann.

Für den Landkreis Groß-Gerau wurde eine Prävalenz von 17,39 % ermittelt. Das Verhältnis $< 0,7$ für die Anzahl der Tiere pro Hektar landwirtschaftliche Nutzfläche sowie die geringe Fläche an Grünland im Verhältnis zum Ackerland unterstreichen das Ergebnis der relativ hohen Prävalenz in diesem Landkreis. Ähnlich stellt sich die Situation in den Landkreisen Wetteraukreis, Gießen und Schwalm-Eder-Kreis dar. In Gießen wurde mit einer Prävalenz von 41,38% das häufigste Vorkommen von VTEC bei Rehwild in Hessen gefunden. Im Wetteraukreis sowie im Schwalm-Eder-Kreis konnten mit Prävalenzen von 24,14 % und 21,74 % ebenfalls relativ häufig Rehe als Ausscheider von VTEC nachgewiesen werden. In den Landkreisen Main-Kinzig-Kreis, Fulda und Waldeck-Frankenberg hingegen liegt das Verhältnis für die Anzahl der Tiere pro Hektar landwirtschaftliche Nutzfläche $> 0,7$. Somit ist aufgrund der statistischen Auswertung eine geringe Prävalenz in diesen Regionen zu erwarten gewesen. In den Landkreisen Main-Kinzig-Kreis sowie Fulda konnte sogar kein Reh als Ausscheider von VTEC identifiziert werden. Diese Tatsache, dass in beiden Landkreisen das Verhältnis Grünland zu Ackerland zugunsten des Grünlandes verschoben ist, unterstreicht das Ergebnis der Prävalenz vor dem Hintergrund einer wechselseitigen Infektion. Jedoch muss hier erwähnt werden, dass die Probenanzahl für beide Landkreise mit 12 bzw. 13 Rehen im Vergleich zu anderen sehr gering war. Somit könnte die Ursache für das Fehlen eines Nachweises von VTEC in der geringen Probenanzahl liegen. In Waldeck-Frankenberg konnte eine relativ niedrige Prävalenz von 11,63 % für VTEC gefunden werden. Von etwa 70.000 Hektar landwirtschaftlicher Fläche werden 30.000 ha als Grünland genutzt. Bei einem Großteil der Grünlandbewirtschaftung handelt es sich um Flächen, die ausschließlich zur Futtergewinnung genutzt werden. Laut ANONYMOUS (2012B) sind in vielen Lagen drei bis vier Schnitte pro Jahr möglich. Zudem wird etwa 35 % des Grünlandes extensiv mit geringem Viehbesatz benutzt (ANONYMOUS, 2012B). All dies sind Flächen, die das Rehwild eher meidet bzw. als Nahrungsgrundlage nicht nutzen kann, so dass eine geringe Prävalenz für VTEC bei Rehwild vor dem Hintergrund einer wechselseitigen Übertragung aufgrund der statistischen Auswertung zu erwarten war.

In der statistischen Auswertung wurden die beiden Landkreise Limburg-Weilburg und der Lahn-Dill-Kreis ($n = 27$) aufgrund zu geringer Probenanzahl des Landkreises Limburg-Weilburg ($n = 6$) zusammengefasst. Für diese Regionen konnte eine Prävalenz für VTEC bei Rehwild von 21,21 % ermittelt werden. Nach dem Verhältnis der Anzahl Tiere pro Hektar landwirtschaftliche Nutzfläche von $> 0,7$ wäre eine niedrigere Prävalenz für diese Landkreise zu erwarten gewesen. Bei der differenzierten Betrachtung der Tierzahlen für die jeweilige Nutztier-Spezies fällt jedoch auf, dass vor allem im Lahn-Dill-Kreis mit etwa 13.000 Schafen und ca. 1.900 Ziegen – die höchste Anzahl für Hessen – eine hohe Dichte dieser beiden Tierarten existiert. Diese werden prinzipiell entweder auf der Weide (Wanderschafhaltung, standortgebundene (stationäre) Hütehaltung, Koppelhaltung) oder im Stall gehalten (BRENNER ET AL., 2002; GANTER ET AL., 2012). Bei der Weidehaltung stehen sie im Gegensatz zu der Mehrzahl der Rinder meist auf Grünlandfläche bzw. beweiden landwirtschaftlich nicht mehr genutzte Flächen (BRENNER ET AL., 2002). Die Wanderschafhaltung ist durch den jahreszeitlichen Standortwechsel der Herde zwischen meist weit auseinander liegenden Weideplätzen gekennzeichnet. Dabei befinden sich die Vorsommer- und Sommerweiden in der Regel in Höhenlagen auf Grenzertragsböden und landwirtschaftlich nicht mehr genutzten Flächen (BRENNER ET AL., 2002). Grenzertragsstandorte stellen Flächen dar, die sich für die Nutzung durch Rinder oder andere Haustiere nicht eignen, aber für Schafe und Ziegen meist eine artgerechte und ausreichende Versorgung sicherstellen (GANTER ET AL., 2012). Die Herbst- und Winterweiden hingegen befinden sich in klimatisch günstigeren, wintermilderen Regionen, zu denen die Herden entsprechend getrieben werden (BRENNER ET AL., 2002). Gerade eine Wanderschafherde kann somit bei Ausscheidung von VTEC, diese großflächig verteilen, so dass auch andere Tierarten wie das Reh damit in Kontakt kommen können. Aber auch Schafe und Ziegen, die standortgebunden mit einem festen Herdensitz, oder auf umzäunten Weideflächen mit Stand- oder Umtriebsweide gehütet werden, können ebenfalls dazu beitragen, dass sich VTEC wechselseitig auf das Reh oder auf Hauswiederkäuer übertragen. Angaben zu den jeweiligen Haltungsformen der Schafe und Ziegen aus der Region liegen jedoch nicht vor.

Die eigenen molekularbiologischen Ergebnisse der isolierten VTEC-Stämme geben einen Hinweis darauf, dass Rehwild die Flächen, auf denen sich Schafe als auch Ziegen aufhalten bzw. aufgehalten haben, nicht meiden, da VTEC aus Rehwild und landwirtschaftlichen Nutztieren Gemeinsamkeiten aufweisen (s. Kap. 5.5). Somit kann das widersprüchliche Ergebnis der relativ hohen Prävalenz für diese beiden Landkreise, verbunden mit einem Verhältnis der Anzahl Tiere pro Hektar landwirtschaftliche Nutzfläche von $> 0,7$ mit einer

gemeinsamen Nutzung der offenen Landschaft von Reh, Schaf und Ziege sowie der hohen Tierzahl von Schaf und Ziege zusammenhängen.

Eine ähnliche Situation liegt für den Landkreis Marburg-Biedenkopf vor. In diesem Landkreis wurde mit 21,95 %, trotz einem Verhältnis von $> 0,7$ die dritthöchste Prävalenz für VTEC für das Bundesland Hessen nachgewiesen. Laut den Daten der Tierseuchenkasse wurden im Jahr 2011 etwa 17.500 Schafe – die höchste Anzahl in Hessen – und 1.200 Ziegen gehalten. Somit liegt in diesem Landkreis eine vergleichbare Situation wie in den Landkreisen Lahn-Dill und Limburg-Weilburg vor, wobei die Anzahl der gehaltenen Schafe noch wesentlich höher ist. Für diesen Landkreis ist zusätzlich bekannt, dass sich von den ca. 29.000 Rindern etwa 2.500 Tiere in Mutterkuhhaltung befinden. Bei dieser Haltung handelt es sich um eine extensive Form der Landbewirtschaftung (ANONYMOUS, 2012C). Im Landkreis Marburg-Biedenkopf ist die Mutterkuhhaltung als Alternative zur winterlichen Stallhaltung teilweise auch auf ganzjährige Außenhaltung ausgerichtet. Dabei werden die Rinder ähnlich wie Schafe unter anderem auch auf Grenzertragsstandorten gehalten (BIEWER, 2009). Obwohl Rehwild derart beweidete Fläche laut Literatur meidet, geben die Prävalenzdaten und die Gemeinsamkeiten der in den eigenen Untersuchungen isolierten VTEC-Stämme mit denen von landwirtschaftlichen Nutztieren einen Hinweis darauf, dass das Reh dennoch diese Flächen nutzt bzw. es durch Ausscheidungen zu einem Eintrag von VTEC in die umgebende Umwelt gekommen ist und somit auch eine wechselseitige Übertragung von VTEC denkbar ist (s. Kap. 5.5).

Eine komplett andere Situation stellt sich in den Landkreisen Kassel ($n = 29$) und Werra-Meißner-Kreis dar. Diese beiden Landkreise wurden ebenfalls für die statistische Auswertung aufgrund zu geringer Probenanzahl des Werra-Meißner-Kreises ($n = 9$) zusammengefasst. Für diese Regionen konnte eine Prävalenz für VTEC bei Rehwild von nur 10,53 % ermittelt werden. Nach dem Verhältnis der Anzahl Tiere pro Hektar landwirtschaftliche Nutzfläche von $< 0,7$ wäre jedoch eine höhere Prävalenz zu erwarten gewesen. Der Bericht zur Lage der Landwirtschaft im Werra-Meißner-Kreis aus dem Jahr 2010 (ANONYMOUS, 2010) zeigt jedoch auf, dass diese Region landwirtschaftlich benachteiligt ist. Besonders in Hessisch-Lichtenau sind die Standortbedingungen für die Landwirtschaft nicht günstig, so dass etwa 64 % der Fläche als Grünland genutzt wird. Wie bereits mehrfach erwähnt, meidet Rehwild solche Flächen bzw. kann sie als Nahrungsgrundlage prinzipiell aus den verschiedensten Gründen nicht nutzen. Somit kann das widersprüchliche Ergebnis der niedrigen Prävalenz für diese beiden Landkreise, verbunden mit einem Verhältnis der Anzahl Tiere pro Hektar

landwirtschaftliche Nutzfläche $< 0,7$, vor dem Hintergrund einer wechselseitigen Übertragung mit den ungünstigen landwirtschaftlichen Verhältnissen dieser Region zusammenhängen.

In anderen Studien konnte für VTEC O157 gezeigt werden, dass in Rinderherden identische Stämme über Hunderte von Kilometern vorkommen (RICE ET AL., 1999). Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung ist, dass VTEC O157 durch wandernde Wildtiere über weite Strecken verteilt worden sind (RICE ET AL., 2003). So konnte VTEC O157 bereits bei vielen Haus- und Wildtieren wie Rindern, Schafen, Ziegen, Pferden, Hunden, Hirschen, Vögeln, Wildkaninchen und Ratten isoliert werden (RICE ET AL., 1995; CHAPMAN ET AL., 1997; WALLACE ET AL., 1997; HANCOCK ET AL., 1998; CIZEK ET AL., 1999; SARGEANT ET AL., 1999; FISCHER ET AL., 2001; PRITCHARD ET AL., 2001; RENTER ET AL., 2001; GOLL, 2006). Allerdings haben sich die meisten Studien nur auf die Serotypen O157:H7/H⁻ fokussiert. Aufgrunddessen ist nicht allzu viel über das Vorkommen von VTEC non-O157 bei Haus- und Wildtieren bekannt (BEUTIN, 2012). Besonders Wildvögel und Nagetiere scheinen jedoch als Übertragungsvektoren eine größere Rolle zu spielen wie eine Untersuchung von MØLLER-NIELSEN ET AL. (2004) zeigt. So stimmten die VTEC-Stämme, die sowohl aus einem Star als auch aus einer norwegischen Ratte isoliert werden konnten, mit denjenigen aus einer nahegelegenen Rinderherde überein. Anhand dieser Untersuchungen wird deutlich, dass VTEC nicht nur durch abiotische Vektoren wie Nahrung und Wasser, sondern auch durch eine Vielzahl biotischer Vektoren übertragen werden kann (BÜLTE, 2002). Ebenso einen Hinweis auf eine wechselseitige Übertragung von VTEC zwischen Haus- und Wildwiederkäuern geben Studien, in denen vergleichbare Prävalenzen von VTEC bei Haus- und Wildwiederkäuern einer Region gefunden wurden (RICE ET AL., 1995; SARGEANT ET AL., 1999; FISCHER ET AL., 2001; RICE ET AL., 2003; GILBREATH ET AL., 2009).

5.2 Alters- und Geschlechtsverteilung

Die Ergebnisse der eigenen Untersuchungen zeigen, dass das Geschlecht für die Prävalenz von VTEC bei Rehwild nicht relevant ist. In der Literatur wird dieser Aspekt bei Wildwiederkäuern nur bei zwei Studien berücksichtigt (BARDIAU ET AL., 2010; EGGERT, 2011). In diesen Studien wurde neben Rot- auch Rehwild auf VTEC untersucht. In beiden Studien konnte wie in den eigenen Untersuchungen keine geschlechtsspezifische Prävalenz nachgewiesen werden. Untersuchungen bei Rindern zeigen ebenfalls keinen Einfluss des Geschlechts auf die Prävalenz für VTEC (GEUE ET AL., 2002; MØLLER-NIELSEN ET AL., 2002). Aufgrund dieser Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass das Geschlecht bei Rehwild für das Vorkommen von VTEC keine Bedeutung hat.

Für die drei Altersgruppen „juvenil“, „subadult“ und „adult“ hingegen konnte ein signifikanter Unterschied für die Ausscheidung von VTEC mit dem Kot ermittelt werden. So scheiden 29,84 % der juvenilen, 14,75 % der subadulten und nur 12,80 % der adulten Rehe VTEC mit dem Kot aus. Die Abhängigkeit der Prävalenz für VTEC von dem Alter der Tiere konnte im Rahmen der Varianzanalyse ebenfalls bestätigt werden. Die geschätzten Prävalenzen liegen jedoch für jede Altersstufe etwas niedriger. So wurde für juvenile Rehe eine geschätzte Prävalenz von 26 %, für subadulte Rehe von 11,53 % sowie für adulte Rehe von 10,85 % ermittelt. Somit wurden bei diesem Faktor die Prävalenzen mithilfe des Chi-Quadrat-Tests in geringem Maß überschätzt.

Bisher gibt es nur zwei Studien, die sich mit dem Vorkommen von VTEC bei Wildwiederkäuern in Abhängigkeit des Alters beschäftigt haben. Im Rahmen beider Untersuchungen konnte jedoch kein Einfluss des Alters auf die Prävalenzen für VTEC bei Reh- und Rotwild nachgewiesen werden (BARDIAU ET AL., 2010; EGGERT, 2011). In der Untersuchung von EGGERT ET AL. (2011) wurden insgesamt jedoch nur 30 Tiere pro Tierart untersucht, so dass der Grund der Abweichung von den eigenen Ergebnissen in der geringen Tierzahl sowie in den teilweise fehlende Altersangaben der Rehe zu sehen ist. Eine ähnliche Situation liegt bei der Studie aus Belgien vor, bei welcher 52 Rehe und 81 Rothirsche auf das Vorkommen von VTEC untersucht wurden (BARDIAU ET AL., 2010). Im Gegensatz zu den Wildwiederkäuern gibt es bei den Hauswiederkäuern einige Studien, die sich mit dem Aspekt Alter beschäftigt haben. All diese Untersuchungen zeigen, dass die Prävalenz von VTEC mit zunehmendem Alter sinkt (DÖPPER ET AL., 2006; CRISTANCHO ET AL., 2008; SHEKARFOROUSH ET AL., 2008, CHO ET AL., 2009).

In vielen Studien aus den unterschiedlichsten Ländern konnte zudem gezeigt werden, dass bei Milchkälbern eine sehr hohe Prävalenz von VTEC non-O157 vorliegt (COBBOLD UND DESMARCHELIER, 2000; SHAW ET AL., 2004; WIELER ET AL., 2007). Aufgrund der weiten Verbreitung von VTEC infizieren sich die Kälber bereits früh nach der Geburt, ein Zeitraum, in dem ein Großteil der Tiere über keine oder nur geringe Mengen vtx-spezifischer Antikörper verfügt (WIELER ET AL., 2007; FRÖHLICH ET AL., 2009). Hierdurch wird bei Kälbern bei einer frühen Infektion die Entwicklung einer VTEC-spezifischen zellulären Immunität verzögert, so dass gerade bei Kälbern bei einer Erstinfektion mit VTEC, das Verotoxin als mutmaßlicher Kolonisationsfaktor die Grundlage für die Entstehung persistierender VTEC-Infektionen älterer Rinder schafft (FLI, 2012). Ein weiterer interessanter Aspekt ist, dass sich die zur gleichen Zeit von Muttertieren und Kälbern isolierten VTEC-Stämme voneinander

unterscheiden. Laut einer Studie des Friedrich-Löffler-Instituts scheidet kein Kalb nach der Geburt den gleichen VTEC-Stamm aus wie seine Mutter (FLI, 2012). Somit findet die Infektion mit den entsprechenden VTEC-Stämmen nicht in erster Linie durch eine Übertragung zwischen Kalb und Muttertier statt (WIELER ET AL., 2007). Darüber hinaus konnte in Langzeitstudien gezeigt werden, dass sich das Spektrum der ausscheidenden VTEC-Stämme mit dem Alter der Tiere verändert (BESSER ET AL., 2001; SHAW ET AL., 2004).

In den eigenen Untersuchungen konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Prävalenz mit zunehmendem Alter der Rehe abnimmt. Somit scheiden auch beim Rehwild besonders die Kitze vermehrt VTEC-Stämme aus. Ob sich die VTEC-Stämme von der Ricke und ihren Kitzen unterscheiden, kann anhand der vorliegenden Ergebnisse nicht beurteilt werden, da die Verwandtschaftsverhältnisse der untersuchten Rehe nicht bekannt ist. Ebenso kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob sich das Spektrum der ausscheidenden VTEC-Stämme im Laufe des Lebens eines Rehs ändert, da die untersuchten Rehe nur einmal beprobt wurden. Zur Klärung dieser Fragen, müssten weitergehende Untersuchungen durchgeführt werden. Da es sich aber um freilebende Wildtiere handelt, die nicht unter Kontrolle des Menschen leben, wird es schwierig sein, diesen Fragestellungen nachzugehen (s. auch Kap. 5.1.1).

5.3 Der Einfluss des Probennahmjahres

Laut der statistischen Analyse mittels des Chi-Quadrat-Tests gab es in den eigenen Untersuchungen eine Abhängigkeit der Ausscheidung von VTEC hinsichtlich des Probennahmjahres. So konnte für das Jahr 2008 eine Prävalenz für VTEC von 23,44 % ermittelt werden. Im Jahr 2009 hingegen waren nur noch 13,19 % der Rehe positiv für VTEC. Die Abhängigkeit der Prävalenz vom Probennahmjahr konnte im Rahmen der univariaten Varianzanalyse jedoch nicht bestätigt werden. Somit ist die Ursache für den Unterschied in den Prävalenzen der beiden Probennahmjahre nicht in den Untersuchungsjahren an sich zu suchen. Stattdessen haben andere Faktoren wie u. a. die Probenanzahl und die Verteilung der Altersstufen die Prävalenzen beeinflusst. So wurden im Jahr 2008 209 Rehe und im Jahr 2009 nur 144 Tiere auf VTEC untersucht. Ferner wurden im Jahr 2008 wesentlich mehr juvenile Tiere ($n = 77$) als im Jahr 2009 ($n = 47$) analysiert. Aufgrund der in den eigenen Untersuchungen gefundenen Abhängigkeit der Prävalenz vom Alter der Tiere ist die höhere Prävalenz des Jahres 2008 auf die vermehrte Untersuchung von juvenilen Rehen zurückzuführen. Im Gegensatz zu dem Jahr 2009, in welchen nur 11 positive Kitze identifiziert wurden, konnten im Jahr 2008 26 juvenile Rehe als Ausscheider von VTEC nachgewiesen werden.

In der Literatur konnte keine Studie gefunden werden, die sich mit diesem Aspekt bei Wildwiederkäuern beschäftigt. Hingegen konnten in einer über mehrere Jahre andauernden Longitudinalstudie in Milchviehbetrieben in den Niederlanden, Unterschiede in den Prävalenzen für das Vorkommen von VTEC O157 für die einzelnen Untersuchungsjahre detektiert werden. Aber ebenfalls wie in der vorliegenden Untersuchung ging diese Arbeitsgruppe auch davon aus, dass die Ursache dieses Effektes nicht in den Untersuchungsjahren an sich zu suchen ist. Stattdessen sehen sie die Ursache für die unterschiedlichen Prävalenzen in der Änderung der Labormethoden während der Studie – im letzten Untersuchungsjahr wurde zusätzlich auf *E. coli* O157 untersucht (SCHOUTEN ET AL., 2004).

Die eigenen Untersuchungsergebnisse sowie die Tatsache, dass in der Literatur der Einfluss des Probennahmejahres keine Relevanz findet, unterstreichen, dass sich dieser Faktor prinzipiell nicht auf das Vorkommen von VTEC auswirkt.

5.4 Der Einfluss der Jahreszeit

Für das Vorkommen von VTEC bei Rehwild in Hessen konnte kein signifikanter Einfluss von der Jahreszeit festgestellt werden. In diesem Zusammenhang muss jedoch erwähnt werden, dass die Probennahme einerseits von der Kooperation der Forstämter, den Jahresstrecken und andererseits von der Jagdmethode abhängig war. So wurde aufgrund logistischer Hintergründe die Mehrzahl der Proben in den Wintermonaten auf sogenannten Bewegungsjagden gesammelt. In diesen Monaten wird Rehwild in den staatlichen Forstämtern im Gegensatz zu den Sommermonaten – hier finden in der Mehrzahl Ansitzjagden statt - hauptsächlich im Rahmen von Gesellschaftsjagden erlegt. Im Gegensatz zu den Sommermonaten konnten im Winter je nach Größe der Jagdgesellschaft, der Größe des Revierbezirkes sowie der vorhandenen Rehpopulation bis zu 22 Rehe pro Jagd und Jagdtag beprobt werden. Da es durch das Aufbrechen und die Entnahme des Kots zu Kontaminationen bzw. Kreuzkontaminationen kommen konnte und diese ausgeschlossen bzw. weitestgehend vermieden werden sollten, wurden die Proben eigenständig entnommen. Denn gerade die sachgerechte Entnahme sowie auch Kühlung der Proben haben einen wesentlichen Einfluss auf die Qualität der Proben. Lediglich drei Proben wurden selbstständig durch Jäger entnommen. Zusätzlich wurde das Aufbrechen entweder selbstständig durchgeführt oder die Jägerschaft in der für die Probennahme notwendigen Methode des Aufbrechens angeleitet. Diese Vorgehensweise war in den Sommermonaten aufgrund vieler Einzelabschüsse und den damit verbundenen weiten und häufigen

Anfahrtsstrecken in der Mehrheit logistisch nicht möglich. Somit liegt die Anzahl an erlegten Rehen in den Sommermonaten mit 25 Rehen deutlich unter den Wintermonaten, in denen 328 Rehe beprobt werden konnten. Betrachtet man jedoch die saisonale Verteilung VTEC-positiver und negativer Proben, so ist das Verhältnis positiver zu negativer Rehe für die Einteilung Sommer (16 %) und Winter (19,51 %) vergleichbar. Diese Tatsache wiederum erklärt, warum in den eigenen Untersuchungen im Gegensatz zu einigen wenigen Studien kein Effekt der Jahreszeit gefunden werden konnte.

Studien über den Einfluss der Jahreszeit für das Vorkommen von VTEC bei Wildwiederkäuern liegen nur vereinzelt vor. Zudem existieren bisher keine Studien für die Saisonalität von VTEC non-O157 für Wildwiederkäuer. Dennoch wurde abweichend von in Europa und den USA durchgeführten Longitudinalstudien bei Rindern für VTEC O157:H7 keine Prävalenzzunahme in den Sommermonaten beobachtet (SARGEANT ET AL., 1999; CONEDERA ET AL., 2007; RUGBJERG ET AL., 2003; DUNN ET AL., 2004). Stattdessen konnten SARGEANT ET AL. (1999) in ihren Untersuchungen zeigen, dass Damwild mit höherer Wahrscheinlichkeit im Herbst und im Winter mit *E. coli* O157:H7 besiedelt wird. Auch DUNN ET AL. (2004) konnten in den Wintermonaten bei Damwild ein Tier detektieren, welches O157:H7 ausschied. Jedoch ist aufgrund der niedrigen Prävalenzen und der damit verbundenen niedrigen positiven Tierzahlen in beiden Studien kein saisonaler Trend in der Ausscheidung von VTEC O157 zu erkennen.

Bei Betrachtung der eigenen Ergebnisse sowie auch der Ergebnisse und der Vorgehensweise anderer Studien zur Ermittlung einer saisonalen Abhängigkeit bei der Ausscheidung von VTEC bei Wildwiederkäuern wird klar, dass sich dieser Parameter in seiner Untersuchung sehr komplex gestaltet. Prinzipiell wäre zur Klärung der Frage, ob bei Rehwild die Ausscheidung von VTEC von der Jahreszeit abhängig ist, eine kontinuierliche und gleichmäßige Probennahme über den gesamten Jahresverlauf notwendig. Diese Vorgehensweise ist im Gegensatz zur Probennahme bei unseren Haustieren jedoch aus den verschiedensten Gründen nur schwer realisierbar. So ist eine wiederholte Probenentnahme bei freilebenden Wildtieren oftmals gar nicht durchführbar. Zwar lässt sich dieses Problem durch den Einsatz von Telemetrie- und stressarmen Fangmethoden lösen, ist aber wiederum mit extrem hohen logistischen Aufwand und zusätzlichen Kosten verbunden. Zudem wäre der Einsatz dieser Methoden für die vorliegende Studie mit dem Hintergrund der Ermittlung der Prävalenz von VTEC für das Bundesland Hessen aufgrund der hohen Probenzahl ($n = 350\text{--}400$) nur schwer realisierbar gewesen.

Abschließend bleibt festzuhalten, dass aufgrund des Studiendesigns keine konkrete Aussage über eine saisonale Abhängigkeit für das Vorkommen von VTEC bei Rehwild in Hessen getroffen werden kann. Zur Klärung dieser Frage sind weitergehende und vor allem logistisch sehr umfangreiche und kostenintensive Untersuchungen notwendig.

5.5 Charakterisierung der VTEC-Isolate

5.5.1 Biochemische Eigenschaften

Die Mehrheit der VTEC-Isolate war sowohl Sorbit- (95 %) als auch β -D-Glucuronidase- (97,5 %) und Indol-positiv (98,7 %). Ähnliche Ergebnisse konnte EGGERT (2011) bei VTEC-Isolaten von Reh- und Rotwild erzielen. Im Gegensatz zu den eigenen Untersuchungen besaßen in dieser Studie jedoch alle VTEC-Isolate die Fähigkeit, Sorbit zu fermentieren und zeigten zudem alle eine positive Indolreaktion. Hinsichtlich der β -D-Glucuronidase-Aktivität hingegen zeigten entgegen den eigenen Ergebnissen die VTEC-Stämme von EGGERT (2011) mit 20 % wesentlich häufiger keine Fluoreszenz unter UV-Licht. Darüber hinaus fanden RATNAM ET AL. (1988) bei humanen non-O157 VTEC-Stämmen im Vergleich zu den eigenen Untersuchungen sogar fast deckungsgleiche Ergebnisse. In ihren Untersuchungen waren ebenfalls sowohl 95 % der Isolate Sorbit- als auch 96 % der Isolate β -D-Glucuronidase- und 96-99 % der Isolate Indol-positiv. Auch ISHII ET AL. (2007) fanden in ihren Untersuchungen mit 83 % Sorbit- und 100 % β -D-Glucuronidase-positiven VTEC-Stämmen zu den eigenen Untersuchungen vergleichbare Ergebnisse. DJORDJEVIC ET AL. (2001) konnten in Übereinstimmung mit der etwas niedrigeren Nachweisrate von ISHII ET AL. (2007) bei Schafen ebenfalls nur bei etwa 80 % der VTEC-Isolate die Fähigkeit, Sorbit zu fermentieren, nachweisen. Die in den eigenen Untersuchungen gefundene Anzahl Indol-negativer *E. coli*-Isolate (1,3 %) liegt im Bereich der in der Literatur beschriebenen Werte. EGGERT (2011) konnte sogar bei keinem der VTEC-Stämme bei Reh- und Rotwild Indol-negative Isolate nachweisen. Hingegen fanden BÜLTE UND REUTER (1989) bei etwa 3 % der untersuchten Stämme aus Lebensmitteln Indol-negative Reaktionen.

Die eigenen biochemischen Ergebnisse sowie der Nachweis von ausnahmslos non-O157 VTEC-Stämmen untermauern somit die bisherigen Erkenntnisse, dass die Eigenschaften Sorbit- und β -D-Glucuronidase-negativ, ein Charakteristikum der meisten O157 VTEC-Stämme, bei den non-O157 VTEC-Stämmen nicht weit verbreitet sind (PATON UND PATON, 1998).

5.5.2 Virulenzgenprofile

In den eigenen Untersuchungen dominierte in Übereinstimmung mit bisherigen Studien (ASAKURA ET AL., 1998; FUKUYAMA ET AL., 1999; LEHMANN ET AL., 2006; SÁNCHEZ ET AL., 2009; BARDIAU ET AL., 2010; EGGERT, 2011; KISTLER ET AL., 2011; MORA ET AL., 2012) unter den vorliegenden 79 Isolaten das *vtx* 2-Gen (73,4 %). Das *vtx* 1-Gen hingegen wurde nur bei 24,1 % der Isolate nachgewiesen, und lediglich ein Isolat (1,27 %) war sowohl *vtx* 1- als auch *vtx* 2-positiv. LEHMANN ET AL. (2006) konnten bei Rot-, Reh- und Damwild mit einem Nachweis für *vtx* 2-Bildner von ca. 71 % ein vergleichbares Ergebnis erzielen. In der gleichen Studie wurden im Gegensatz zu den eigenen Erhebungen das *vtx* 1 mit etwa 12 % etwas seltener und die Genkombination *vtx* 1 und *vtx* 2 mit ca. 18 % um einiges häufiger bei den untersuchten Wildwiederkäuern detektiert. Ähnliche Ergebnisse erzielten auch MORA ET AL. (2012) bei Rehwild. Jedoch wurden im Gegensatz zu den eigenen Untersuchungen mit etwa 54 % etwas weniger *vtx* 2-Bildner, jedoch mit etwa 34 % wesentlich häufiger sogenannte Doppelbildner (*vtx* 1 und *vtx* 2) detektiert. EGGERT (2011) hingegen konnten bei Rot- und Rehwild mit ca. 93 % bedeutend mehr *vtx* 2-Bildner nachweisen. Mit ca. 7 % wurden vergleichbar zu den eigenen Ergebnissen nur wenige Rehe detektiert, die Stämme ausschieden, die sowohl das *vtx* 1- als auch das *vtx* 2-Gen in sich trugen. Dahingegen konnten in Japan bei Wildwiederkäuern im Rahmen von zwei Studien unterschiedliche Resultate hinsichtlich des Vorkommens von *vtx* 1 und *vtx* 2-positiven Stämmen gefunden werden. Im Gegensatz zu ASAKURA ET AL. (1998), die nur *vtx* 2-positive Stämme isolierten, konnte FUKUYAMA ET AL. (1999) das *vtx* 1-Gen mit 47,6 % wesentlich häufiger als das *vtx* 2-Gen (23,8 %) bei Isolaten aus Kot der Wildwiederkäuer nachweisen. Darüber hinaus identifizierten die Autoren bei 28,6 % der Isolate sowohl das *vtx* 1- als auch das *vtx* 2-Gen.

Die in den eigenen Erhebungen gewonnenen VTEC-Isolate wurden im Rahmen der molekularbiologischen Untersuchungen sowie der Serotypisierung weitergehend differenziert. Dabei kam unter den 79 Isolaten der Subtyp VT 2b mit etwa 38 % am häufigsten vor. Bei einem dieser Isolate konnte in Kombination sowohl das *vtx* 1c- als auch das *vtx* 2b-Gen nachgewiesen werden. Vergleichbare Ergebnisse konnten besonders aus dem deutschsprachigen Raum auch im Rahmen von anderen Studien gewonnen werden (MIKO ET AL., 2009; EGGERT, 2011; MARTIN UND BEUTIN, 2011; HOFER ET AL., 2012; MORA ET AL., 2012), die entweder den Kot der Tiere oder das Fleisch bzw. die aus den Tieren produzierten Lebensmittel untersuchten. Dieses verdeutlicht die große Präsenz dieses Subtyps unter der Wildwiederkäuerpopulation vor allem im deutschsprachigen Raum. Darüber hinaus kommen sowohl die beiden Gene *vtx* 1c und *vtx* 2b als auch ihre Kombination besonders häufig bei

VTEC-Stämmen vor, die bei Schafen, Ziegen sowie Wildwiederkäuerarten gefunden wurden (KOCH ET AL., 2001; BRETT ET AL., 2003; ZWEIFEL ET AL., 2004; ISHII ET AL., 2007; VU-KHAC UND CORNICK, 2008; MARTIN UND BEUTIN, 2011; HOFER ET AL., 2012). Nach derzeitigem Wissensstand ist das *vtx* 2b jedoch in seltenen Fällen mit Erkrankungen des Menschen assoziiert. Stattdessen findet man es wesentlich häufiger bei VTEC von klinisch unauffälligen Personen (STEPHAN UND HÖLZLE, 2000). Hingegen berichten BUVENS ET AL. (2012), dass sie im Rahmen ihrer Studie von Patienten mit blutigem Durchfall und/oder HUS VTEC-Stämme mit den Subtypen VT 1 c und VT 2b isolieren konnten. Hierbei handelt es sich aber um den einzigen bisher berichteten Fall.

Der Subtyp VT 2g war mit 30,4 % der zweithäufigste Toxintyp, der bei den Isolaten der Rehe detektiert wurde. Interessanterweise konnte dieser Subtyp bisher außer in den eigenen Untersuchungen nur noch im Rahmen von zwei weiteren Studien bei Reh- und Rotwild nachgewiesen werden (HOFER ET AL., 2012; MORA ET AL., 2012). Jedoch wurde in beiden Studien das VT 2g mit etwa 3 % (MORA ET AL., 2012) bzw. etwa 15 % (HOFER ET AL., 2012) wesentlich seltener als in der eigenen Studie isoliert. Ursprünglich wurde dieser Subtyp aus dem Kot eines gesunden Rindes isoliert und ist auch hauptsächlich mit dieser Tierart assoziiert (BEUTIN, 2007; MORA ET AL., 2012). Darüber hinaus wird in einigen Studien auch über das Vorkommen von *vtx* 2g-positiven *E. coli*-Stämmen in Hirschen, Lebensmitteln sowie im Ab- oder Oberflächenwasser aus den verschiedensten Regionen berichtet (ASAKURA ET AL., 2001; BEUTIN ET AL., 2007; GARCIA-ALJARO ET AL., 2005; GARCIA-ALJARO ET AL., 2006; KRÜGER ET AL., 2007; SLANEC ET AL., 2009; STEPHAN ET AL., 2008; VU-KHAC AND CORNICK, 2008). Beim Menschen scheint dieser Subtyp hingegen keine größere Rolle zu spielen. Sowohl PERSSON ET AL. (2007) als auch PRAGER ET AL. (2011) fanden in ihren Untersuchungen in humanen VTEC-Isolaten niedrige Inzidenzen für das *vtx* 2g-Gen. Derzeit sind jedoch keine Daten verfügbar, die eine Aussage über die Pathogenität von *vtx* 2g-positiven Stämmen beim Menschen zulassen (PRAGER ET AL., 2011). Im Gegensatz zu den eigenen Untersuchungen wurde bisher bei *vtx* 2g-positiven Stämmen weder das *eae*- noch das Enterohämolysin-Gen, welche mit humanen pathogenen VTEC-Stämmen assoziiert sind, nachgewiesen (GARCIA-ALJARO ET AL., 2005; PRAGER ET AL., 2011). In den eigenen Untersuchungen hingegen konnte bei 9 von 24 Isolat, bei denen das *vtx* 2g nachgewiesen wurde, ebenfalls das Virulenzgen Enterohämolysin detektiert werden. Somit wurde in der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal die Kombination dieser beiden Virulenzgene bei einem *vtx* 2g-positiven VTEC-Stamm gefunden.

Im Rahmen der eigenen Untersuchungen wurden alle *vtx* 2 klassisch-positiven Stämme auf das Vorhandensein des *vtx* 2d_{activatable}-Gens überprüft. Bei der Auswertung der Ergebnisse erwiesen sich alle Isolate, bei denen in den eigenen Untersuchungen das Gen für die Verotoxin-Subtypen *vtx* 2 klassisch bzw. in den Referenzzentren das *vtx* 2g nachgewiesen werden konnte, als positiv für das *vtx* 2d_{activatable}-Gen. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde eine Analyse der Sequenzunterschiede zwischen den Verotoxin-Subtypen VT 2d_{activatable} und VT 2g sowie der eingesetzten Primersysteme zur Detektion der Subtypen in einem Alignment durchgeführt. Im Rahmen der Analyse wurde festgestellt, dass mithilfe der verwendeten Primersysteme keine eindeutige Differenzierung der Verotoxin-Subtypen erfolgen konnte. Aufgründessen wurde, um eine Aussage über das Vorliegen von *vtx* 2d_{activatable}-positiven Stämmen treffen zu können, mithilfe des *vtx* 2d_{activatable}-Primersystems Sequenzen generiert, die anschließend extern sequenziert wurden. Bei der Auswertung der Sequenzen konnten jedoch alle Sequenzen sowohl in ihrer Nukleotidsequenz als auch in ihrer Aminosäuresequenz nicht dem Subtypen VT 2d_{activatable} zugeordnet werden. Darüber hinaus wurde bei der Auswertung der durch die *vtx* 2d_{activatable}-PCR generierten Sequenzen festgestellt, dass alle in der vorliegenden Arbeit eindeutig dem Subtypen VT 2g zuzuordnen sind und zusätzlich den aktivierbaren Typ besitzen, obwohl sie nicht dem Subtypen VT 2d_{activatable} zuzuordnen sind. Laut SCHEUTZ ET AL. (2012) ist jedoch nicht nur der aktivierbare Teil der Subunit A für die aktivierbaren Eigenschaften des Toxins verantwortlich, sondern scheint die Kombination dieses aktivierbaren Teils mit dem Motiv END der Subunit B an Position 15-17 ausschlaggebend für die Aktivierung zu sein. Alle *vtx* 2g-Isolate haben an dieser Position jedoch ein anderes Motiv als die *vtx* 2d_{activatable}-Sequenz und dürften somit nicht durch den intestinalen Mucus in seiner biologischen Aktivität aktivierbar sein (LEUNG ET AL., 2003).

Bei insgesamt sieben Isolaten konnte im Rahmen der Sero- und Subtypisierung durch die Referenzzentren das Verotoxin nicht mehr bzw. nicht nachgewiesen werden. In den eigenen molekularbiologischen Untersuchungen konnten bei fünf der sieben Isolate das *vtx* 2d- und bei einem weiteren Isolat das *vtx* 1-Gen nachgewiesen werden. Der Kot eines weiteren Tieres war zwar im molekularbiologischen Screening positiv, konnte jedoch sowohl im Rahmen der eigenen Untersuchungen als auch im Rahmen der Sero- und Subtypisierung nicht weitergehend differenziert werden. Die Ursache für diese Ergebnisse kann ein Verlust des Verotoxins während der Subkultivierung sein. Solch ein Verlust des Verotoxin-Gens wurde bereits in einer Reihe von Publikationen beschrieben (KARCH ET AL., 1992; FENG ET AL., 2001; MELLMANN ET AL., 2008; SLANEC ET AL., 2009). In einer Studie von KARCH ET AL. (1992)

verloren durch die Subkultivierung 15 von 45 Stämmen ihr *vtx*-Gen. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch JORIS ET AL. (2011). Diese konnten sogar demonstrieren, dass der Verlust des *vtx*-Gens bereits nach dem ersten Subkultivierungsschritt erfolgen, und somit zu einer Unterschätzung VTEC-positiver Proben führen kann. Des Weiteren trat in ihrer Studie der Verlust des Verotoxins wesentlich häufiger bei VTEC non-O157 als bei VTEC O157 auf. Aufgrunddessen wurde in den eigenen Untersuchungen eine Kotprobe eines Rehs als positiv bewertet und in der Auswertung mitberücksichtigt, sofern auch nur das molekularbiologische Screening positiv war, und der Stamm als *E. coli* identifiziert werden konnte. FENG ET AL. (2001) konnten in ihren Untersuchungen zeigen, dass ein *E. coli* O157:H7-Stamm zwei unterschiedliche Morphologien auf einem Selektivmedium ausbilden kann. Eine Stammform hatte dabei sein *vtx*-Gen verloren. Solche Stämme können, wie in den eigenen Untersuchungen, durch den Verlust des *vtx*-Gens zu Problemen in der Diagnostik führen, behalten aber dennoch alle anderen Virulenzgene und sind darüber hinaus in der Lage, durch die Infektion mit temperenten Bakteriophagen das *vtx*-Gen wiederzuerlangen (MELLMANN ET AL., 2008). Ähnlich wie in der Untersuchung von FENG ET AL. (2001) konnte bei fünf der sieben Isolate parallel jeweils eine weitere morphologisch unterschiedliche Stammform detektiert werden. Im Gegensatz zu FENG ET AL. (2001) wiesen die morphologisch unterschiedlichen Isolate jedoch verschiedenartige Serotypen auf, so dass man davon ausgehen muss, dass nicht der Stamm an sich sich dissoziiert hat, sondern tatsächlich zwei unterschiedliche Stämme vorliegen.

Keiner der isolierten VTEC-Stämme trug die Gene für *vtx* 2a, *vtx* 2c, *vtx* 2d_{activatable}, *vtx* 2e und *vtx* 2f in sich.

Der Subtyp VT 1c kam bei 10 der 79 Isolate vor. Dabei lag dieser Subtyp entweder alleine ($n = 1$), in Kombination mit dem *vtx* 1a-, gepaart mit dem Enterohämolysin- ($n = 4$) bzw. dem *vtx* 2b- ($n = 1$) oder dem Enterohämolysin-Gen ($n = 4$) vor. Auch in anderen Studien konnte der Subtyp VT 1c bei Wildwiederkäuern – besonders beim Rehwild – sowohl im Kot als auch im Fleisch sowie aus den von Wildwiederkäuern gewonnenen Lebensmitteln bereits vermehrt gefunden werden (LEOTTA ET AL., 2006; ISHII ET AL., 2007; EGGERT, 2011; MARTIN UND BEUTIN, 2011; HOFER ET AL., 2012; MORA ET AL., 2012). Aber nicht nur unter den cerviden Isolaten ist dieser Subtyp häufig zu finden. Relativ häufig ist er auch bei ovinen und caprinen Isolaten anzutreffen (ISHII ET AL., 2007; HORCAJO ET AL., 2010; MARTIN UND BEUTIN, 2011). Aus bovinen Isolaten hingegen wird der Subtyp nur selten gewonnen (ZHANG ET AL., 2002; BRETT ET AL., 2003; FRIEDRICH ET AL., 2003; HORCAJO ET AL., 2010). *Vtx* 1c-positive Stämme

werden hauptsächlich von asymptomatischen Ausscheidern und Patienten mit unkomplizierter Diarrhö isoliert, nicht jedoch von HUS-Patienten (KOCH ET AL., 2001, ZHANG ET AL., 2002; BRETT ET AL., 2003; FRIEDRICH ET AL., 2003). Bei vier der *vtx* 1c-positiven Isolate wurde zusätzlich das *vtx* 1a- sowie das Enterohämolysin-Gen nachgewiesen. Im Gegensatz zu alleinig *vtx* 1c-positiven Stämmen, wurden VTEC-Stämme, die den Subtypen VT 1a besitzen, bereits mit schweren Krankheitsverläufen wie blutigem Durchfall und HUS in Verbindung gebracht (FRIEDRICH ET AL., 2002; BUVENS ET AL., 2012). Da diese vier Isolate ebenfalls das *e-hly* in sich tragen, kann angenommen werden, dass sie vermutlich eine höhere Humanpathogenität besitzen.

Eine weitere Besonderheit von *vtx* 1c-positiven Stämmen ist, dass sie ebenfalls mit dem Virulenzgen Enterohämolysin als auch dem Autoagglutinations-Adhäsins-Gen (*saa*) sowie mit bestimmten Serotypen assoziiert sind (ZWEIFEL ET AL., 2004). Unter den 10 isolierten *vtx* 1c-positiven Stämmen waren acht Isolate positiv für das Enterhämolysin. Somit bestätigen sich in den eigenen Untersuchungen die Angaben aus der Literatur. Eine Aussage hinsichtlich des *saa*-Gens kann nicht getroffen werden, da daraufhin nicht untersucht wurde.

Der Subtyp VT 1d, der bei 11,4 % der Isolate nachgewiesen wurde, wird ähnlich wie der Subtyp VT 1c auch aus ovinen, bovinen, caprinen wie auch cerviden VTEC-Stämmen isoliert (ISHII ET AL., 2007). Bisher ist dieser Subtyp jedoch noch nicht beim Menschen nachgewiesen worden. Daher ist seine klinische Bedeutung noch unklar. Da dieser Subtyp jedoch schon in Nahrungsmitteln nachgewiesen werden konnte, ist es denkbar, dass der Mensch entlang der Lebensmittelkette mit diesem VTEC-Subtyp in Berührung kommen kann (BEUTIN ET AL., 2007).

Die in der vorliegenden Arbeit ermittelte Prävalenz für das Virulenzgen *e-hly* lag bei 34,2 %. Ein vergleichbares Ergebnis ermittelte LEHMANN ET AL. (2006) bei der Untersuchung von Rot-, Reh- und Damwild mit 35 %. Die Untersuchungen von BEUTIN UND MIKO (2009), EGGERT (2011) und HOFER ET AL. (2012) zeigten hingegen mit über 50 %, 44 % bzw. 46% höhere Prävalenzen. VTEC-Stämme mit der Kombination der Virulenzgene *vtx*, *eae* und *e-hly* haben nach bisherigem Wissensstand die höchste Virulenz (BOCKEMÜHL ET AL., 1998; FRIEDRICH ET AL., 2002). Obwohl *eae*- und *e-hly*-Gene bereits in Stämmen von Wild beschrieben wurden (ASAKURA ET AL., 1998; BEUTIN UND MIKO, 2009; MIKO ET AL., 2009; HOFER ET AL., 2012), konnte aus dem Rehkot nur ein *eae*- und *e-hly*-positives Isolat nachgewiesen werden. Dieses Isolat hatte jedoch durch die Subkultivierung sein Verotoxin verloren, so dass dieses im Rahmen der Sero- und Subtypisierung der Referenzzentren nicht

weitergehend untersucht werden konnte, und keine konkrete Aussage über den Subtypen getroffen werden kann. Zwar war es in den eigenen Untersuchungen *vtx* 1 positiv, aber um die Virulenz abschätzen zu können, wäre es wichtig zu wissen, ob es sich um den Subtypen *vtx* 1a, *vtx* 1c oder *vtx* 1d handelt.

Zum Schluss bleibt festzuhalten, dass der Subtyp VT 2b, gefolgt von dem Subtypen VT 2g bei den Isolaten von Rehwild in Hessen zu dominieren scheint. Bei solchen Stämmen handelt es sich jedoch um Stammformen mit geringer Virulenz. Mit den vier Isolaten, die die Virulenzgene *vtx* 1a, *vtx* 1c und *e-hly* in sich tragen, sowie dem *vtx* 1, *eae*- und *e-hly*-positiven Isolat konnten hingegen Stämme detektiert werden, die vermutlich eine höhere Humanpathogenität aufweisen. Hinsichtlich des Virulenzpotentials eines VTEC muss jedoch erwähnt werden, dass dieses erst durch eine möglichst umfassende Charakterisierung des jeweiligen Stammes möglich wird (Toxinsubtyp, andere Virulenzfaktoren wie *eae*, *e-hly*, Serovar) und die Fähigkeit, Krankheitserscheinungen hervorzurufen, von der Expression der unterschiedlichen Virulenzgene abhängig ist (BEUTIN, 2012).

5.5.3 Serovare

Die 79 Isolate ließen sich 27 verschiedenen Serovaren zuordnen. Unter diesen befanden sich sechs Serotypen (O1:H7, O103:H7, O110:HNT, O128:H8, O141:H10, ONT:H7), die nach eigenem Kenntnisstand bisher bei Wildwiederkäuern noch nicht nachgewiesen wurden. Die in der Arbeit detektierten Gruppen O21, O146, O128 und O174 sowie H21, H28, H2 und H8 konnten in mehreren Studien bei Wildtieren sowie auch aus den von diesen produzierten Lebensmitteln nachgewiesen werden (LEHMANN ET AL., 2006; BEUTIN UND MIKO, 2009; MIKO ET AL., 2009; MARTIN UND BEUTIN, 2011; MORA ET AL., 2012). Mit den Serovaren ONT:H-, O117:H4, O174:H8 und O128:H2 konnten zudem Stämme gefunden werden, die bereits in Verbindung mit dem Krankheitsbild HUS beim Menschen gefunden wurden. Die Serotypen ONT:H-, O117:H4 und O128:H2 sind jedoch mit Virulenzgenen (*vtx* 1c, *vtx* 2b, *e-hly*) assoziiert, denen bisher keine besondere Pathogenität zugeschrieben wurde bzw. nicht für Ausbrüche verantwortlich sind (STEPHAN UND HÖLZLE, 2000; KOCH ET AL., 2001; ZHANG ET AL., 2002; BRETT ET AL., 2003; FRIEDRICH ET AL., 2003; MORA ET AL., 2012). Bei vier von fünf Isolaten des Serotyps O174:H8 wurde hingegen die Virulenzgen-Kombination *vtx* 1a, *vtx* 1c und *e-hly* detektiert. VTEC-Stämme, die diese Kombination in sich trugen, wurden bereits mit schweren Krankheitsverläufen in Verbindung gebracht (BUVENS ET AL., 2012). Somit kann bei diesen Isolaten davon ausgegangen werden, dass es sich um Stämme handelt, die eine höhere Humanpathogenität aufweisen. Zusätzlich von Relevanz ist, dass allein drei der

erwähnten Isolate im Schwalm-Eder-Kreis bei Rehwild nachgewiesen wurden, eine Region in Hessen mit der höchsten durchschnittlichen Anzahl erlegter Rehe eines Jagdjahres. Das Vorkommen der Kombinationen O21:H21, O146:H28 sowie O174:H8 hingegen scheint eng mit Wildwiederkäuern assoziiert zu sein, wohingegen das Serovar O128:H2 wesentlich häufiger bei Schafen zu finden ist (BEUTIN ET AL., 1993; BLANCO ET AL., 2003; DJORDJEVIC ET AL., 2004; FRATAMICO ET AL., 2004; ZWEIFEL ET AL., 2004; LEHMANN ET AL., 2006; ISHII ET AL., 2007; BEUTIN ET AL., 2008). Die in der eigenen Arbeit bei Rehwild detektierten Serotypen O75:H8, O174:H8 und ONT:H⁺ wurden ebenfalls schon bei Rindern, Schafen und Ziegen nachgewiesen. Die dazugehörigen Virulenzgenprofile (*vtx* 1c + *e-hly*, *vtx* 1a + *vtx* 1c + *e-hly*, *vtx* 1c + *e-hly*) der isolierten Stämme lassen jedoch keine Rückschlüsse zu den Ursprüngen einer Tierart zu, da diese bei allen drei Tierarten vorkommen können. Anders sieht es bei den Stämmen, der Serotypen O21:H21, ONT:H7 und ONT:H14 aus. Diese Serotypen konnten ebenfalls bereits bei Rindern und Schafen nachgewiesen werden. Bei dem Serotypen O21:H21, welcher beim Rehwild mit 16,5 % zusammen mit dem Serovar O74:H28 am häufigsten gefunden wurde, wurde in den eigenen Untersuchungen entweder die Virulenzkombination *vtx* 2b oder *vtx* 2b und *e-hly* detektiert. Das Gen *vtx* 2b wird häufig bei Schafen und Wildwiederkäuern detektiert (ISHII ET AL., 2007; MARTIN UND BEUTIN, 2011; HOFER ET AL., 2012), jedoch selten beim Rind, so dass das Rind vor dem Hintergrund einer wechselseitigen Übertragung wahrscheinlich keine Rolle gespielt hat. Die beiden detektierten Serotypen ONT:H7 und ONT:H14 hingegen waren beide mit dem Verotoxin *vtx* 2g assoziiert, was vermuten lässt, dass u. U. ein Austausch mit Rindern stattgefunden hat. Interessanterweise ist der Serotyp O74:H28, welcher mit dem Serovar O21:H21 am häufigsten nachgewiesen wurde, im Gegensatz zum O21:H21-Serotyp mit dem Verotoxin *vtx* 2g und teilweise mit *e-hly* assoziiert. Dieses bedeutet, dass die beiden, in den eigenen Untersuchungen am häufigsten detektierten Serotypen vor dem Hintergrund einer wechselseitigen Übertragung nicht nur beim Rehwild vorkommen, sondern das Vorkommen, gepaart mit den Virulenzgenen, auch beim Schaf und beim Rind denkbar sind.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass bei Betrachtung sowohl der Serotypen als auch der Virulenzfaktoren, die Mehrheit der isolierten VTEC-Stämme beim Rehwild in Hessen keine typischen Muster bekannt hochpathogener humaner EHEC-Stämme zeigen. Hingegen lässt die Tatsache, dass VTEC aus Rehwild und landwirtschaftlichen Nutztieren Gemeinsamkeiten aufweisen, eine wechselseitige Übertragung möglich erscheinen.

5.6 Ist eine wechselseitige Übertragung von VTEC zwischen Rehwild und den Hauswiederkäuern Rind, Schaf und Ziege in Hessen denkbar?

Bei dem Vergleich der Virulenzprofile in Verbindung mit der Serotypzugehörigkeit der isolierten VTEC-Stämme des Rehwildes mit bereits publizierten Daten über VTEC-Stämme von Rind, Schaf und Ziege, vor allem aus dem deutschsprachigen Raum, sind einige Gemeinsamkeiten zu finden, die auf eine wechselseitige Infektion von VTEC hinweisen. So wurden mit den Serotypen O21:H21 (VT 2b, *e-hly*) und O74:H28 (VT 2g, *e-hly*) VTEC-Stämme isoliert, die nicht nur bei Wildwiederkäuern, sondern im Falle des Serovars O21:H21 bereits vermehrt bei Schaf und Rind und hinsichtlich des Serotyps O74:H28 gehäuft beim Rind detektiert werden konnten. Ähnlich sieht es bei den beiden Subtypen VT 1c und VT 1d, teilweise in Kombination mit *e-hly*, und ihren assoziierten Serotypen aus. Mit den Serotypen O75:H8, ONT:H⁻ und O174:H8, wurden dabei ebenfalls VTEC-Stämme nachgewiesen, die auch bei den Hauswiederkäuern vor allem aus dem deutschsprachigen Raum vermehrt vorkommen.

Bei der differenzierten Betrachtung der VTEC-Stämme, die in den Landkreisen mit einem widersprüchlichen Ergebnis hinsichtlich der Prävalenz und der Anzahl Tiere pro Hektar landwirtschaftliche Nutzfläche isoliert wurden, ist zu erkennen, dass die Ursachen hierfür unter Umständen in der Tierhaltung und der Tierart zu finden sind (s. auch Kap. 5.1.3).

Gerade in den Landkreisen Lahn-Dill-Kreis/Limburg-Weilburg, mit einer hohen Population an Schafen und Ziegen, wurden mit den Subtypen VT 2b und VT 1c und den damit kombinierten Serotypen O21:H21 und ONT:H⁻, vor allen VTEC-Stämme nachgewiesen, die häufiger bei Schaf, Ziege und auch dem Rind zu finden sind. Zusätzlich konnte in den beiden Landkreisen mit dem Serotypen O74:H28 in Kombination mit dem *vtx* 2g- und *e-hly*-Gen ein VTEC-Stamm nachgewiesen, der auch bei Rindern häufiger isoliert wurde. Diese Ergebnisse in Kombination mit der sehr hohen Dichte an Schafen und Ziegen sowie der Haltungsform, lassen es denkbar erscheinen, dass es zu einer wechselseitigen Infektion zwischen Reh und Hauswiederkäuern gekommen ist. In Marburg-Biedenkopf liegt eine ähnliche Situation vor. Nur scheint es hier im Gegensatz zu den Landkreisen Lahn-Dill/Limburg-Weilburg möglicherweise hauptsächlich vermehrt zu einem Austausch zwischen Reh und Rind gekommen zu sein. Aus dieser Region wurden beim Rehwild u. a. die Serotypen O74:H28 und ONT:H7 in Kombination mit *vtx* 2g sowie einige andere Serovare, die sowohl mit dem Subtypen VT 2g, VT 2b als auch den Subtypen VT 1d kombiniert vorlagen, isoliert. Der Subtyp VT 2g, welcher in dieser Region am häufigsten detektiert wurde, ist, wie bereits

erwähnt, hauptsächlich mit VTEC-Stämmen von Rindern assoziiert, wohingegen die anderen gefundenen Subtypen bei allen drei anderen Hauswiederkäuern vorkommen können. Somit könnte die in dieser Region vermehrt betriebene Mutterkuhhaltung eine Rolle in der Übertragung von VTEC zwischen dem Reh und Rind gespielt haben.

Die Ergebnisse der eigenen Untersuchungen deuten somit darauf hin, dass ein Austausch von VTEC zwischen Rehwild und den Hauswiederkäuern in Hessen gegeben sein könnte.

5.7 Methodische Aspekte

5.7.1 Anreicherungsverfahren

Im Rahmen der Untersuchungen wurden bei den ersten 50 Proben die beiden Anreicherungsmedien BPW und mTSB + N vergleichend eingesetzt. Der Hintergrund dieses Vorgehens war, dass die Kotproben vor ihrer Bearbeitung aufgrund des hohen logistischen Aufwandes der Probennahme sofort bei – 20 °C eingefroren wurden. Aufgrund dieses Einfriervorgangs musste man von teilweise vorgeschädigten VTEC-Zellen ausgehen und ein entsprechend geeignetes Anreicherungsmedium zur Resuskitation der Zellen einsetzen.

In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass sich der Zusatz von Novobiocin negativ auf die Vermehrung von VTEC auswirkt (VIMONT ET AL., 2007; JASSON ET AL., 2009; BEUTIN ET AL., 2010). So scheint die minimale Hemmkonzentration des Antibiotikums bei non-O157-Stämmen geringer zu sein als bei O157-Stämmen (VIMONT ET AL., 2007). Gerade die übliche Konzentration von 20 mg/l Novobiocin als Zusatz von mTSB, die in der DIN EN ISO 16654:2001 festgelegt ist, scheint das Wachstum von ca. einem Drittel der non-O157-Stämmen zu hemmen (UEMURA ET AL., 2003) und erhöht dementsprechend das Risiko falsch-negativer Ergebnisse. Besonders gestresste oder vorgeschädigte Zellen sollten in einem nicht selektiven Medium wie dem BPW oder mTSB, vor Zusatz eines Antibiotikums, vorangereichert werden (DE BOER UND HEUVELINK, 2000; HUSSEIN UND BOLLINGER, 2008). Da sich kein Unterschied in der Anzucht zeigte, und sich das BPW in mehreren Studien für den Nachweis von subletal geschädigten VTEC als geeigneter erwies (JASSON ET AL., 2009; BEUTIN ET AL., 2010), wurde BPW für die Anreicherung der restlichen 303 Kotproben eingesetzt.

5.7.2 Immunologische Testsysteme

Für das immunologische Screening wurden zwei verschiedene Testsysteme (NOVITEC[®] Verotoxin Test, Duopath[®] Verotoxin Test) eingesetzt. Der Einsatz beider Testsysteme erfolgte, einerseits aufgrund der Matrix Rehkot und andererseits um möglichst viele positive

Proben durch die Kombination der beiden Testsysteme zu detektieren, da sowohl der NOVITEC® Verotoxin Test als auch der Duopath® Verotoxin Test nur für die Untersuchung von humanen Stuhlproben zugelassen sind. Erfahrungen mit Kot aus dem veterinärmedizinischen Bereich lagen nicht vor.

Allgemein kann festgehalten werden, dass mithilfe des Duopath® Verotoxin Tests 118 Rehe falsch-positiv und mithilfe des NOVITEC® Verotoxin Test 58 Tiere falsch-negativ als Ausscheider von VTEC identifiziert wurden. Anhand dieser Ergebnisse ist bereits zu erkennen, dass sich beide Testsysteme für die Untersuchung von Rehkot nicht eignen.

Im Gegensatz zu den Angaben des Herstellers als auch im Rahmen einer Studie von PARK ET AL. (2003) zur Evaluierung des Duopath® Verotoxin Tests erwies sich der Test in seiner Auswertung schwierig. Laut Hersteller ist eine Probe positiv zu bewerten, wenn in einer bzw. beiden Testzonen und in der Kontrollzone innerhalb von 10 Minuten eine eindeutig rotgefärbte Linie zu erkennen ist. Ein negatives Ergebnis hingegen stellt sich dar, wenn in den Testzonen keine Präzipitationsbande erscheint und in der Kontrollzone eine eindeutig rotgefärbte Linie angezeigt wird. Grundsätzlich sind, dunkle und nicht rotgefärbte Linien als negativ zu bewerten. Im Rahmen der eigenen Untersuchungen stellte sich jedoch heraus, dass sowohl eine braune Bande als auch eine rötliche Bande ein positives Ergebnis darstellen konnte. Als ein zusätzliches Problem für die Interpretation des Testergebnisses stellte sich die oftmals geringe Bandenstärke heraus. Ähnlich wie in der Studie von PARK ET AL. (2003) zeigten sich in den eigenen Untersuchungen bei einigen Proben dunkle, nicht rotgefärbte Banden mit einer Farbintensität von eins bis vier. Im Gegensatz zur eigenen Studie wurden solche Proben von PARK ET AL. (2003) immer als negativ bewertet. Ob diese Proben weitergehend untersucht wurden, wird in der Studie nicht erwähnt. Aufgrunddessen kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob sich auch in der Untersuchung von PARK ET AL. (2003) diese Proben teilweise als positiv für Verotoxine dargestellt hätten. Die Hintergründe der widersprüchlichen Ergebnisse können nur vermutet werden. Als Ursache können die unterschiedlichen Zusammensetzungen der Kotproben in Betracht gezogen werden. Je nach geographischer Herkunft und dem Zeitpunkt der Probennahme unterschied sich der Kot in der Farbgebung und könnte zu einer Beeinflussung der Bandenfarbe geführt haben. Andererseits könnten Kreuzreaktionen mit *Citrobacter freundii*-Stämmen sowie auch *Enterobacter cloacae*-Stämmen denkbar sein, bei denen VT 2c-ähnliche Toxine nachgewiesen wurden (SCHMIDT ET AL., 1993; PATON UND PATON, 1996). Auch bei *Hafnia alvei*, *Enterobacter gergoviae*, *Escherichia fergusonii* und *Pantoea* spp. konnten bereits Verotoxin-Gene

gefunden werden (ROGERIE ET AL., 2001; SANDER, 2002; ALBERT ET AL., 2003). Ebenfalls könnten andere Oberflächenantigene von anderen Bakterienspezies für Kreuzreaktionen verantwortlich sein (EFSA, 2007). In den eigenen Untersuchungen konnten vier Kotproben, die zwar sowohl im Duopath® Verotoxin Test als auch im anschließenden molekularbiologischen Screening positiv für das Verotoxin bzw. ein Verotoxin-Gen waren, in der biochemischen Bestätigung nicht als *E. coli* identifiziert werden. Stattdessen handelte es sich bei den Isolaten um *Salmonella* Gallinarum und *Hafnia alvei*. Somit kam es nachweislich in den eigenen Untersuchungen teilweise zu Kreuzreaktionen. Dennoch können hierdurch nicht alle falsch-positiven Ergebnisse erklärt werden.

Des Weiteren soll es laut Herstellerangaben mithilfe des Duopath® Verotoxin-Tests möglich sein, in klinischen Stuhlproben zwischen dem Verotoxin 1 und Verotoxin 2 zu unterscheiden. Dies konnte in der Studie von PARK ET AL. (2003) bestätigt werden. Im Rahmen ihrer Evaluierungsstudie erreichten sie sogar bei Verwendung von Kolonieabschwemmungen eine Sensitivität von 100 %. Im Gegensatz dazu konnte bei den eigenen Untersuchungen das Verotoxin 1 nur in 57,89 % und das Verotoxin 2 in 72,73 % der Fälle bestätigt werden. Ähnliche Ergebnisse erzielten GRIF ET AL. (2007) in ihrer Studie. Diese verglichen den Duopath® Verotoxin-Test zur Detektion des Verotoxins aus humanen Stuhlproben mit einem ELISA und der PCR. Dabei trat, ebenfalls für den Nachweis des vtx 1 sowie auch des vtx 2 ein hoher Prozentsatz zweifelhafter Ergebnisse sowie eine niedrige Sensitivität auf. Des Weiteren erwies sich der Duopath®-Verotoxin Test häufiger als positiv, obwohl kein Koloniewachstum auf dem SMAC-Selektivmedium zu erkennen war. Möglicherweise waren die gefriereschädigten Zellen nicht in der Lage innerhalb der Inkubationszeit auf SMAC-Agar Kolonien zu bilden, konnten aber dennoch zwischen den Kotpartikeln eine Art Bakterienschleier ausbilden. Bei dem Abstrich solcher Platten war es durch die Inkubation mit Polymyxin B aber dennoch möglich, von den wenigen Zellen das Verotoxin freizusetzen. Im Gegensatz zu stark bewachsenen Platten, wurde der Test bei solchen Platten durch mukoiden Kolonien nicht behindert.

Abschließend bleibt festzuhalten, dass sich dieses Testsystem aufgrund seiner niedrigen Sensitivität sowie Spezifität und einem hohen Prozentsatz an zweifelhaften Ergebnissen zur Untersuchung des Rehkots letztlich nicht eignet.

Als zweiter immunologischer Test wurde der NOVITEC® Verotoxin-Test eingesetzt. Die Interpretation der Ergebnisse erfolgte sowohl visuell als auch spektralphotometrisch. Insgesamt konnten damit 13 Kotproben positiv auf Verotoxin getestet werden. In der

anschließenden molekularbiologischen Untersuchung hingegen konnten nur zehn als Ausscheider identifiziert werden. Somit wurden anhand dieses Testsystems 31,18 % der Rehe als falsch-negativ für die Ausscheidung von VTEC befundet. Ähnlich schlechte Ergebnisse mithilfe dieses Testsystems wurden im Rahmen eines Ringversuchs zum Nachweis und zur Isolierung von VTEC aus Hackfleischproben erzielt; auch hier wurden signifikant mehr Proben falsch-negativ detektiert (BEUTIN ET AL., 2010). Zur Interpretation des schlechten Testergebnisses testeten die Autoren den NOVITEC® Verotoxin-Test mit Verotoxin-bildenden Referenzstämmen. Dabei ergab sich, dass die Toxintypen VT 1, VT 1c, VT 1d, VT 2-O118 (VT 2b), VT 2e, VT 2f und VT 2g mit diesem Testsystem nicht erkannt wurden. Zu diesen Ergebnissen stehen die eigenen Ergebnisse im Widerspruch. Denn mithilfe des NOVITEC® Verotoxin-Tests konnten alle im Rahmen der Arbeit detektierten vtx 1a-positiven Isolate nachgewiesen werden. Auch die Toxintypen VT 1c, VT 1d, VT 2b und VT 2g konnten vereinzelt durch das Testsystem detektiert werden. Solche widersprüchlichen Ergebnisse können laut FENG ET AL. (2011) dadurch zustande kommen, dass verbunden mit einem VTEC-Stamm abhängigen Verhalten, entweder keine Expression der Verotoxine stattfindet (ZHANG ET AL., 2005) oder aber die Menge des produzierten Verotoxins sich unterhalb der Nachweisgrenze des eingesetzten Testsystems befindet. So berichteten AHMAD UND ZUREK (2006) in ihrer Studie, dass manche VTEC-Stämme einen vorgeschalteten Promoter besitzen, welcher dafür verantwortlich sein kann, dass manche VT-Subtypen nur schwach exprimiert werden. Eine weitere Ursache für die erwähnten Abweichungen können Unterschiede in den Spezifitäten für die Anti-Verotoxin-Antikörper für die verschiedenartigen VT-Subtypen sein (FENG ET AL., 2011). Ebenso scheint es Pseudogene zu geben, die zu keiner Expression des Verotoxins führen. Über den Subtypen VT 2g wird berichtet, dass es aufgrund von Insertionen in der Subunit A nach Position 6 zu einer „frame shift“-Mutation kommen kann, die zu einem VT 2g Pseudogen führt. Aufgrund der Verschiebung des Leserasters kommt es nicht mehr zur Expression des Verotoxins, so dass beim Vorliegen solch eines Pseudogens negative Resultate sowohl im NOVITEC® Verotoxin Test als auch im Duopath® Verotoxin Test erklärbar wären (PRAGER ET AL., 2011). In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch der relevante Bereich des vtx 2g nicht sequenziert, so dass dies nicht beurteilt werden kann. Trotz dieser widersprüchlichen Ergebnisse zu der Studie von BEUTIN ET AL. (2010) bleibt festzuhalten, dass auch dieses Testsystem sich aufgrund seiner niedrigen Sensitivität und Spezifität für die Untersuchung von Rehkot auf VTEC nicht eignet.

Zum Schluß sei erwähnt, dass parallel zu den immunologischen Tests der Einsatz des molekularbiologischen Screenings möglicherweise sinnvoll gewesen wäre. Stattdessen wurde

das Screening mithilfe der MK 1- und MK 2-Primer nur mit immunologisch positiven Proben durchgeführt. Hierdurch können jedoch Proben, bei denen ein ungünstiges Verhältnis von VTEC zu anderen *E. coli* vorliegt oder aber VTEC-Stämme beinhalten, die aufgrund der Anzucht ihr *vtx* verloren haben (PIÉRARD ET AL., 1997), oftmals aufgrund der testspezifischen Nachweisgrenzen nicht detektiert werden. Aufgrundessen wird der parallele Einsatz eines molekularbiologischen Screenings von einigen Studien unterstützt und als sinnvoll erachtet (PIERARD ET AL., 1997; GEUE ET AL., 2002; LEHMANN ET AL., 2006; BEUTIN ET AL., 2010), da PCR-Verfahren eine bessere Sensitivität zeigen (BEUTIN ET AL., 2010).

6. Schlussfolgerungen

Die Ergebnisse zeigen, dass Rehwild in Hessen als natürliches Reservoir für humanpathogene EHEC und VTEC eine Rolle spielen kann. Die zusätzliche Tatsache, dass VTEC aus Rehwild und landwirtschaftlichen Nutztieren Gemeinsamkeiten aufweisen und sich die Tierzahl pro landwirtschaftliche Fläche auf die Prävalenz auswirkt, deutet auf eine wechselseitige Übertragung hin. Aufgrund der überwiegend VT 2b und VT 2g-positiven Isolate und der meist unvollständigen Ausstattung mit bisher bekannten Virulenzfaktoren, die eine höhere Humanpathogenität hervorrufen, scheint es sich in der Mehrheit nicht um hochpathogene Stämme zu handeln. Dennoch konnten mit den Serovaren ONT:H⁻, O117:H4, O174:H8 und O128:H2 Stämme nachgewiesen werden, die mit HUS-Erkrankungen des Menschen assoziiert waren. Im Gegensatz zum O174:H8-Serotyp verfügen die anderen drei Serotypen über Virulenzgene (*vtx* 1c, *vtx* 2b, *e-hly*), denen – zumindest bisher – keine besondere pathogenetische Bedeutung zugeschrieben wird. Vier Isolate des Serotyps O174:H8 hingegen wurden in Kombination mit den Virulenzgenen *vtx* 1a, *vtx* 1c und *e-hly* gefunden; diese konnten bereits mit schweren humanen Krankheitsverläufen in Verbindung gebracht werden. Allein drei dieser Isolate wurden im Schwalm-Eder-Kreis bei Rehwild nachgewiesen, eine Region in Hessen mit der höchsten durchschnittlichen Anzahl erlegter Rehe eines Jagdjahres. Darüber hinaus konnte mit dem Serotyp O128:H8 ein weiteres Isolat in dieser Region bei einem Reh detektiert werden, welches aufgrund seines Virulenzprofils (*vtx* 1, *eae*- und *e-hly*-positiven) möglicherweise eine höhere Humanpathogenität aufweist. Somit besteht in dieser Region möglicher Weise ein erhöhtes Gefährdungspotential sich über den Kontakt mit Rehwild mit einem potentiellen EHEC-Stamm zu infizieren.

Eine fäkale Kontamination von VTEC ist in das Wildbret entweder durch eine Kotverschmutzung oder auch durch eine Translokation vom Darmlumen ins umliegende Gewebe durchaus denkbar. Besonders die Jagdart, der Zustand des Tieres vor und nach dem Schuss sowie das anschließende Versorgen spielen in diesem Zusammenhang eine erhebliche Rolle. Somit hat der Jäger einen erheblichen Einfluss auf die Qualität des Wildbrets und spielt eine wesentliche Rolle bei dem Eintrag von VTEC ins Wildbret. Ferner sollten sich Jäger darüber im Klaren sein, dass sie sich durch unvorsichtiges Vorgehen beim Aufbrechen und Ausweiden der Rehe dem Risiko einer Infektion mit potentiellen EHEC aussetzen.

7. Zusammenfassung

In einer repräsentativen Prävalenzstudie sollte für das Bundesland Hessen das Vorkommen von Verotoxin-bildenden *E. coli* (VTEC) bei Rehwild ermittelt werden. Dazu wurden Kotproben von 353 erlegten Rehen aus Revieren von 12 hessischen Forstämtern aus insgesamt 12 Landkreisen einbezogen. Nach selektiver kultureller Anreicherung wurden im Enzymimmunoassay (EIA) bzw. in einem immunchromatographischen Verfahren (Duopath®) Verotoxin-positiv getestete Proben weitergehend untersucht. Mittels konventioneller PCR und Anzuchtung der VTEC auf selektiv-elektiven Nährmedien konnten insgesamt 68 Tiere (19,3 %) als Ausscheider solcher Stämme nachgewiesen werden.

Unter den positiven Rehen waren die juvenilen Tiere (29,84%) hoch signifikant ($p < 0,001$) häufiger betroffen als die beiden anderen Altersklassen „subadult“ (14,75 %) und „adult“ (12,80 %). Eine Abhängigkeit hinsichtlich des Geschlechts konnte nicht festgestellt werden. In Abhängigkeit von den Landkreisen gab es signifikante ($p < 0,05$) Unterschiede in den Prävalenzen (10,5 % - 41,4 %); in zwei Landkreisen konnten keine positiven Tiere nachgewiesen werden.

Die molekular-basierte Typisierung zur Erfassung der Verotoxinsubtypen zeigte, dass der Subtyp 2b (38,5 %) dominierte, gefolgt von dem Subtypen VT 2g (30,8 %) sowie den Subtypen VT 1c, VT 1d (jeweils 12,8 %) und VT 1a (5,1 %). Von den insgesamt 68 positiven Rehen konnten 79 verschiedene *E. coli*-Isolate gewonnen werden. Bei sieben Tieren konnten neben verschiedenen Serotypen auch VTEC-Stämme mit unterschiedlichen Genkombinationen nachgewiesen werden. Lediglich ein VTEC-Isolat erwies sich als positiv für das *E. coli* attaching and effacing-Gen (*eae*), das regelmäßig bei hoch virulenten VTEC-Stämmen anzutreffen ist. Das Enterohämolysin-Gen konnte bei 27 Isolaten nachgewiesen werden.

Unter den 79 Isolaten waren 27 verschiedene Serotypen zu finden. Am häufigsten wurden der Serotyp O21:H21(16,6 %) und O74:H28 (16,6 %) detektiert, gefolgt von O146:H28 (7,7 %), O154:H31(6,4 %) und O174:H8 (6,4 %). O174:H8 konnte in Zusammenhang mit den Verotoxin-Subtypen VT 1a und VT 1c sowie dem *e-hly*-Gen schon bei schweren Krankheitsverläufen des Menschen nachgewiesen werden.

Insgesamt kann aufgrund der hier erhobenen Befunde davon ausgegangen werden, dass Rehwild in Hessen als natürliches Reservoir für VTEC angesehen werden muss. Prinzipiell handelt sich jedoch bei den isolierten VTEC-Stämmen vorwiegend um Stammformen mit

geringer Virulenz. Zusätzlich deutet die Tatsache, dass VTEC aus Rehwild und landwirtschaftlichen Nutztieren Gemeinsamkeiten aufweisen und sich die Tierzahl pro landwirtschaftliche Fläche auf die Prävalenz auswirkt, auf eine wechselseitige Übertragung hin.

8. Summary

In a representative prevalence study, the occurrence of verocytotoxin-producing *E. coli* should be determined for roe deer in the federal state of Hessen. For this purpose fecal samples from 353 shot roe deer were included from 12 Hessian forestry offices of a total of 12 districts. After selective culture enrichment, verotoxin-positive samples were further analyzed in an enzyme immunoassay (EIA) or in an immunochromatographic method (Duopath®). By conventional PCR, and cultivation of VTEC on selective-selective culture media, a total of 68 animals (19.3%) were detected as shedders of such strains.

Among the positive roe deer, the juvenile animals (29.84%) were highly significant ($p < 0.001$) more frequently affected than the other two age groups subadult (14.75%) and adult (12.80%); however, there were no gender differences. Depending on the districts, there were significant ($p < 0.05$) differences in the prevalences (10.5% - 41.4%); in two counties even no positive animals were detected.

The molecular-based typing for detecting the subtypes of verotoxin revealed that the subtype VT 2b (38.5%) dominated, followed by the subtype VT 2g (30.8%) and the subtype VT 1c, VT 1d (both 12.8%) and VT 1a (5.1%). Of the total of 68 positive roe deer 79 different *E. coli* isolates were recovered. In seven animals also VTEC strains were detected with different gene combinations in addition to various serotypes. Only one VTEC isolate was positive for *E. coli* attaching and effacing gene (*eae*), which is to be found regularly with highly virulent VTEC strains. The enterohemolysin gene was detected in 27 isolates.

Among the 79 isolates, 27 different serotypes were found. O21:H21 (16.6%) and O74:H28 (16.6%) were the most common serotype detected, followed by O146: H28 (7.7%), O154: H31 (6.4%) and O174: H8 (6.4%). In connection with the verotoxin subtypes VT 1a and VT 1c as well as the *e-hly* gene, the serotype O174: H8 could even be detected at severe disease of human like the bloody diarrhoea.

Overall, this study shows that roe deer in the federal state of Hessen should be considered as natural reservoir for VTEC. In general, however, the isolated VTEC strains belong mainly to strains with low virulence. In addition, the fact that VTEC from roe deer and farm animals show similarities and the number of animals per agriculture land affects the prevalence, indicates that transmission between the wildlife reservoir and the domestic animal reservoir occurs.

9. Literaturverzeichnis

ABDULMAWJOOD, A. UND M. BÜLTE (2000)

Optimization of the polymerase chain reaction (PCR) for the detection of verocytotoxin type 2d. Proceed. 41. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG), Eigenverlag der DVG, Gießen

ABU-BOBIE, J., G. FRANKEL, C. BAIN, A. G. GONCALVES, L. R. TRABULSI, G. DOUCE, S. KNOTTON UND G. DOUGAN (1998)

Detection of intimins alpha, beta, gamma, and delta, four intimin derivatives expressed by attaching and effacing microbial pathogens. J. Clin. Microbiol. 36, 662-668

ACHESON, D. W., J. REIDL, X. ZHANG, G. T. KEUSCH, J. J. MEKALANOS UND M. K. WALDOR (1998)

In vivo transduction with Shiga toxin 1-encoding phage. Infect. Immun. 66, 4496-4498

AHMAD, A. UND L. ZUREK (2006)

Evaluation of the anti-terminator Q933 gene as a marker for *Escherichia coli* O157:H7 with high Shiga toxin production. Curr. Microbiol. 53, 324-328

AHN, C. K., A. J. RUSSO, K. R. HOWELL, N. J. HOLT, P. L. SELLENRIEK, R. J. ROTHBAUM, A. M. BECK, L. J. LUEBBERING UND P. I. TARR (2009)

Deer Sausage: A newly identified vehicle of transmission of *Escherichia coli* O157:H7. J. Pediatr. 155, 587-589

AID (LAND- UND HAUSWIRTSCHAFTLICHE AUSWERTUNG- UND INFORMATIONSDIENST) (2009)

Die Herkunft von Wildfleisch. http://www.was-wir-essen.de/abisz/-wildfleisch_erzeugung_herkunft.php. Auswertungs- und Informationsdienst für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft (AID) e. V., Bonn. Zugriff am: 10.09.2012

AKASHI, S., K. JOH, A. TSUJI, H. ITO, H. HOSHI, T. HAYAKAWA, J. IHARA, T. ABE, M. HATORI, T. MORI UND T. NAKAMURA (1994)

A severe outbreak of haemorrhagic colitis and haemolytic uraemic syndrome associated with *Escherichia coli* O157:H7 in Japan. Eur. J. Pediatr. 153, 650-655

ALBERT, T., M. GAREIS UND L. KRÖCKEL (2003)

Mikrobiologische Qualität von Fleischerzeugnissen aus ökologischer Produktion. Fleischwirtsch. 83, 147-150

AMIRLAK, I. UND B. AMIRLAK (2006)

Haemolytic uraemic syndrome: an overview. Nephrology 11, 213-218

ANDERSEN, R., P. DUNCAN UND J. D. C. LINNELL (HRSG.) (1998)

The European Roe Deer. The biology of success. Scandinavian University Press, Oslo, ISBN 82-00-37682-6

ANONYMOUS (2010)

Bericht zur Lage der Landwirtschaft im Werra-Meißner-Kreis. <http://www.werra-meissner-kreis.de/landwirtschaft>. Zugriff am: 09.04.2013

ANONYMOUS (2012)

Kurzportraits einheimischer Wildtiere. <http://www.wild.uzh.ch>. Zugriff am: 03.09.2012

ANONYMOUS (2012 A)

Rehwild. <http://www.naturjagd.ch>. Zugriff am: 12.09.2012

ANONYMOUS (2012 B)

Landwirtschaft in Waldeck-Frankenberg – Landwirtschaft im Überblick. <http://www.landwirtschaft-waldeck-frankenberg.de/liue.html>. Zugriff am: 23.04.2012

ANONYMOUS (2012 C)

Fachdienst Landwirtschaft – Artgerechte Tierhaltung und Fütterung. <http://www.marburg-biedenkopf.de/laendlicher-raum/landwirtschaft/tierhaltung/>. Zugriff am: 25.04.2012

ANONYMOUS (2013)

Informationen zum Rehwild. <http://www.bfn.de/natursport/info/SportinfoPHP/-infosanzeigen.php?tierart=Rehwild&z=Tierart&code=d6&lang=de>. Zugriff am: 24.03.2013

ANONYMOUS (2013A)

Rehwild. <http://www.djz.de/447,771/>. Zugriff am: 13.05.2013

ARNOLD, K. W. & C. W. KASPAR (1995)

Starvation- and stationary-phase-induced acid tolerance in *Escherichia coli* O157:H7. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 2037–2039

ASAKURA, H., S. MAKINO, T. SHIRAHATA, T. TSUKAMOTO, H. KURAZONO, T. IKEDA UND K. TAKESHI (1998)

Detection and genetical characterization of Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* from wild deer. *Microbiol. Immun.* 42 (12), 815-822

ASAKURA, H., S. MAKINO, H. KOBORI, M. WATARAI, T. SHIRAHATA, T. IKEDA UND K. TAKESHI (2001)

Phylogenetic diversity and similarity of active sites of Shiga toxin (stx) in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolates from humans and animals. *Epidemiol. Infect.* 127, 27–36

BALFANZ, F. (2007)

Untersuchungen des Einflusses von Stoffwechselaktivität und sozialen Hierarchien auf die Stressbelastung beim Rothirsch. Informationsblatt der Stiftung Wald und Wild in Mecklenburg Vorpommern Nr. 1

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

Nachweis von Vero- (Shiga-like-) toxinbildenden *E. coli*-Keimen (VTEC) mittels Zellkulturtest bei durchfallkranken Kälbern. *Tieraerztl. Umschau* 2, 71-78

BARDIAU, M., F. GRÉGOIRE, A. MUYLEAERT, A. NAHAYO, J.-N. DUPREZ, J. MAINIL UND A. LINDEN (2010)

Enteropathogenic (EPEC), enterohaemorrhagic (EHEC) and verotoxigenic (VTEC) *Escherichia coli* in wild cervids. J. Appl. Microbiol. 109, 2214-2222

BERRY, E. D. UND C. N. CUTTER (2000)

Effects of acid adaptation of *Escherichia coli* O157:H7 on efficacy of acetic acid spray washes to decontaminate beef carcass tissue. Appl. Environ. Microbiol. 66, 1493-1498

BESSER, T. E., B. L. RICHARDS, D. H. RICE UND D. D. HANCOCK (2001)

Escherichia coli O157:H7 infection of calves: infectious dose and direct contact transmission. Epidemiol. Infect. 127 (3), 555-560

BETTELHEIM, K. A. (2007)

The Non-O157 Shiga-toxigenic (Verocytotoxigenic) *Escherichia coli*; Under-rated pathogens. Crit. Rev. Microbiol. 33, 67-87

BEUTIN, L., M. A. MONTENEGRO, I. ORSKOV, F. ORSKOV, J. PRADA, S. ZIMMERMANN UND R. STEPHAN (1989)

Close association of verotoxin (shiga-like toxin) production with enterohemolysin production in strains of *Escherichia coli*. J. Clin. Microbiol. 27, 2559-2564

BEUTIN, L., D. GEIER, H. STEINRÜCK, S. ZIMMERMANN UND F. SCHEUTZ (1993)

Prevalence and some properties of verotoxin (Shiga-like toxin)-producing *Escherichia coli* in seven different species of healthy domestic animals. J. Clin. Microbiol. 31, 2483-2488

BEUTIN, L., G. KRAUSE, S. ZIMMERMANN, S. KAULFUSS UND K. GLEIER (2004)

Characterization of Shigatoxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from human patients in Germany over a 3-year period. J. Clin. Microbiol. 42, 1099-1108

BEUTIN, L., A. MIKO, G. KRAUSE, K. PRIES, S. HABY, K. STEEGE UND N. ALBRECHT (2007)

Identification of Human-pathogenic strains of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from food by a combination of serotyping and molecular typing of Shiga toxin genes. Appl. Environ. Microbiol. 73, 4769-4775

BEUTIN, L., U. KRÜGER, G. KRAUSE, A. MIKO, A. MARTIN UND E. STRAUCH (2008)

Evaluation of major types of Shiga toxin 2e-producing *Escherichia coli* bacteria present in food, pigs, and the environment as potential pathogens for humans. Appl. Environ. Microbiol. 74, 4806-4816

BEUTIN, L. UND A. MIKO (2009)

Bewertung von Shiga (Vero) Toxin-produzierenden *Escherichia coli* aus Wildfleischproben als potenzielle Krankheitserreger für den Menschen. BfR-Symposium am 2. und 3. November 2009, Tagungsband, 51-55

BEUTIN, L., A. MARTIN, G. KRAUSE, K. STEEGE, S. HABY, K. PRIES, N. ALBRECHT, A. MIKO UND S. JAHN (2010)

Ergebnisse, Schlussfolgerungen und Empfehlungen aus zwei Ringversuchen zum Nachweis und zur Isolierung von Shiga (Vero) Toxin bildenden *Escherichia coli* (STEC) aus Hackfleischproben. J. Verbr. Lebensm. 5, 21-34

BEUTIN, L. (2012)

Shiga toxin producing *E. coli* (STEC) in food – which serotypes are important? 12. BfR Forum Verbraucherschutz, 4. Juni 2012. <http://www.bfr.bund.de/cm/343/shiga-toxin-producing-e-coli-stec-in-food-which-serotypes-are-important.pdf>. Zugriff am: 26.10.2012

BIELASZEWSKA, M., A. W. FRIEDRICH, T. ALDICK, R. SCHÜRK-BULGRIN UND H. KARCH (2006)

Shiga toxin activatable by intestinal mucus in *Escherichia coli* isolated from humans: predictor for a severe clinical outcome. Clin. Infect. Dis. 43, 1160-1167

BIELASZEWSKA, M., R. PRAGER, R. KÖCK, A. MELLMANN, W. ZHANG, H. TSCHÄPE, P. I. TARR UND H. KARCH (2007)

Shiga toxin gene loss and transfer in vitro and in vivo during enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26 infection in humans. Appl. Environ. Microbiol. 73, 3144-3150

BIELASZEWSKA, M., B. MIDDENDORF, R. KÖCK, A. W. FRIEDRICH, A. FRUTH, H. KARCH, M. A. SCHMIDT UND A. MELLMANN (2008)

Shiga toxin-negative attaching and effacing *Escherichia coli*: distinct clinical associations with bacterial phylogeny and virulence traits and inferred in-host pathogen evolution. Clin. Infect. Dis. 47, 208–217

BIEWER, S. (2009)

Tierhaltung – Beratungsteam Ökologischer Landbau – Öko-Mutterkühe: ganzjährige Außenhaltung. <http://www.llh-hessen.de/oekologischer-landbau/oekologische-tierproduktion.html>. Zugriff am: 09.04.2013

BLANCO, J., M. BLANCO, J. E. BLANCO, A. MORA, M. P. ALONSO, E. A. GONZÁLEZ UND M. I. BERNÁNDEZ (2001)

Epidemiology of verocytotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) in ruminants. In: Verocytotoxigenic *E. coli*. Herausgeber: G. Duffy, P. Garvey und D. A. McDowell. FOOD & NUTRITION PRESS, INC., Trumbull, Connecticut, USA, ISBN 0-917678-52-4, 113-148

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. BERNÁNDEZ UND J. BLANCO (2003)

Serotypes, virulence genes, and Intimin types of Shiga toxin (Verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from healthy sheep in Spain. J. Clin. Microbiol. 41 (4), 1351-1356

BLANCO, M., J. E. BLANCO, A. MORA, G. DAHBI, M. P. ALONSO, E. A. GONZÁLEZ, M. I. BERNÁRDEZ UND J. BLANCO (2004)

Serotypes, Virulence Genes, and Inimin Types of Shiga Toxin (Verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from cattle in Spain and identification of a new intimin variant gene (eae-ξ). J. Clin. Microbiol. 42, 645-651

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

Serotypes, intimin variants and other virulence factors of eae positive *Escherichia coli* strains isolated from healthy cattle in Switzerland. Identification of a new intimin variant gene (eae-η2). BMC Microbiol. 5, 23

BMELV (BUNDESMINISTERIUM FÜR ERNÄHRUNG, LANDWIRTSCHAFT UND VERBRAUCHERSCHUTZ) (2012)

Fleisch. http://www.bmelv.de/SharedDocs/Standardartikel/Landwirtschaft/Markt-Handel-Export/Markt-Statistik/Produkte/Fleisch_Einfuehrung.html. Zugriff am 10.09.2012

BOERLIN, P., S. A. MCEWEN, F. BOERLIN-PETZOLD, J. B. WILSON, R. P. JOHNSON UND C. L. GYLES (1999)

Associations between virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and disease in humans. J. Clin. Microbiol. 37, 497-503

BOLTON, D. J. (2011)

Verocytotoxigenic (Shiga toxin-producing) *Escherichia coli*: Virulence factors and pathogenicity in the farm to fork paradigm. Foodborne Pathog. Dis. 8, 357-365

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

Infektionen des Menschen durch enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC) in Deutschland, 1996. Bundesgesundhbl. 40, 194-197

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

Zur Situation der Infektionen des Menschen durch enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC) in Deutschland 1997. Bundesgesundhbl. 41, 2-5

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

Isolation of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 from cattle at slaughter in Italy. Vet. Microbiol. 67, 203-211

BRENNER, S., E. NIEß UND E. PFEFFER (2002)

Quantifizierung horizontaler Nährstoffbewegungen durch angepasste Weidewirtschaft mit Schafen in Naturschutzgebieten. Landwirtschaftliche Fakultät der Universität Bonn, Schriftenreihe des Lehr- und Forschungsschwerpunktes USL, Nr. 85, 1-92

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

stx_{1c} Is the most common Shiga toxin 1 subtype among Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from sheep but not among isolates from cattle. J. Clin. Microbiol. 41, 926-936

BRUNDER, W., H. SCHMIDT UND H. KARCH (1996)

KatP, a novel catalase-peroxidase encoded by the large plasmid of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. Microbiology 142, 3305-3315

BUCHANAN, R. L. UND S. G. EDELSON (1999)

pH-dependent stationary-phase acid resistance response of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in the presence of various acidulants. J. Food. Prot. 62, 211–218

BÜLTE, M. UND R. REUTER (1989)

Glucuronidase-Nachweis und Indol-Kapillartest als zuverlässiges Schnellidentifizierungsverfahren zur Erfassung von *E. coli* in Lebensmittel – toxinogene Stämme eingeschlossen. Zbl. Hyg. 188, 284-293

BÜLTE, M. UND V. WROCKLAGE (1992)

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

BÜLTE, M. UND S. HECKÖTTER (1997)

Vorkommen und Bedeutung von O157 und anderen verotoxinbildenden *E. coli* bei Tieren und in Lebensmitteln. Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. 88, 665-680

BÜLTE, M. (2001)

Nachweis und Charakterisierung von Verotoxin-bildenden *Escherichia coli*-Stämmen (VTEC) aus unterschiedlichen Habitaten. Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. 114, 473–477

BÜLTE, M. (2002)

Veterinärmedizinische Aspekte der Infektionen durch enterohämorrhagische *E. coli*-Stämme (EHEC). Bundesgesundhbl. Gesundheitsforsch. Gesundheitsschutz 45, 484-490

BÜLTE, M. (2004)

Vorkommen von enterohämorrhagischen *E. coli*-Stämmen (EHEC) bei Nutztieren. Dtsch. Tierärztl. Wschr. 111, 314-317

BÜLTE, M. (2004A)

Prävalenz von verotoxinogenen *Escherichia coli*-Stämmen (VTEC) unter besonderer Berücksichtigung des Serovars O157 in einer Mutterkuherde. Arch. Lebensmittelhyg. 55, 124-127

BÜLTE, M. UND M. GOLL (2006)

Pathogene Mikroorganismen - *Escherichia coli* und Shigellen. Behr's Verlag, Hamburg, 1. Auflage, ISBN 978-3-89947-255-4

BUNDESINSTITUT FÜR RISIKOBEWERTUNG (BfR) (2007)

Wildfleisch als Quelle für EHEC-Infektionen unterschätzt. Pressemitteilung 16/2007, 21.08.2007.

http://www.bfr.bund.de/de/presseinformation/2007/16/wildfleisch_als_quelle_fuer_ehec_infektionen_unterschaetzt-9785.html

BUNDESINSTITUT FÜR RISIKOBEWERTUNG (BfR) (2008)

Erreger von Zoonosen in Deutschland im Jahr 2006. BfR Wissenschaft, Herausgeber: M. Hartung, BfR Hausdruckerei Dahlem, Berlin, 151-153

BUNDESINSTITUT FÜR RISIKOBEWERTUNG (BfR) (2011)

Erreger von Zoonosen in Deutschland im Jahr 2009. BfR Wissenschaft, Herausgeber: M. Hartung und A. Käsbohrer, BfR Hausdruckerei Dahlem, Berlin

BUNDESINSTITUT FÜR RISIKOBEWERTUNG (BfR) (2011A)

EHEC-Ausbruch 2011 – Aufklärung des Ausbruchs entlang der Lebensmittelkette. BfR Wissenschaft, Herausgeber: B. Appel, G.-F. Böhl, M. Greiner, M. Lahrssen-Wiederholt und A. Hensel, FORMAT Druck und Medienservice GmbH, Berlin

BUNDESINSTITUT FÜR RISIKOBEWERTUNG (BfR) (2012)

Schutz vor Infektionen mit enterohämorrhagischen *E. coli* (EHEC). Merkblatt für Verbraucher, 01.06.2012. <http://www.bfr.bund.de/cm/350/verbrauchertipps-schutz-vor-infektionen-mit-enterohaemorrhagischen-e-coli-ehec.pdf>. Zugriff am: 04.10.2012

BUNDESINSTITUT FÜR RISIKOBEWERTUNG (BfR) (2012A)

Escherichia coli. http://www.bfr.bund.de/de/escherichia_coli-54352.html. Zugriff am: 04.10.2012

BUNDESINSTITUT FÜR RISIKOBEWERTUNG (BfR) (2012B)

Erreger von Zoonosen in Deutschland im Jahr 2010. BfR Wissenschaft, Herausgeber: M. Hartung und A. Käsbohrer, BfR-Hausdruckerei Dahlem, Berlin

BUNDESINSTITUT FÜR RISIKOBEWERTUNG (BfR) (2013)

Bundeseinheitliches System zur Erfassung von Daten zu Lebensmitteln, die bei Krankheitsausbrüchen beteiligt sind (BELA). http://www.bfr.bund.de/de/bundeseinheitliches_system_zur_erfassung_von_daten_zu_lebensmitteln_die_bei_krankheitsausbruechen_beteiligt_sind__bela_-70495.html. Zugriff am: 20.02.2013

BÜRK, C., R. DIETRICH, G. AÇAR, M. MORAVEK, M. BÜLTE UND E. MÄRTLBAUER (2003)

Identification and characterization of a new variant of Shiga toxin 1 in *Escherichia coli* O157:H7 of bovine origin. J. Clin. Microbiol. 41, 2106-2112

BURLAND, V., Y. SHAO, N. T. PERNA, G. PLUNKETT, H. J. SOFIA UND F. R. BLATTNER (1998)

The complete DNA sequence and analysis of the large virulence plasmid of *Escherichia coli* O157:H7. Nucleic. Acids Res. 26, 4196-4204

BUSCH, U., I. HUBER, U. MESSELHÄUSER, S. HÖRMANSDORFER UND A. SING (2007)

Nachweis Shigatoxin-bildender / Enterohämorrhagischer *Escherichia coli* (STEC / EHEC) mittels Real-Time PCR. J. Verbr. Lebensm. 2, 144-148

BUVENS, G., Y. DE GHELDRE, A. DEDISTE, A.-I. DE MOREAU, G. MASCART, A. SIMON, D. ALLEMEERSCH, F. SCHEUTZ, S. LAUWERS UND D. PIÉRARD (2012)

Incidence and virulence determinants of Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* infections in the Brussels-Capital Region, Belgium, in 2008-2010. J. Clin. Microbiol. 50, 1336-1345

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 (1996)

Proposed new nomenclature for SLT (VT) family. ASM News 62, 118-119

CAPRIOLI, A., S. MORABITO, H. BRUGÈRE UND E. OSWALD (2005)

Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. Vet. Res. 36, 289-311

CARO I. UND M. R. GARCÍA-ARMESTO (2007)

Occurrence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in a Spanish raw ewe's milk cheese. Int. J. Food Microbiol. 116, 410-413

CDC (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION) (2005)

Outbreaks of *Escherichia coli* O157:H7 associated with petting zoos – North Carolina, Florida, and Arizona, 2004 and 2005, MMWR 54 (50), 1277-1280

CDC (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION) (2007)

Outbreak of Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* O157 infection associated with a day camp petting zoo – Pinellas County, Florida, May-June 2007, MMWR 58 (16), 426-428

CDC (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION) (2011)

Compendium of measures to prevent disease associated with animals in public settings, 2011, National Association of State Public Health Veterinarians, Inc., MMWR 60 (4), 1-24

CHAPMAN, P. A., C. A. SIDONS, A. T. GERDAN MALO UND M. A. HARKIN (1997)

A 1-year study of *Escherichia coli* O157 in cattle, sheep, pigs and poultry. Epidemiol. Infect. 119, 245-250

CHAPMAN, P. A., J. CORNELL UND C. GREEN (2000)

Infection with verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 during a visit to an inner city open farm. Epidemiol. Infect. 125, 531-536

CHO, S., C. P. FOSSLER, F. DIEZ-GONZALEZ, S. J. WELLS, C. W. HEDBERG, J. B. KANEENE, P. L. RUEGG, L. D. WARNICK UND J. B. BENDER (2009)

Cattle-level risk factors associated with fecal shedding of Shiga toxin-encoding bacteria on dairy farms, Minnesota, USA. Can. J. Vet. Res. 73, 151-156

CIZEK, A., P. ALEXA, I. LITERÁK, J. HAMRÍK, P. NOVÁK, UND J. SMOLA (1999)

Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 in feedlot cattle and Norwegian rats from a large-scale farm. Lett. Appl. Microbiol. 28, 435-439

COBBOLD, R. UND P. DESMARCHELIER (2000)

A longitudinal study of Shiga-toxigenic *Escherichia coli* (STEC) prevalence in three Australian dairy herds. Vet. Microbiol. 71, 125-137

CODY, S. H., M. K. GLYNN, J. A. FARRAR, K. L. CAIRNS, P. M. GRIFFIN, J. KOBAYASHI, M. FYFE, R. HOFFMAN, A. S. KING, J. H. LEWIS, B. SWAMINATHAN, R. G. BRYANT UND D. J. VUGIA (1999)

An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection from unpasteurized commercial apple juice. Ann. Intern. Med. 130 (3), 202-209

CONEDERA, G., E. MATTIAZZI, F. RUSSO, E. CHIESA, I. SCORZATO, S. GRANDESSO, A. BESSEGATO, A. FIORAVANTI UND A. CAPRIOLI (2007)

A family outbreak of *Escherichia coli* O157 haemorrhagic colitis caused by pork meat salami. Epidemiol. Infect. 135, 311-314

COOKSON, A. L., S. C. S. TAYLOR, J. BENNETT, F. THOMSON-CARTER UND G. T. ATTWOOD (2006)

Serotypes and analysis of distribution of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from cattle and sheep in the lower North Island, New Zealand. N.Z. Vet. J. 54, 78-84

CORTÉS, C., R. DE LA FUENTE, J. BLANCO, M. BLANCO, J. E. BLANCO, G. DHABI, A. MORA, P. JUSTEL, A. CONTRERAS, A. SÁNCHEZ, J. C. CORRALES UND J. A. ORDEN (2005)

Serotypes, virulence genes and intimin types of verotoxin-producing *Escherichia coli* and enteropathogenic *E. coli* isolated from healthy dairy goats in Spain. Vet. Microbiol. 110, 67-76

CRAY, W.C. JR UND H. W. MOON (1995)

Experimental infection of calves and adult cattle with *Escherichia coli* O157:H7. Appl. Environ. Microbiol. 61, 1586-1590

CRISTANCHO, L., R. P. JOHNSON, S. A. MCEWEN UND C. L. GYLES (2008)

Escherichia coli O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* in white veal calves. Vet. Microbiol. 126, 200-209

CRUMP J. A., A. C. SULKA, A. J. LANGER, C. SCHABEN, A. S. CRIELLY, R. GAGE, M. BAYSINGER, M. MOLL, G. WITHERS, D. M. TONEY, S. B. HUNTER, R. M. HOEKSTRA, S. K. WONG, P. M. GRIFFIN UND T. J. VAN GILDER (2002)

An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections among visitors to a dairy farm. N. Engl. J. Med. 347, 555-560

DAVID, A. (2012)

Unter Rehen – Biologie, Bejagung, Hege. Müller Rüschnikon Verlag, Stuttgart, 1. Auflage, ISBN 978-3-275-01845-1

DHANASHREE, B. UND P. S. MALLYA (2008)

Detection of shiga-toxigenic *Escherichia coli* (STEC) in diarrhoeagenic stool and meat samples in Mangalore, India. Indian J. Med. Res. 128, 271-277

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

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

DEUTZ, A. (2000)

Die 10 Gebote für die Wildbrethygiene. Tagung für die Jägerschaft 15. und 16. Februar 2000, Tagungsband, BAL Gumpenstein, Eigenverlag, 9-14

DEUTZ, A., J. GASTEINER, K. BUCHGRABER, F. VÖLK UND B. HALLER (2009)

Fütterung von Reh- und Rotwild – Ein Praxisratgeber. Leopold Stocker Verlag, Graz, ISBN 978-3-7020-1216-8

DEUTZ, A., F. VÖLK, P. PLESS, H. FÖTSCHL UND P. WAGNER (2006)

Wildfleischhygienische Aspekte zu Stöberjagden auf Rot- und Rehwild. Arch. Lebensmittelhyg. 57, 197-202

DIEPOLDER H. (2008)

Nachweis pathogener Mikroorganismen in Wildfleisch.

http://www.lgl.bayern.de/lebensmittel/warengruppen/wc_06_fleisch/ue_2008_wildfleisch.htm? Zugriff am: 24.03.2013

DJORDJEVIC, S. P., M. A. HORNITZKY, G. BAILEY, P. GILL, B. VANSELOW, K. WALKER UND K. A. BETTELHEIM (2001)

Virulence properties and serotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from healthy Australian slaughter-age sheep. J. Clin. Microbiol. 39, 2017-2021

DJORDJEVIC, S. P., V. RAMACHANDRAN, K. A. BETTELHEIM, B. A. VANSELOW, P. HOLST, G. BAILEY UND M. A. HORNITZKY (2004)

Serotypes and virulence gene profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from feces of pasture-fed and lot-fed sheep. Appl. Environ. Microbiol. 70, 3910–3917

DJV (DEUTSCHER JAGDSCHUTZVERBAND) (2012A)

Das Reh. http://www.jagdnetz.de/naturschutz/einmaleins/?meta_id=92. Zugriff am: 10.09.2012

DJV (DEUTSCHER JAGDSCHUTZVERBAND) (2012B)

Jahresstrecke Rehwild. http://medienjagd.test.newsroom.de/201011_strecke_rehwild2.pdf. Zugriff am: 10.09.2012

DJV (DEUTSCHER JAGDSCHUTZVERBAND) (2012C)

Wildbretaufkommen 2010/2011.

http://medienjagd.test.newsroom.de/201011_wildbretaufkommen2.pdf. Zugriff am: 10.09.2012

DJV (DEUTSCHER JAGDSCHUTZVERBAND) (2012d)

Wildbretaufkommen 2009/2010.

<http://medienjagd.test.newsroom.de/wildbretaufkommen20092010.pdf>.

Zugriff am: 10.09.2012

DJV (DEUTSCHER JAGDSCHUTZVERBAND) (2012E)

Wildbretaufkommen 2008/2009.

http://www.jagdnetz.de/datenundfakten/zahldatenfakten?meta_id=1526.

Zugriff am: 10.09.2012

DONNENBERG, M. S., J. YU UND J. B. KAPER (1993)

A second chromosomal gene necessary for intimate attachment of enteropathogenic *Escherichia coli* to epithelial cells. J. Bacteriol. 175, 4670 – 4680

DÖPFER, D., L. GEUE, J. DE BREE UND M. C. M. DE JONG (2006)

Dynamics of verotoxin-producing *Escherichia coli* isolated from German beef cattle between birth and slaughter. Prev. Vet. Med. 73, 229-240

DUNN, J. R., J. E. KEEN, D. MORELAND UND R. A. THOMPSON (2004)

Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 in white-tailed deer from Louisiana. J. Wildl. Dis. 40 (2), 361-365

EGGERT, M. (2011)

Nachweis und Charakterisierung von Shigatoxin-bildenden *Escherichia coli* in Wildwiederkäuern. Vet. Med. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München

EGGERT, M., E. STÜBER, M. HEURICH, M. FREDRIKSSON-AHOMAA, Y. BURGOS, L. BEUTIN UND E. MÄRTLBAUER (2012)

Detection and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in faeces and lymphatic tissue of free-ranging deer. Epidemiol. Infect., 141, 251-259

ELLERBROEK, L., T. ALTER, R. JOHNE, K. NÖCKLER, L. BEUTIN UND R. HELMUTH (2009)

Aufgaben der veterinärmedizinischen Referenzlaboratorien im Bereich der lebensmittelbedingten Zoonosen. Bundesgesundheitsbl. – Gesundheitsforsch – Gesundheitsschutz 52, 208-213

ELLIOT, S. J., L. A. WAINRIGHT, T. K. MCDANIEL, K. G. JARVIS, Y. DENG, L.-C. LAI, B. P. MCNAMARA, M. S. DONNENBERG UND J. B. KAPER (1998)

The complete sequence of the locus of enterocyte effacement (LEE) from enteropathogenic *E. coli* E2348/69. Mol. Microbiol. 28, 1-4

ESPIÉ E., F. GRIMONT, V. VAILLANT, M. P. MONTET, I. CARLE, C. BAVAI, H. DE VALK UND C. VERNOZY-ROZAND (2006)

O148 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* outbreak: microbiological investigation as a useful complement to epidemiological investigation. Clin. Microbiol. Infect. 12, 992-998

ETHELBERG S., B. SMITH, M. TORPDAHL, M. LISBY, J. BOEL, T. JENSEN, E. MØLLER-NIELSEN UND K. MØLBAK (2009)

Outbreak of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* Infection from consumption of beef sausage. Clin. Infect. Dis. 48, 78–81

EFSA (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY) (2007)

Monitoring of verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) and identification of human pathogenic VTEC types – Scientific opinion of the panel on biological hazards. The EFSA J. 579, 1-61

EFSA (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY) (2009)

The community summary report on trends and sources of zoonoses and zoonotic agents in the European Union in 2007. The EFSA J. 223

EFSA (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY) (2012)

Die EFSA erklärt Zoonosen: Der Zoonoseerreger *E. coli*. Institutionelle Veröffentlichung, ISBN 978-92-9199-443-4

FEHLHABER, K. UND T. ALTER (1999)

Mikrobielle Folgen prämortaler Belastungen bei Schlachtschweinen. Fleischwirtsch. 6, 86

FENG, P. C. UND P. A. HARTMANN (1982)

Fluorogenic assays for immediate confirmation of *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol., 43, 1320-1329

FENG, P., M. DEY, A. ABE UND T. TAKEDA (2001)

Isogenic strain of *Escherichia coli* O157:H7 that has lost both Shiga toxin 1 and 2 genes. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 8, 711-717

FENG, P. C. H., K. JINNEMAN, F. SCHEUTZ UND S. R. MONDAY (2011)

Specificity of PCR and serological assays in the detection of *Escherichia coli* Shiga toxin subtypes. Appl. Environ. Microbiol. 77, 6699-6702

FETT, W. F. (2000)

Naturally occurring biofilms on alfalfa and other types of sprouts. J. Food Prot., 63, 625-632

FIALA-KÖCK B. (2012)

Jagd zwischen Tradition und Zukunft. Was nehmen wir mit? 18. Österreichische Jägertagung 2012, ISBN 978-3-902559-71-5, 79-82.

FISCHER, J. R., T. ZHAO, M. P. DOYLE, M. R. GOLDBERG, C. A. BROWN, C. T. SEWELL, D. M. KAVANAUGH UND C. D. BAUMANN (2001)

Experimental and field studies of *Escherichia coli* O157:H7 in white-tailed deer. Appl. Environ. Microbiol. 67 (3), 1218-1224

FITZHENRY, R. J., D. J. PICKARD, E. L. HARTLAND, S. REECE, G. DOUGAN, A. D. PHILLIPS UND G. FRANKEL (2002)

Intimin type influences the site of human intestinal mucosal colonisation by enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. Gut. 50, 180-185

FLI (FRIEDRICH-LÖFFLER-INSTITUT) (2010)

Informationen des Friedrich-Löffler-Institutes - Enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC) / Shiga-Toxin produzierende *E. coli* (STEC).

http://www.fli.bund.de/fileadmin/dam_uploads/images/Presse_Forschung/110607_FLI_EHEC_Information.pdf. Zugriff am: 25.03.2013

FLI (FRIEDRICH-LÖFFLER-INSTITUT) (2011)

Nationales Referenzlabor für Verotoxin-bildende *Escherichia coli* (VTEC) - Institut für Epidemiologie.

<http://www.fli.bund.de/de/startseite/institute/institut-fuer-epidemiologie/referenzlabore/nrl-fuer-vtec.html>. Zugriff am: 04.01.2013

FLI (FRIEDRICH-LÖFFLER-INSTITUT) (2012)

Jahresbericht 2011. Druckhaus Panzig, Greifswald, 66-69

FOSTER, J. W. (2004)

Escherichia coli acid resistance: tales of an amateur acidophile. Nat. Rev. Microbiol. 2, 898-907

FRASER, M. E., M. FUJINAGA, M. M. CHERNEY, A. R. MELTON-CELSA, E. M. TWIDDY, A. D. O'BRIEN UND M. N. JAMES (2004)

Structure of Shiga toxin type 2 (Stx2) from *Escherichia coli* O157:H7. J. Biol. Chem. 279, 27511-27517

FRATAMICO, P.M., L. K. BAGI, E. J. BUSH UND B. T. SOLOW (2004)

Prevalence and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in swine feces recovered in the National Animal Health Monitoring System's Swine 2000 study. Appl. Environ. Microbiol. 70, 7173-7178

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

Escherichia coli harboring Shiga toxin 2 gene variants: frequency and association with clinical symptoms. J. Infect. Dis. 185, 74-84

FRIEDRICH, A.W., J. BORELL, M. BIELASZEWSKA, A. FRUTH, H. TSCHÄPE UND H., KARCH (2003)

Shiga toxin 1c-producing *Escherichia coli* strains: phenotypic and genetic characterization and association with human disease. J. Clin. Microbiol. 41, 2448-2453

FRÖHLICH, J., G. BALJER UND C. MENGE (2009)

Maternally and naturally acquired antibodies to Shiga toxins in a cohort of calves shedding Shiga-toxigenic *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol. 75, 3695-3704

FRÖLICH, K. (2001)

Untersuchungen zur Epidemiologie ausgewählter Infektionskrankheiten bei Wildtieren. Habilitationsschrift, Institut für Zoo- und Wildtierforschung (IZW) im Forschungsverbund Berlin e.V.

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

Infektionen des Menschen durch enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC) in der Bundesrepublik Deutschland von 1998 bis 2001. Bundesgesundhbl – Gesundheitsforsch. - Gesundheitsschutz. 45, 715-721

FUKUYAMA, M., R. YOKOYAMA, S. SAKATA, K. FURUHATA, K. OONAKA, M. HARA, Y. SATOH, K. TABUCHI, T. ITOH, A. KAI UND M. MATSUDA (1999)

Study on the verotoxin-producing *Escherichia coli* – isolation of the bacteria from deer dung. Kansenshogaku Zasshi, 73, 1140-1144

GANTER, M., C. BENESCH, D. BÜRSTEL, S. ENNEN, K.-H. KAULFUß, K. MAYER, U. MOOG, E. MOORS, B. SEELIG, D. SPENGLER, H. STROBEL, P. TEGTMEYER, K. VOIGT UND H. W. WAGNER (2012)

Empfehlung für die Haltung von Schafen und Ziegen der Deutschen Gesellschaft für die Krankheiten der kleinen Wiederkäuer, Fachgruppe der DVG – Teil 1. Tierärztliche Praxis Großtiere 5, 314-325

GARBER L.P., S. J. WELLS, D. D. HANCOCK, M. P. DOYLE, J. TUTTLE, J. A. SHERE UND T. ZHAO (1995)

Risk factors for fecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in dairy calves. J. Am. Vet. Med. Assoc. 207, 46–49

GARCIA-ALJARO, C., M. MUNIESA, J. E. BLANCO, M. BLANCO, J. BLANCO, J. JOFRE UND A. R. BLANCH (2005)

Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from aquatic environments. FEMS Microbiol. Lett. 246, 55–65

GARCIA-ALJARO, C., M. MUNIESA, J. JOFRE UND A. R. BLANCH (2006)

Newly identified bacteriophages carrying the stx2g Shiga toxin gene isolated from *Escherichia coli* strains in polluted waters. FEMS Microbiol. Lett. 258, 127–135

GARCÍA-SÁNCHEZ, A., S. SÁNCHEZ, R. RUBIO, G. PEREIRA, J. M. ALONSO, J. HERMOSO DE MENDOZA UND J. REY (2007)

Presence of Shiga toxin-producing *E. coli* O157:H7 in a survey of wild artiodactyls. Vet. Microbiol. 121, 373-377

GARRIDO, P., M. BLANCO, M. MORENO-PAZ, C. BRIONES, G. DAHBI, J. BLANCO, J. BLANCO UND V. PARRO (2006)

STEC-EPEC oligonucleotide microarray: a new tool for typing genetic variants of the LEE pathogenicity island of human and animal Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC) strains. Clin. Chem. 52, 192-201

GAUTHIER, A. UND B. B. FINLAY (2002)

Type III secretion system inhibitors are potential antimicrobials. *ASM News* 68, 383 - 387

GERBER, A., H. KARCH, F. ALLERBERGER, H. M. VERWEYEN UND L. B. ZIMMERHACKL (2002)

Clinical Course and the Role of Shiga Toxin–Producing *Escherichia coli* infection in the Hemolytic-Uremic Syndrome in Pediatric Patients, 1997–2000, in Germany and Austria: A Prospective Study. *J. Infect. Dis.* 186, 493–500

GEUE, L., M. SEGURA-ÁLVAREZ, F. J. CONRATHS, T. KUCZIUS, J. BOCKEMÜHL, H. KARCH UND P. GALLIEN (2002)

A long-term study on the prevalence of shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) on four German cattle farms. *Epidemiol. Infect.* 129, 173–185

GILBREATH, J. J., M. S. SHIELDS, R. L. SMITH, L. D. FARRELL, P. P. SHERIDAN UND K. M. SPIEGEL (2009)

Shiga toxins, and the genes encoding them, in fecal samples from native Idaho Ungulates *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 862–865

GOBIUS, K. S., G. M. HIGGS UND P. M. DESMARCHELIER (2003)

Presence of activatable Shiga toxin genotype (stx_{2d}) in Shiga toxigenic *Escherichia coli* from livestock sources. *J. Clin. Microbiol.* 41, 3777–3783

GOLL, M. (2006)

Nachweis und DNA-Fingerprinting von *Escherichia coli* O157-Stämmen bei Pferden. *Vet. Med. Dissertation*, Justus-Liebig-Universität Gießen, ISBN 3-89687-033-5

GRIF, K., D. ORTH, M. P. DIERICH UND R. WÜRZNER (2007)

Comparison of an immunochromatographic rapid test with enzyme-linked immunosorbent assay and polymerase chain reaction for the detection of Shiga toxins from human stool samples. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 59, 97–99

GRIFFIN, P.M. UND R. V. TAUXE (1991)

The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. *Epidemiol. Rev.* 13, 60–98

GROßMANN, K., B. WENIGER, G. BALJER, B. BREINIG UND L. H. WIELER (2005)

Racing, ornamental and city pigeons carry Shiga toxin producing *Escherichia coli* (STEC) with different Shiga toxin subtypes, urging further analysis of their epidemiological role in the spread of STEC. *Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr.* 118, 456–463

GROUVEN, U., R. BENDER, A. ZIEGLER UND S. LANGE (2007)

Der Kappa-Koeffizient. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 132, 65–68

GYLES, C. L., J. F. PRESCOTT, G. SONGER UND C. O. THOEN (2004)

Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals. Blackwell Verlag, Iowa, 3. Auflage, ISBN 0-8138-2939-9, 193–206

GYLES, C. L. (2007)

Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: An overview. J. Anim. Sci. 85, E45-E62

HABERMEHL, K.-H. (1985)

Altersbestimmung bei Wild- und Pelztieren – Möglichkeiten und Methoden – Ein praktischer Leitfaden für Jäger, Biologen und Tierärzte. Paul Parey Verlag, Hamburg und Berlin, 2. Auflage, ISBN 3-490-06812-2, 38-45

HADLOK, R. M (1993): ZITAT IN KUJAWSKI, O. G. (1993)

Den Waidwundschuss riecht und schmeckt man. Jäger 2, 60-61

HANCOCK D.D., T. E. BESSER, D. H. RICE, D. E. HERRIOT UND P. I. TARR (1997)

A longitudinal study of *Escherichia coli* O157 in fourteen cattle herds. Epidemiol. Infect. 118, 193–195

HANCOCK, D. D., T. E. BESSER, D. H. RICE, E. D. EBEL, D. E. HERRIOTT UND L. V. CARPENTER (1998)

Multiple sources of *Escherichia coli* O157 in feedlots and dairy farms in the northwestern USA. Prev. Vet. Med. 35, 11-19

HAYASHI, T., K. MAKINO, M. OHNISHI, K. KUROKAWA, K. ISHII, 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. KUCHARA, T. SHIBA, M. HATTORI UND H. SHINAGAWA (2001)

Complete genome sequence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and genomic comparison with a laboratory strain K-12. DNA Res. 8, 11-22

HEUVELINK, A. E., C. VAN HEERWAARDEN, J. T. M. ZWARTKRUIS-NAHUIS, R. VAN OOSTEROM, K. EDNIK, Y. T. VAN DUYNHOVEN UND E. DE BOER (2002)

Escherichia coli O157 infection associated with a petting zoo. Epidemiol. Infect., 129, 295-302

HOFER, E., N. CERNELA UND R. STEPHAN (2012)

Shiga toxin subtypes associated with Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from red deer, roe deer, chamois, and ibex. Foodborne Pathog. Dis. 9, 792-795

HOFMANN, R. R. (2007)

Wildtiere in Bildern zur vergleichenden Anatomie. M.&H. Schaper GmbH, Hannover. 1. Auflage, ISBN 978-3-7944-0214-4, 42-75

HOLT, J. G., N. R. KRIEG, P. H. A. SNEATH, J. T. STALEY UND S. T. WILLIAMS (1994)

Bergey's manual of determinative bacteriology. Williams & Wilkins Verlag, 9. Auflage, ISBN 0-683-00603-7, 175-180

HORCAJO, P., G. DOMÍNGUEZ-BERNAL, R. DE LA FUENTE, J. A. RUIZ-SANTA-QUITERIA, UND J. A. ORDEN (2010)

Association of *vt1c* with verotoxin-producing *Escherichia coli* from goats and sheep. J. Vet. Diagn. Invest. 22, 332-334

HUSSEIN, H. S. UND L. M. BOLLINGER (2005)

Prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef cattle. J. Food Prot. 68, 2224-2241

HUSSEIN, H. S. UND T. SAKUMA (2005)

Prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in dairy cattle and their products. J. Dairy Sci. 88, 450-465

HUSSEIN, H. S. UND L. M. BOLLINGER (2008)

Influence of selective media on successful detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in food, fecal, and environmental samples. Foodborne Pathog. Dis. 5, 227-244

IRINO, K., M. A. KATO, T. M. VAZ, I. I. RAMOS, M. A. SOUZA, A. S. CRUZ, T. A. GOMES, M. A. VIEIRA UND B. E. GUTH (2005)

Serotypes and virulence markers of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolated from dairy cattle in São Paulo State, Brazil. Vet. Microbiol. 105, 29-36

ISHII, S., K. P. MEYER UND M. J. SADOWSKY (2007)

Relationship between phylogenetic groups, genotypic clusters, and virulence gene profiles of *Escherichia coli* strains from diverse human and animal sources. Appl. Environ. Microbiol. 73, 5703-5710

ISLAM, M. A., A. S. MONDOL, E. DE BOER, R. R. BEUMER, M. H. ZWIETERING, K. A. TALUKDER UND A. E. HEUVELINK (2008)

Prevalence and genetic characterization of Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* isolates from slaughtered animals in Bangladesh. Appl. Environ. Microbiol. 74, 5415-5421

ITO, H., A. TERAJ, H. KURAZONO, Y. TAKEDA UND M. NISHIBUCHI (1990)

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

ITOH, Y., Y. SUGITA-KONISHI, F. KASUGA, M. IWAKI, Y. HARA-KUDO, N. SAITO, Y. NOGUCHI, H. KONUMA UND S. KUMAGAI (1998)

Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 present in radish sprouts. Appl. Environ. Microbiol. 64, 1532-1535

JACKSON, M. P., J. W. NEWLAND, R. K. HOLMES UND A. D. O'BRIEN (1987)

Nucleotide sequence analysis of the structural genes for Shiga-like toxin I encoded by bacteriophage 933J from *Escherichia coli*. Microb. Pathog. 2, 147-153

JAMES, C. E., K. N. STANLEY, H. E. ALLISON, H. J. FLINT, C. S. STEWART, R. J. SHARP, J. R. SAUNDERS UND A. J. MCCARTHY (2001)

Lytic and lysogenic infection of diverse *Escherichia coli* and *Shigella* strains with a verocytotoxigenic bacteriophage. Appl. Environ. Microbiol. 67, 4335-4337

JARVIS, K. G. UND J. B. KAPER (1996)

Secretion of extracellular proteins by enterohemorrhagic *Escherichia coli* via a putative type III secretion system. *Infect. Immun.* 64, 4826-4829

JASSON, V., A. RAJKOVIC, L. BAERT, J. DEBEVERE UND M. UYTENDAELE (2009)

Comparison of enrichment conditions for rapid detection of low numbers of sublethally injured *Escherichia coli* O157 in food. *J. Food Prot.* 72, 1862-1868

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 (2003)

Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Montana: bacterial genotypes and clinical profiles. *J. Infect. Dis.* 188, 719-729

JERSE, A. E. UND J. B. KAPER (1991)

The *eae* gene of enteropathogenic *Escherichia coli* encodes a 94-kilodalton membrane protein, the expression of which is influenced by the EAF plasmid. *Infect. Immun.* 59, 4302-4309

JORIS, M.-A., K. VERSTRAETE, K. DE REU UND L. DE ZUTTER (2011)

Loss of *vtx* genes after the first subcultivation step of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157 and non-O157 during isolation from naturally contaminated fecal samples. *Toxins*, 3, 672-677

JÜRGENS, D., M. ÖZEL UND N. B. TAKAISI-KIKUNI (2002)

Production and characterization of *Escherichia coli* enterohemolysin and its effects on the structure of erythrocyte membranes. *Cell. Biol. Int.* 26, 175-186

KAPPELHOFF, W. (1999)

Wildbrethygiene in der jagdlichen Praxis. *Amtstierärztl. Dienst Lebensmittelkontr.* 6, 272-276

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

Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev.* 2, 123-140

KARCH, H. UND T. MEYER (1989)

Single primer pair for amplifying segments of distinct Shiga-like-toxin genes by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 27, 2751-2757

KARCH, H., T. MEYER, H. RÜSSMANN UND J. HEESEMANN (1992)

Frequent loss of Shiga-like toxin genes in clinical isolates of *Escherichia coli* upon subcultivation. *Infect. Immun.* 60, 3464-3467

KARCH, H., H.-I. HUPPERTZ, J. BOCKEMÜHL, H. SCHMIDT, A. SCHWARZKOPF UND R. LISSNER (1997)

Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in Germany. *J. Food Prot.* 60, 1454-1457

KARCH, H. UND B. KÖHLER (1999)

Neue Erkenntnisse zur Molekularbiologie der enterhämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC) O157. *Gesundh. Wes.* 61 (Sonderheft 1), 46-51

KARCH, H., P. I. TARR UND M. BIELASZEWSKA (2005)

Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in human medicine. *Int. J. Med. Microbiol.* 295, 405-418

KARCH, H., A. MELLMANN UND M. BIELASZEWSKA (2009)

Epidemiology and pathogenesis of enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Berl. Münch. Tierarztl. Wochenschr.* 122, 417-424

KARMALI, M. A., B. T. STEELE, M. PETRIC UND C. LIM (1983)

Sporadic cases of haemolytic-uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. *Lancet* 1, 619-620

KARMALI, M. A., C. A. LINGWOOD, M. PETRIC, J. BRUNTON UND C. GYLES (1996)

Maintaining the existing phenotype nomenclatures for *E. coli* cytotoxins. *ASM News* 62, 167-169

KARAMLI, M. A. (2004)

Infection by Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. *Mol. Biotechnol.* 26 (2), 117-122

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 UND P. M. GRIFFIN (2004)

Farm visits and undercooked hamburgers as major risk factors for sporadic *Escherichia coli* O157:H7 infection: data from a case-control study in 5 FoodNet sites. *Clin. Infect. Dis.* 38 Suppl 3, 271-278

KAVANAGH, D., T. H. J. GOODSHIP UND A. RICHARDS (2006)

Atypical haemolytic uraemic syndrome. *Br. Med. Bull.* 77-78, 5-22. Epub 2006 Sep 11

KEENE, W. E., E. SAZIE, J. KOK, D. H. RICE, D. D. HANCOCK, V. K. BALAN, T. ZHAO UND M. P. DOYLE (1997)

An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections traced to jerky made from deer meat. *JAMA* 277 (15), 1229-1231

KENNY, B. UND B. B. FINLAY (1995)

Protein secretion by enteropathogenic *Escherichia coli* is essential for transducing signals to epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 7991 – 7995

KENNY, B., L.-C. LAI, B. B. FINLAY UND M. S. DONNENBERG (1996)

EspA, a protein secreted by enteropathogenic *Escherichia coli*, is required to induce signals in epithelial cells. *Mol. Microbiol.* 20, 313 – 323

KENNY, B., R. DE VINNEY, M. STEIN, D. J. REINSCHIED, E. A. FREY UND B. B. FINLAY (1997)

Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. *Cell* 91, 511 - 520

KILIAN, M. UND P. BÜLOW (1979)

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

KISTLER, W. M., S. MULUGETA UND S. A. MAURO (2011)

Detection of *stx*₁ and *stx*₂ genes in Pennsylvanian white-tailed deer. *Toxins* 3, 640-646

KOBAYASHI, H., T. POHJANVIRTA UND S. PELKONEN (2002)

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

KOCH, C., S. HERTWIG, R. LURZ, B. APPEL UND L. BEUTIN (2001)

Isolation of a lysogenic bacteriophage carrying the *stx* (1 (OX3)) gene, which is closely associated with Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from sheep and humans. *J. Clin. Microbiol.* 39, 3992-3998

KOKAI-KUN, J. F., A. R. MELTON-CELSA UND A. D. O'BRIEN (2000)

Elastase in intestinal mucus enhances the cytotoxicity of Shiga toxin type 2d. *J. Biol. Chem.* 275, 3713-3721

KONOWALCHUK, J., J. I. SPEIRS UND S. STAVRIC (1977)

Vero Response to a Cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 18 (3), 775-779

KRAUSE, G. UND L. BEUTIN (2008)

Bewertung des Virulenzpotentials von Shigatoxin 2e (STX2e) bildenden *E. coli*-Stämmen. BfR, Fortbildung für den öffentlichen Gesundheitsdienst 04.04.2008, 1-19

KRESSE, A. U., K. SCHULZE, C. DEIBEL, F. EBEL, M. ROHDE, T. CHAKRABORTY UND C. A. GUZMÁN (1998)

Pas, a novel protein required for protein secretion and attaching and effacing activities of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 180, 4370-4379

KRUG W. (1998)

Das Töten von Wild – Eine Betrachtung der Fähigkeiten und Kenntnisse der Jäger aus der Sicht des Tierschutzgesetzes. *Amtstierärztl. Dienst Lebensmittelkontr.* 5, 238-241

KRÜGER, A., P. M. LUCCHESI UND A. E. PARMA (2007)

Evaluation of vt 2-subtyping methods for identifying vt 2g in verotoxigenic *Escherichia coli*. *J. Med. Microbiol.* 56, 1474-1478

KRÜGER, A., P. M. A. LUCCESI UND A. E. PARMA (2011)

Verotoxins in bovine and meat verotoxin-producing *Escherichia coli* isolates: type, number of variants, and relationship to cytotoxicity. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 73-79

KUDVA, I. T., P. G. HATFIELD UND C. J. HOVDE (1997)

Characterization of *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* serotypes isolated from sheep. J. Clin. Microbiol. 35, 892-899

KUHNERT, P., P. BOERLIN UND J. FREY (2000)

Target genes for virulence assessment of *Escherichia coli* isolates from water, food and the environment. FEMS Microbiol. Rev. 24, 107-117

KUHNERT, P., C. R. DUBOSSON, M. ROESCH, E. HOMFELD, M. G. DOHERR UND J. W. BLUM (2005)

Prevalence and risk-factor analysis of Shiga toxigenic *Escherichia coli* in faecal samples of organically and conventionally farmed dairy cattle. Vet. Microbiol. 109, 37-45

KUJAWSKI, O. (2009)

Wild und Wilderzeugnisse. AID Infodienst Ernährung, Landwirtschaft, Verbraucherschutz, Bonn, 14. Auflage. ISBN 978-3-8308-0821-3

KURT, F. (2002)

Das Reh in der Kulturlandschaft. Ökologie, Sozialverhalten, Jagd und Hege. Kosmos Verlag, Stuttgart. ISBN 978-3-440-09397-9

LAHTI, E., V. HIRVELÄ-KOSKI UND T. HONKANEN-BUZALSKI (2001)

Occurrence of *Escherichia coli* O157 in reindeer (*Rangifer tarandus*). Vet. Rec. 148, 633-634

LAI, L.-C., L. A. WAINWRIGHT, K. D. STONE UND M. S. DONNENBERG (1997)

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

LATHEM, W. W., T. E. GRYS, S. E. WITOWSKI, A. G. TORRES, J. B. KAPER, P. I. TARR UND R. A. WELCH (2002)

StcE, a metalloprotease secreted by *Escherichia coli* O157:H7, specifically cleaves C1 esterase inhibitor. Mol. Microbiol. 45, 277-288

LEHMANN, S., M. TIMM, H. STEINRÜCK UND P. GALLIEN (2006)

Nachweis von STEC im Kot von Hochwild und in Wildfleischproben. Fleischwirtsch. 4, 93-96

LEOTTA, G. A., N. DEZA, J. ORIGLIA, C. TOMA, I. CHINEN, E. MILIWEBSKY, S. IYODA, S. SOSA-ESTANI UND M. RIVAS (2006)

Detection and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in captive non-domestic mammals. Vet. Microbiol. 118, 151-157

LEUNG, P. H. M., J. S. M. PEIRIS, W. W. S. NG, R. M. ROBINS-BROWNE, K. A. BETTELHEIM UND W. C. YAM (2003)

A newly discovered verotoxin variant, VT 2g, produced by bovine verocytotoxigenic *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol. 69, 7549-7553

LILLEHAUG, A., B. BERGSJØ, J. SCHAU, T. BRUHEIM, T. VIKØREN UND K. HANDELAND (2005)

Campylobacter spp., *Salmonella* spp., Verocytotoxic *Escherichia coli*, and antibiotic resistance in indicator organisms in wild cervids. *Acta vet. scand.* 46, 23-32

LINDGREN, S. W., A. R. MELTON UND A. D. O'BRIEN (1993)

Virulence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O91:H21 clinical isolates in an orally infected mouse model. *Infect. Immun.* 61, 3832-3842

LOCKING, M. E., S. J. O'BRIEN, W. J. REILLY, E. M. WRIGHT, D. M. CAMPBELL, J. E. COIA, L. M. BROWNING UND C. N. RAMSAY (2001)

Risk factors for sporadic cases of *Escherichia coli* O157 infection: the importance of contact with animal excreta. *Epidemiol. Infect.* 127 (2), 215-220

LOCKING, M., L. ALLISON, L. RAE UND M. HANSON (2003)

VTEC in Scotland 2002: enhanced surveillance and reference laboratory data. *SCIEH Wkly. Report* 37, 304-307

MAKI, D. G. (2006)

Don't Eat Spinach – Controlling Foodborne Infectious Disease. *N. Engl. J. Med.* 355, 1952-1955

MARTIN, A. UND L. BEUTIN (2011)

Characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from meat and milk products of different origins and association with food producing animals as main contamination sources. *Int. J. Food Microbiol.* 146, 99-104

MCDANIEL, T. K., K. G. JARVIS, M. S. DONNENBERG UND J. B. KAPER (1995)

A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 92, 1664-1668

MCDONOUGH, P. L., C. A. ROSSITER, R. B. REBHUN, S. M. STEHMAN, D. H. LEIN UND S. J. SHIN (2000)

Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 from cull dairy cows in New York State and comparison of culture methods used during preharvest food safety investigations. *J. Clin. Microbiol.* 38, 318-322

MCMILLAN, M., J. R. DUNN, J. E. KEEN, K. L. BRADY UND T. F. JONES (2007)

Risk behaviors for disease transmission among petting zoo attendees. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 231, 1036-1038

MEAD, P. S., L. SLUTSKER, V. DIETZ, L. F. MCCAIG, J. S. BRESEE, C. SHAPIRO, P. M. GRIFFIN UND R. V. TAUXE (1999)

Food-related illness and death in the United States. *Emerg. Infect. Dis.* 5, 607-625

MELLMANN, A., M. BIELASZEWSKA, L. B. ZIMMERHACKL, R. PRAGER, D. HARMSSEN, H. TSCHÄPE UND H. KARCH (2005)

Enterohemorrhagic *Escherichia coli* in human infection: in vivo evolution of a bacterial pathogen. Clin. Infect. Dis. 41, 785–792

MELLMANN, A., S. LU, H. KARCH, J.-G. XU, D. HARMSSEN, M. A. SCHMIDT UND M. BIELASZEWSKA (2008)

Recycling of Shiga toxin 2 genes in sorbitol-fermenting enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:NM. Appl. Environ. Microbiol., 74, 67-72

MELLMANN, A., D. HARMSSEN, C. A. CUMMINGS, E. B. ZENTZ, S. R. LEOPOLD, A. RICO, K. PROIR, R. SZCZEPANOWSKI, Y. JI, W. ZHANG, S. F. McLAUGHLIN, J. K. HENKHAUS, B. LEOPOLD, M. BIELASZEWSKA, R. PRAGER, P. M. BRZOSKA, R. L. MOORE, S. GUENTHER, J. M. ROTHBERG UND H. KARCH (2011)

Prospective Genomic Characterization of the German Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O104:H4 Outbreak by Rapid Next Generation Sequencing Technology. PLoS One, 6 (7), e22751

MELTON-CELSA, A. R, S. C. DARNELL UND A. D. O'BRIEN (1996)

Activation of Shiga-like toxins by mouse and human intestinal mucus correlates with virulence of enterhemorrhagic *Escherichia coli* O91:H21 isolates in orally infected, streptomycin-treated mice. Infect. Immun. 64, 1569-1576

MELTON-CELSA, A. R, J. E. ROGERS, C. K. SCHMITT, S. C. DARNELL UND A. D. O'BRIEN (1998)

Virulence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in orally-infected mice correlates with the type of toxin produced by the infecting strain. Jpn. J. Med. Sci. Biol. 51 (Suppl.), S108-S114

MELTON-CELSA, A. R., J. F. KOKAI-KUN UND A. D. O'BRIEN (2002)

Activation of Shiga toxin type 2d (Stx2d) by elastase involves cleavage of the C-terminal two amino acids of the A₂ peptide in the context of the appropriate B pentamer. Mol. Microbiol. 43, 207-215

MIKO, A., K. PRIES, S. HABY, K. STEEGE, N. ALBRECHT, G. KRAUSE UND L. BEUTIN (2009)

Assessment of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from wildlife meat as potential pathogens for humans. Appl. Environ. Microbiol. 75, 6462-6470

MØLLER-NIELSEN, E., C. TEGTMEIER, H. J. ANDERSEN, C. GRØNBÆK UND J. S. ANDERSEN (2002)

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

MØLLER-NIELSEN, E., M. N. SKOV, J. J. MADSEN, J. LODAL, J. BRØCHNER JESPERSEN UND D. L. BAGGESEN (2004)

Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* in wild birds and rodents in close proximity to farms. Appl. Environ. Microbiol. 70, 6944-6947

MORA, A., C. LÓPEZ, G. DHABI, A. M. LÓPEZ-BECEIRO, L. E. FIDALGO, E. A. DÍAZ, C. MARTÍNEZ-CARRASCO, R. MAMANI, A. HERRERA, J. E. BLANCO, M. BLANCO UND J. BLANCO (2012)

Seropathotypes, phylogroups, Stx subtypes, and Intimin types of wildlife-carried, Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* strains with the same characteristics as human-pathogenic isolates. Appl. Environ. Microbiol. 78 (8), 2578-2585

MORABITO, S., G. DELL'OMO, U. AGRIMI, H. SCHMIDT, H. KARCH, T. CHEASTY UND A. CAPRIOLI (2001)

Detection and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in feral pigeons. Vet. Microbiol. 82, 275–283

MORRIS, C. E., J.-M. MONIER UND M.-A. JACQUES (1997)

Methods for observing microbial biofilms directly on leaf surfaces and recovering them for isolation of culturable microorganisms. Appl. Environ. Microbiol., 63 (4), 1570-1576

MUNIESA M., J. RECKTENWALD, M. BIELASZEWSKA, H. KARCH UND H. SCHMIDT (2000)

Characterization of a Shiga toxin 2e-converting bacteriophage from an *Escherichia coli* strain of human origin. Infect. Immun. 68, 4850–4855

MUNIESA, M., J. E. BLANCO, M. DE SIMÓN, R. SERRA-MORENO, A. R. BLANCH UND J. JOFRE (2004)

Diversity of stx 2 converting bacteriophages induced from Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from cattle. Microbiology 150, 2959–2971

MUNIESA, M., R. SERRA-MORENO UND J. JOFRE (2004A)

Free Shiga toxin bacteriophages isolated from sewage showed diversity although the stx genes appeared conserved. Environ. Microbiol. 6, 716–725

NASPHV (NATIONAL ASSOCIATION OF STATE PUBLIC HEALTH VETERINARIANS) (2011)

Compendium of measures to prevent disease and injury associated with animals in public settings (Stand: 6. Mai 2011). www.cdc.gov/mmwr/pdf/rr/rr6004.pdf

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

Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin. Microbiol. Rev. 11 (2), 142-201

NAYLOR, S. W., D. L. GALLY UND C. J. LOW (2005)

Enterohaemorrhagic *E. coli* in veterinary medicine. Int. J. Med. Microbiol. 295, 419-441

O'BRIEN, A. D., M. R. THOMPSON, J. R. CANTY UND S. B. FORMAL (1977)

Production of a *Shigella dysenteriae*-like toxin by pathogenic *Escherichia coli*. Abstr. Annu. Meet. Am. Soc. Microbiol. B 103, 32

O'BRIEN, A. D., G. D. LA VECK, M. R. THOMPSON UND S. B. FORMAL (1982)

Production of *Shigella dysenteriae* type 1-like cytotoxin by *Escherichia coli*. J. Infect. Dis. 146, 763-769

O'BRIEN, A. D. UND G. D. LA VECK (1983)

Purification and characterization of a *Shigella dysenteriae* 1-like toxin produced by *Escherichia coli*. Infect. Immun. 40, 675-683

O'BRIEN, A. D., J. W. NEWLAND, S. F. MILLER, R. K. HOLMES, H. W. SMITH UND S. B. FORMAL (1984)

Shiga-like toxin-converting phages from *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic colitis or infantile diarrhea. Science 226, 694-696

O'BRIEN, A. D., M. A. KARMALI UND S. M. SCOTLAND (1994)

A proposal for rationalizing the nomenclature of the *Escherichia coli* cytotoxins. 2nd International Symposium and Workshop on „Verocytotoxin (Shiga-like toxin)-producing *Escherichia coli* infections“. Bergamo, Italien, 27.-30.06.1994

O'BRIEN, S. J., G. K. ADAK UND C. GILHAM (2001)

Contact with farming environment as a major risk factor for Shiga toxin (Vero cytotoxin)-producing *Escherichia coli* O157 infection in humans. Emerg. Infect. Dis. 7 (6), 1049-1051

OBRIG, T. G., C. LOUISE, C. B. LINGWOOD, B. BOYD, L. BARLEY-MALONEY UND T. O. DANIEL (1993)

Endothelial heterogeneity in Shiga toxin receptors and responses. J. Biol. Chem. 268, 15484-15488

OHMURA-HOSHINO, M., S.-T. HO, H. KURAZONO, K. IGARASHI, S. YAMASAKI UND Y. TAKEDA (2003)

Genetic and immunological analysis of a novel variant of Shiga toxin 1 from bovine *Escherichia coli* strains and development of bead-ELISA to detect the variant toxin. Microbiol. Immunol. 47, 717 - 725

OPORTO, B., J. I. ESTEBAN, G. ADURIZ, R. A. JUSTE UND A. HURTADO (2008)

Escherichia coli O157:H7 and Non-O157 Shiga Toxin-producing *E. coli* in healthy cattle, sheep and swine herds in northern Spain. Zoonoses Public Health 55 (2), 73-81

ORDEN, J. A., J. A. RUIZ-SANTA-QUITERIA, M. BLANCO, J. E. BLANCO, A. MORA, D. CID, E. A. GONZÁLEZ, J. BLANCO UND R. DE LA FUENTE (2003)

Prevalence and characterization of vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* isolated from diarrhoeic and healthy sheep and goats. Epidemiol. Infect. 130, 313-321

QSWALD, E., H. SCHMIDT, S. MORABITO, H. KARCH, O. MARCHÈS UND A. CAPRIOLI (2000)

Typing of intimin genes in human and animal enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*: characterization of a new intimin variant. Infect. Immun. 68, 64-71

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

Evaluation of the Duopath Verotoxin test for detection of Shiga toxins in cultures of human stools. J. Clin. Microbiol. 41, 2650-2653

PATHOGENIC *ESCHERICHIA COLI* NETWORK (PEN) (2007)

Methods for detection and molecular characterization of pathogenic *Escherichia coli*.
Herausgeber: J. O'Sullivan, D. J. Bolton, G. Duffy, C. Baylis, R. Tozzoli, Y. Wasteson und
S. Lofdahl, Ashtown Food Research Centre, Irland

PATON, A. W., J. C. PATON, M. W. HEUZENROEDER, P. N. GOLDWATER UND P. A. MANNING (1992)

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. Pathogen.* 13, 225-236

PATON, A. W., L. BEUTIN UND J. C. PATON (1995)

Heterogeneity of the amino-acid sequences of *Escherichia coli* Shiga-like toxin type-I operons. *Gene* 153, 71-74

PATON, A. W. UND J. C. PATON (1996)

Enterobacter cloacae producing a Shiga-like toxin II-related cytotoxin associated with case of hemolytic-uremic syndrome. *J. Clin. Microbiol.* 34, 463-465

PATON, J. C. UND A. W. PATON (1998)

Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 11, 450-479

PERSSON, S., K. E. P. OLSEN, S. ETHELBERG UND F. SCHEUTZ (2007)

Subtyping method for *Escherichia coli* Shiga toxin (verocytotoxin) 2 variants and correlations to clinical manifestations. *J. Clin. Microbiol.* 45, 2020-2024

PIÉRARD, D., L. HUYGHENS, S. LAUWERS UND H. LIOR (1991)

Diarrhoea associated with *Escherichia coli* producing porcine oedema disease verotoxin. *Lancet* 338, 762

PIÉRARD, D., L. VAN DAMME, L. MORIAU, D. STEVENS UND S. LAUWERS (1997)

Virulence factors of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* isolated from raw meats. *Appl. Environ. Microbiol.* 63 (11), 4585-4587

PIÉRARD, D., D. STEVENS, L. MORIAU, H. LIOR UND S. LAUWERS (1997A)

Isolation and virulence factors of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* in human stool samples. *Clin. Microbiol. Infect.* 3, 531-540

PIÉRARD, D., G. MUYLDERMANS, L. MORIAU, D. STEVENS UND S. LAUWERS (1998)

Identification of new verocytotoxin type 2 variant B-subunit genes in human and animal *Escherichia coli* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 36, 3317 – 3322

POLLARD, D. R., W.M. JOHNSON, H. LIOR, S. D. TYLER UND K. R. ROZEE (1990)

Rapid and specific detection of verotoxin genes in *Escherichia coli* by the polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 28, 540-545

PRADEL, N., V. LIVRELLI, C. DE CHAMPS, J.-B. PALCOUX, A. REYNAUD, F. SCHEUTZ, J. SIROT, B. JOLY UND C. FORESTIER (2000)

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

PRADEL, N., Y. BERTIN, C. MARTIN UND V. LIVRELLI (2008)

Molecular analysis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from hemolytic-uremic syndrome patients and dairy samples in France. Appl. Environ. Microbiol. 74, 2118–2128

PRAGER, R., S. ANNEMÜLLER UND H. TSCHÄPE (2005)

Diversity of virulence patterns among Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from human clinical cases – need for more detailed diagnostics. Int. J. Med. Microbiol. 295, 29–38

PRAGER, R., A. FRUTH, U. SIEWERT, U. STRUTZ UND H. TSCHÄPE (2009)

Escherichia coli encoding Shiga toxin 2f as an emerging human pathogen. Int. J. Med. Microbiol. 299, 343–353

PRAGER, R., A. FRUTH, U. BUSCH UND E. TIETZE (2011)

Comparative analysis of virulence genes, genetic diversity, and phylogeny of Shiga toxin 2g and heat-stable enterotoxin ST1a encoding *Escherichia coli* isolates from humans, animals, and environmental sources. Int. J. Med. Microbiol. 301, 181–191

PRITCHARD, G. C., G. WILLSHAW, J. R. BAILEY, T. CARSON UND T. CHEASTY (2000)

Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 on a farm open to the public: outbreak investigation and longitudinal bacteriological study. Vet. Rec. 147, 259–264

PRITCHARD, G. C., S. WILLIAMSON, T. CARSON, J. R. BAILEY, L. WARNER, G. WILLSHAW UND T. CHEASTY (2001)

Wild rabbits – a novel vector for verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157. Vet. Rec. 149, 567

PRITCHARD, G. C., R. SMITH, J. ELLIS-IVERSEN, T. CHEASTY UND G. A. WILLSHAW (2009)

Verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157 in animals on public amenity premises in England and Wales, 1997 to 2007. Vet. Rec. 164, 545–549

RABATSKY-EHR, T., D. DINGMAN, R. MARCUS, R. HOWARD, A. KINNEY UND P. MSHAR (2002)

Deer meat as the source for a sporadic case of *Escherichia coli* O157:H7 infection, Connecticut. Emerg. Infect. Dis. 8 (5), 525–527

RAMACHANDRAN, V., K. BRETT, M. A. HORNITZKY, M. DOWTON, K. A. BETTELHEIM, M. J. WALKER UND S. P. DJORDJEVIC (2003)

Distribution of intimin subtypes among *Escherichia coli* isolates from ruminant and human sources. J. Clin. Microbiol. 41, 5022–5032

RATNAM, S., S. B. MARCH, R. AHMED, G. S. BEZANSON UND S. KASATIYA (1988)

Characterization of *Escherichia coli* serotype O157:H7. J. Clin. Microbiol. 26, 2006-2012

RENTER, D. G., J. M. SARGEANT, S. E. HYGNSTORM, J. D. HOFFMAN UND J. R. GILLESPIE (2001)

Escherichia coli O157:H7 in free-ranging deer in Nebraska. J. Wildl. Dis. 37 (4), 755-760

REY, J., J. E. BLANCO, M. BLANCO, A. MORA, G. DAHBI, J. M. ALONSO, M. HERMOSO, J. HERMOSO, M. P. ALONSO, M. A. USERA, E. A. GONZÁLEZ, M. I. BERNÁRDEZ UND J. BLANCO (2003)

Serotypes, phage types and virulence genes of Shiga-producing *Escherichia coli* isolated from sheep in Spain. Vet. Microbiol. 94, 47-56

REY, J., S. SÁNCHEZ, J. E. BLANCO, J. HERMOSO DE MENDOZA, M. HERMOSO DE MENDOZA, A. GARCÍA, C. GIL, N. TEJERO, R. RUBIO UND J. M. ALONSO (2006)

Prevalence, serotypes and virulence genes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from ovine and caprine milk and other dairy products in Spain. Int. J. Food. Microbiol. 107, 212-217

RICE, D. H., D. D. HANCOCK UND T. E. BESSER (1995)

Verotoxinogenic *E. coli* O157 colonisation of wild deer and range cattle. Vet. Rec. 11, 524

RICE, D. H., K. M. McMENAMIN, L. C. PRITCHETT, D. D. HANCOCK UND T. E. BESSER (1999)

Genetic subtyping of *Escherichia coli* O157 isolates from 41 Pacific Northwest cattle farms. Epidemiol. Infect. 122, 479-484

RICE, D. H., D. D. HANCOCK UND T. E. BESSER (2003)

Faecal culture of wild animals for *Escherichia coli* O157:H7. Vet. Rec. 152, 82-83

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 (1983)

Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. New Engl. J. Med. 308, 681-685

RIORDAN, D. C. R., G. DUFFY, J. J. SHERIDAN, R. C. WHITING, I. S. BLAIR UND D. A. McDOWELL (2000)

Effects of acid adaptation, product pH, and heating on survival of *Escherichia coli* O157:H7 in pepperoni. Appl. Environ. Microbiol. 66, 1726-1729

RKI (ROBERT KOCH-INSTITUT) (1996)

Übersicht: Die Pathovaren von *Escherichia coli* bei Menschen. Epid. Bull. 30, 205-206

RKI (ROBERT KOCH-INSTITUT) (2008A)

Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten 2007.
<http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Jahrbuch/Jahrbuecher/2007.html?nn=2374622>.
Mercedes-Druckerei, Berlin

RKI (ROBERT KOCH-INSTITUT) (2008)

Zum Auftreten mehrerer EHEC-Infektionen nach Rohmilchverzehr in einem Ferienlager. *Epid. Bull.* 2, 16-22

RKI (ROBERT KOCH-INSTITUT) (2010)

SurvStatRKI: Abfrage der Meldedaten nach Infektionsschutzgesetz (IfSG). <http://www3.rki.de/SurvStat/>

RKI (ROBERT KOCH-INSTITUT) (2011)

Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2010. <http://edoc.rki.de/series/infektionsepidemiologische-jahrbuecher/2010/PDF/2010.pdf>. AZ Druck und Datentechnik GmbH, Berlin

RKI (ROBERT KOCH-INSTITUT) (2011A)

Erkrankungen durch Enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC) – RKI-Ratgeber für Ärzte. http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_EHEC.html. Zugriff am: 23.03.2013

RKI (ROBERT KOCH-INSTITUT) (2012)

EHEC O104:H4 Infektionen – Ergebnisse der Post-Ausbruchs-Surveillance nach dem erklärten Ende des Ausbruchs im Sommer 2011. *Epid. Bull.* 36, 355-364

ROGERIE, F., A. MARECAT, S. GAMBADE, F. DUPOND, P. BEAUBOIS UND M. LANGE (2001)

Characterization of Shiga toxin producing *E. coli* and O157 serotype *E. coli* isolated in France from healthy domestic cattle. *Int. J. Food Microbiol.* 63, 217-223

ROLLE, M. UND A. MAYR (1993)

Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre für Tierärzte, Biologen, Agrarwissenschaftler und Interessierte aus benachbarten Fachgebieten. Enke-Verlag, Stuttgart, 6. Auflage, ISBN 3-432-84686-X, 579-593

ROOPNARINE, R. R., D. AMMONS, J. RAMPERSAD UND A. A. ADESIYUN (2007)

Occurrence and characterization of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) strains from dairy farms in Trinidad. *Zoonoses Public Health* 54 (2), 78-85

RUGBJERG, H., E. MØLLER NIELSEN UND J. STRODL ANDERSEN (2003)

Risk factors associated with faecal shedding of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in eight known-infected Danish dairy herds. *Prev. Vet. Med.* 58, 101-113

RÜSSMANN, H., E. KOTHE, H. SCHMIDT, S. FRANKE, D. HARMSSEN, A. CAPRIOLI UND H. KARCH (1995)

Genotyping of Shiga-like toxin genes in non-O157 *Escherichia coli* strains associated with haemolytic uraemic syndrome. *J. Med. Microbiol.* 42, 404-410

SÁNCHEZ, S., A. GARCÍA-SÁNCHEZ, R. MARTÍNEZ, J. BLANCO, J. E. BLANCO, M. BLANCO, G. DAHBI, A. MORA, J. HERMOSO DE MENDOZA, J. M. ALONSO UND J. REY (2009)

Detection and characterisation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* other than *Escherichia coli* O157:H7 in wild ruminants. *Vet. J.* 180, 384-388

SÁNCHEZ, S., R. MARTÍNEZ, J. REY, A. GARCÍA, J. BLANCO, M. BLANCO, J. E. BLANCO, A. MORA, S. HERRERA-LEÓN, A. ECHEITA UND J. M. ALONSO (2010)

Pheno-genotypic characterisation of *Escherichia coli* O157:H7 isolates from domestic and wild ruminants. *Vet. Microbiol.* 142, 445-449

SANDER, A. (2002)

Untersuchungen zum Vorkommen von verotoxinogenen *Escherichia coli* (VTEC) und *Salmonella* spp. in Pferdefaeces und -fleischprodukten. *Vet. Med. Dissertation*, Ludwig-Maximilians-Universität München, ISBN 3-8316-0193-3

SANDHU, K.S., R. C. CLARKE, K. MCFADDEN, A. BROUWER, M. LOUIE, J. WILSON, H. LIOR UND C. L. GYLES (1996)

Prevalence of the *eaeA* gene in verotoxigenic *Escherichia coli* strains from dairy cattle in Southwest Ontario. *Epidemiol. Infect.* 116, 1-7

SARGEANT, J. M., D. J. HAFFER, J. R. GILLESPIE, R. D. OBERST UND S. J. A. FLOOD (1999)

Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 in white-tailed deer sharing rangeland with cattle. *JAVMA* 215 (6), 792-794

SCAIFE, H. R., D. COWAN, J. FINNEY, S. F. KINGHORN-PERRY UND B. CROOK (2006)

Wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) as potential carriers of verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Vet. Rec.* 159, 175-178

SCHEUTZ, F. UND N. A. STROCKBINE (2005)

Genus I. *Escherichia*. In: Garrity, G. M., D. J. Brenner, N. R. Krieg, J. T. Staley (Herausgeber), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Springer, ISBN 978-0-387-95040-2, 607-624

SCHEUTZ, F. UND S. ETHELBERG (2008)

Nordic Meeting on detection and surveillance of VTEC infections in humans. Statens Serum Institut. <http://www.ssi.dk/graphics/dk/diagnostik/Nordic%20VTEC%20Report.pdf>. ISBN: 978-87-89148-79-3

SCHEUTZ, F., L. D. TEEL, L. BEUTIN, D. PIERARD, G. BUVENS, H. KARCH, A. MELLMANN, A. CAPRIOLI, R. TOZZOLI, S. MORABITO, N. A. STROCKBINE, A. R. MELTON-CELSA, M. SANCHEZ, S. PERSSON UND A. D. O'BRIEN (2012)

Multicenter Evaluation of a sequence-based Protocol for subtyping Shiga Toxins and standardizing Stx Nomenclature. *J. Clin. Microbiol.* 50 (9), 2951-2963

SCHMIDT, H., M. MONTAG, J. BOCKEMÜHL, J. HEESESMANN UND H. KARCH (1993)

Shiga-like toxin II-related cytotoxins in *Citrobacter freundii* strains from humans and beef samples. *Infect. Immun.* 61, 534-543

SCHMIDT, H., H. RÜSSMANN, A. SCHWARZKOPF, S. ALEKSIC, J. HEESESMANN UND H. KARCH (1994)

Prevalence of attaching and effacing *Escherichia coli* in stool samples from patients and controls. *Zentralbl. Bakteriol.* 281, 201-213

SCHMIDT H., M. BIELASZEWSKA UND H. KARCH (1999)

Transduction of enteric *Escherichia coli* isolates with a derivative of Shiga-toxin 2-encoding bacteriophage ϕ 3538 isolated from *Escherichia coli* O157:H7. Appl. Environ. Microbiol. 65, 3855–3861

SCHMIDT, H., J. SCHEEF, S. MORABITO, A. CAPRIOLI, L. H. WIELER UND H. KARCH (2000)

A new Shiga toxin 2 variant (Stx2f) from *Escherichia coli* isolated from pigeons. Appl. Environ. Microbiol. 66, 1205-1208

SCHMITT, C. K., M. L. MCKEE UND A. D. O'BRIEN (1991)

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-strain E32511. Infect. Immun. 59, 1065-1073

SCHÖNENBRÜCHER, H. (2006)

Untersuchungen zur Typisierung des *eae*-Gens enterohämorrhagischer und enteropathogener *Escherichia coli*. Vet. Med. Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen

SCHOUTEN, J. M., M. BOUWKNEGT, A. W. VAN DE GIESSEN, K. FRANKENA, M. C. M. DE JONG UND E. A. M. GRAAT (2004)

Prevalence estimation and risk factors for *Escherichia coli* O157 on Dutch dairy farms. Prev. Vet. Med. 64, 49-61

SCHREIBER, C. S. (2008)

Genotypische und phänotypische Charakterisierung von Shigatoxin-bildenden und enterohämorrhagischen *Escherichia coli*-Isolaten von Mensch, Tier, Lebensmittel und Wasser aus Bayern im Zeitraum von 2002 bis 2006. Vet. Med. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München

SCOTLAND, S. M., H. R. SMITH UND B. ROWE (1985)

Two distinct toxins active on Vero cells from *Escherichia coli* O157. Lancet 2, 885-886

SEIDLER, T., J. MAUERSBERGER, M. KRÜGER UND K. FEHLHABER (1999)

Neue Erkenntnisse zu Mechanismen der belastungsbedingten endogenen Kontamination und Konsequenzen für die Keimstreuung im Schlachtkörper von Schweinen. Proc. 40. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG), Eigenverlag der DVG, Gießen, 307-312

SEPEHRISERESHT, S., T. Z. SALEHI, M. SATTARI, H. TADJBAKHSH UND M. M. ASLANI (2009)

Detection of shigatoxigenic *Escherichia coli* from fecal samples of calves and cattle by molecular and serological methods. Comp. Clin. Pathol. 18, 53-57

SHAW, D. J., C. JENKINS, M. C. PEARCE, T. CHEASTY, G. J. GUNN, G. DOUGAN, H. R. SMITH, M. E. WOOLHOUSE UND G. FRANKEL (2004)

Shedding patterns of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* strains in a cohort of calves and their dams on a Scottish beef farm. Appl. Environ. Microbiol. 70, 7456-7465

SHEKARFOROUSH, S., Y. TAHAMTAN UND A. POURBAKHSH (2008)

Detection and frequency of stx 2 gene in *Escherichia coli* O157 and O157:H7 strains isolated from sheep carcasses in Shiraz-Iran. Pak. J. Biol. Sci. 11, 1085-1092

SHINAGAWA, K., M. KANEHIRA, K. OMOE, I. MATSUDA, D.-L. HU, D. A. WIDIASIH UND S. SUGII (2000)

Frequency of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in cattle at a breeding farm and at a slaughterhouse in Japan. Vet. Microbiol. 76, 305-309

SLANEC, T., A. FRUTH, K. CREUZBURG UND H. SCHMIDT (2009)

Molecular analysis of virulence profiles and Shiga toxin genes in food-borne Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol. 75, 6187-6197

SONNTAG, A.-K., M. BIELASZEWSKA, A. MELLMANN, N. DIERKSEN, P. SCHIERACK, L. H. WIELER, M. A. SCHMIDT UND H. KARCH (2005)

Shiga toxin 2e-producing *Escherichia coli* isolates from humans and pigs differ in their virulence profiles and interactions with intestinal epithelial cells. Appl. Environ. Microbiol. 71, 8855-8863

STATENS SERUM INSTITUT (2003)

Verotoxin-producing *E. coli* (VTEC) 2001-2002. Epi-News 20/21

STENUTZ, R., A. WEINTRAUB UND G. WIDMALM (2006)

The structures of *Escherichia coli* O-polysaccharide antigens. FEMS Microbiol. Rev., 30, 382-403

STEPHAN, R., S. SCHUMACHER, S. CORTI, G. KRAUSE, J. DANUSER UND L. BEUTIN (2008)

Prevalence and characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Swiss raw milk cheeses collected at producer level. J. Dairy Sci. 91, 2561-2565

STEPHAN, R. UND L. E. HOELZLE (2000)

Characterization of shiga toxin type 2 variant B-subunit in *Escherichia coli* strains from asymptomatic human carriers by PCR-RFLP. Lett. Appl. Microbiol. 31, 139-142

STEVENS, M. P., P. M. VAN DIEMEN, F. DZIVA, P. W. JONES UND T. S. WALLIS (2002)

Options for the control of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in ruminants. Microbiology 148, 3767-3778

STROCKBINE, N. A., L. R. MARQUES, J. W. NEWLAND, H. W. SMITH, R. K. HOLMES UND A. D. O'BRIEN (1986)

Two toxin-converting phages from *Escherichia coli* O157:H7 strain 933 encode antigenically distinct toxins with similar biologic activities. Infect. Immun. 53, 135-140

STROCKBINE, N. A., M. P. JACKSON, L. M. SUNG, R. K. HOLMES UND A. D. O'BRIEN (1988)

Cloning and sequencing of the genes for Shiga toxin from *Shigella dysenteriae* type 1. J. Bacteriol. 170, 1116-1122

STUBBE, C., M. STUBBE UND W. STUBBE (1996)

Rehwild kennt keine Grenzen! In: Wild und Hund 10, 28-31

STUBBE, C. (1997)

Rehwild – Biologie, Ökologie, Bewirtschaftung. 4. Auflage, Parey Buchverlag, Berlin. ISBN 978-3826384790

STUBBE, C. (2008)

Rehwild: Biologie, Ökologie, Bewirtschaftung. 5. Auflage. Franckh-Kosmos Verlag, Stuttgart. ISBN 978-3440112113

SZABO, R. A., E. C. D. TODD UND A. JEAN (1986)

Method to isolate *Escherichia coli* O157:H7 from food. J. Food Prot. 49, 768-772

TARR, C. L. UND T. S. WHITTAM (2002)

Molecular evolution of the intimin gene in O111 clones of pathogenic *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 184, 479-487

TATSUNO, I., M. HORIE, H. ABE, T. MIKI, K. MAKINO, H. SHINAGAWA, H. TAGUCHI, S. KAMIYA, T. HAYASHI UND C. SASAKAWA (2001)

toxB gene on pO157 of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 is required for full epithelial cell adherence phenotype. Infect. Immun. 69, 6660-6669

TE LOO, D. M., V. W. HINSBERGH, L. P. VAN DEN HEUVEL UND L. A. MONNENS (2001)

Detection of verocytotoxin bound to circulating polymorphonuclear leukocytes of patients with hemolytic uremic syndrome. J. Am. Soc. Nephrol. 12, 800-806

THIEDE, S. UND G. BECKMANN (2004)

Vorkommen und Bedeutung von *Enterobacteriaceae* auf Arzneipflanzen. 1. Mitteilung: Literaturübersicht. Z. Arzn. Gew. Pfl., 2, 63-71

THRAN B.H., H. S. HUSSEIN, M. R. HALL UND S. F. KHAIBOULLINA (2001)

Occurrence of verotoxin-producing *Escherichia coli* in dairy heifers grazing an irrigated pasture, Toxicology 159, 159-169

THOMAS, A., T. CHEASTY, H. CHART UND B. ROWE (1994)

Isolation of Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* serotypes O9ab:H- and O101:H- carrying VT2 variant gene sequences from a patient with haemolytic uraemic syndrome. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 13, 1074-1076

THOMS, B. (1999)

Nachweis von verotoxinbildenden *Escherichia coli* in Rehfleisch. Arch. Lebensmittelhyg. 50, 52-54

TORRES, A. G., X. ZHOU UND J. B. KAPER (2005)

Adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* strains to epithelial cells. Infect. Immun. 73, 18-29

TÓTH, I., H. SCHMIDT, M. DOW, A. MALIK, E. OSWALD UND B. NAGY (2003)

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

TRUMPF, T., A. HERZBERG, J. HIRSCH, A. JENTZEN, B. KRAMER, W. ROHWER, B. VOGELSANG UND G. STENGEL (2000)

Nachweis von Shiga-Toxin bildenden *Escherichia coli* (STEC). Amtstierärztl. Dienst Lebensmittelkontr. Z. 18-21

UEMURA, R., M. SUEYOSHI, M. NAGAYOSHI UND H. NAGATOMO (2003)

Antimicrobial susceptibilities of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from pigs with edema disease in Japan. Microbiol. Immunol. 47, 57-61

VANSELOW, B. A., D. O. KRAUSE UND C. S. MCSEENEY (2005)

The Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, their ruminant hosts, and potential on-farm interventions: a review. Austral. J. Agric. Res. 56, 219–244

VETTORATO, M. P., L. LEOMIL, B. E. C. GUTH, K. IRINO UND A. F. PESTANA DE CASTRO (2003)

Properties of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolates from sheep in the State of São Paulo, Brazil. Vet. Microbiol. 95, 103-109

VIMONT, A., M.-L. DELIGNETTE-MULLER UND C. VERNOZY-ROZAND (2007)

Supplementation of enrichment broths by novobiocin for detecting Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from food: a controversial use. Lett. Appl. Microbiol. 44, 326-331

VU-KHAC, H. UND N. A. CORNICK (2008)

Prevalence and genetic profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from buffaloes, cattle, and goats in central Vietnam. Vet. Microbiol. 126, 356–363

WAHLSTRÖM, H., E. TYSÉN, E. OLSSON ENGVALL, B. BRÄNDSTRÖM, E. ERIKSSON, T. MÖRNER UND I. VAGSHOLM (2003)

Survey of *Campylobacter* species, VTEC O157 and *Salmonella* species in Swedish wildlife. Vet. Rec. 153, 74-80

WALLACE, J. S., T. CHEATSY UND K. JONES (1997)

Isolation of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 from wild birds. J. Appl. Microbiol. 82, 399-404

WEINSTEIN, D. L., M. P. JACKSON, J. E. SAMUEL, R. K. HOLMES UND A. D. O'BRIEN (1988)

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

WERBER, D., S. C. BEHNKE, A. FRUTH, R. MERLE, S. MENZLER, S. GLASER, L. KREIENBROCK, R. PRAGER, H. TSCHÄPE, P. ROGGENTIN, J. BOCKEMÜHL UND A. AMMON (2007)

Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection in Germany – different risk factors for different age groups. Am. J. Epidemiol. 165 (4), 425-434

WIELER, L. H., G. SOBJINSKI, T. SCHLAPP, K. FAILING, R. WEISS, C. MENGE UND G. BALJER (2007)

Longitudinal prevalence study of diarrheagenic *Escherichia coli* in dairy calves. Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. 120, 296-306

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION) (1991)

Report of WHO consultation on „Shiga-like toxin“ producing *Escherichia coli*, with special emphasis on zoonotic aspects, Gießen, 10-12. Dezember 1991. WHO/CDS/VPH/92.103

WÖLFEL, H. (2005)

Biologie des Rehwildes und Konsequenzen für die jagdliche Praxis. Oder: Das Reh ist kein Ungeziefer und der Jäger kein Schädlingsbekämpfer. 11. Österreichische Jägertagung, 15. und 16. Februar 2005, Raumberg-Gumpenstein

YOON, J. W., J. Y. LIM, Y. H. PARK UND C. J. HOVDE (2005)

Involvement of the *Escherichia coli* O157:H7 (pO157) ecf operon and lipid A myristoyl transferase activity in bacterial survival in the bovine gastrointestinal tract and bacterial persistence in farm water troughs. Infect. Immun. 73, 2367-2378

ZHANG, W., M. BIELASZEWSKA, T. KUCZIUS UND H. KARCH (2002)

Identification, characterization, and distribution of a Shiga Toxin 1 gene variant (*stx_{1c}*) in *Escherichia coli* strains isolated from humans. J. Clin. Microbiol. 40 (4), 1441-1446

ZHANG, W. L., B. KÖHLER, E. OSWALD, L. BEUTIN, H. KARCH, S. MORABITO, A. CAPRIOLI, S. SUERBAUM UND H. SCHMIDT (2002A)

Genetic diversity of intimin genes of attaching and effacing *Escherichia coli* strains. J. Clin. Microbiol. 40, 4486-4492

ZHANG, W., M. BIELASZEWSKA, A. W. FRIEDRICH, T. KUCZIUS UND H. KARCH (2005)

Transcriptional analysis of genes encoding Shiga toxin 2 and its variants in *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol. 71, 558-561

ZHENG, J., S. CUI, L. D. TEEL, S. ZHAO, R. SINGH, A. D. O'BRIEN UND J. MENG (2008)

Identification and characterization of Shiga toxin type 2 variants in *Escherichia coli* isolates from animals, food, and humans. Appl. Environ. Microbiol. 74, 5645-5652

ZIMMERHACKL, L. B., A. GERBER, P. PEDIWILLA, J. SCHEIRING, S. MARTINI, D. ORTH, B. PETZLBERGER, W. OBERAIGNER, R. WÜRZNER UND H. KARCH (2007)

Epidemiologie des EHEC assoziierten HUS. Tagungsband II, EHEC-Workshop 2007, Wildbad Kreuth, 9.-11. Mai, 22

ZSCHÖCK, M., H. P. HAMANN, B. KLOPPERT UND W. WOLTER (2000)

Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* in faeces of healthy dairy cows, sheep and goats: prevalence and virulence properties. Lett. Appl. Microbiol. 31, 203-208

ZUCKER, B.-A. UND M. KRÜGER (1998)

Auswirkungen von Transportbelastungen auf den Endotoxingehalt im Blut von Schlachtschweinen. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 111, 208-210

ZWEIFEL, C., J. E. BLANCO, M. BLANCO, J. BLANCO UND R. STEPHAN (2004)

Serotypes and virulence genes of ovine non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Switzerland. Int. J. Food Microbiol. 95, 19-27

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

Phenotypic and genotypic characteristics of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) from Swiss cattle. Vet. Microbiol. 105, 37-45

10. Rechtsvorschriften und Normen

Bundesjagdgesetz

"Bundesjagdgesetz in der Fassung der Bekanntmachung vom 29. September 1976 (BGBl. I S. 2849), das zuletzt durch Artikel 3 des Gesetzes vom 6. Dezember 2011 (BGBl. I S. 2557) geändert worden ist"

Hessisches Jagdgesetz

in der Fassung vom 5. Juni 2001 (GVBl. I S. 271); zuletzt geändert durch Artikel 1 des Gesetzes vom 10. Juni 2011 (GVBl. I S. 293 - 301)

Jagdzeiten in Hessen, gemäß Bundesjagdzeiten-Verordnung und Verordnung über die Änderung der Jagdzeiten vom 09. Juni 2011

Verordnung (EG) Nr. 178/2002 vom 28. Januar 2002

zur Festlegung der allgemeinen Grundsätze und Anforderungen des Lebensmittelrechts, zur Errichtung der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit und zur Festlegung von Verfahren zur Lebensmittelsicherheit, zuletzt geändert durch Anh. Nr. 5.9 ÄndVO (EG) 596/2009 vom 18. 6. 2009 (ABl. Nr. L 188 S. 14)

Verordnung (EG) Nr. 852/2004 vom 29. April 2004

über Lebensmittelhygiene, zuletzt geändert durch Anh. Nr. 6.7. ÄndVO (EG) 219/2009 vom 11. 3. 2009 (ABl. Nr. L 87 S. 109)

Verordnung (EG) Nr. 853/2004 vom 29. April 2004

mit spezifischen Hygienevorschriften für Lebensmittel tierischen Ursprungs, zuletzt geändert durch Art. 1 ÄndVO (EU) 16/2012 vom 11. 1. 2012 (ABl. Nr. L 8 S. 29)

Verordnung (EG) Nr. 854/2004 vom 29. April 2004

mit besonderen Verfahrensvorschriften für die amtliche Überwachung von zum menschlichen Verzehr bestimmten Erzeugnissen tierischen Ursprungs, zuletzt geändert durch Art. 1 ÄndVO (EU) 739/2011 vom 27. 7. 2011 (ABl. Nr. L 196 S. 3)

Verordnung (EG) Nr. 2075/2005 vom 05. Dezember 2005

mit spezifischen Vorschriften für die amtlichen Fleischuntersuchungen auf Trichinen, zuletzt geändert durch Art. 1 ÄndVO (EU) 1109/2011 vom 3. 11. 2011 (ABl. Nr. L 287 S. 23)

Verordnung zur Durchführung von Vorschriften des gemeinschaftlichen Lebensmittelhygienerechts vom 8. August 2007

mit der Verordnung über Anforderungen an die Hygiene beim Herstellen, Behandeln und Inverkehrbringen von Lebensmitteln (Lebensmittelhygiene-Verordnung–LMHV), zuletzt geändert durch Art. 1 VO zur Anp. lebensmittelhygiene- und tierseuchenrechtlicher Vorschriften an den Lissabon-Vertrag vom 14. 7. 2010 (BGBl. I S. 929)

mit der Verordnung über Anforderungen an die Hygiene beim Herstellen, Behandeln und Inverkehrbringen von bestimmten Lebensmitteln tierischen Ursprungs (Tierische Lebensmittel-Hygieneverordnung – Tier-LMHV), zuletzt geändert durch Art. 1 Erste ÄndVO vom 10. 11. 2011 (BGBl. I S. 2233)

mit der Verordnung zur Regelung bestimmter Fragen der amtlichen Überwachung des Herstellens, Behandelns und Inverkehrbringens von Lebensmitteln tierischen Ursprungs (Tierische Lebensmittel-Überwachungsverordnung), zuletzt geändert durch Art. 2 Zweite VO zur Änd. von Vorschriften zur Durchführung des gemeinschaftl. Lebensmittelhygienerechts vom 11. 11. 2010 (BGBl. I S. 1537)

Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch (LFGB) vom 01. September 2005, zuletzt geändert durch Art. 1 Zweite ÄndVO vom 3. 8. 2012 (BGBl. I S. 1708)

Verordnung (EG) Nr. 1069/2009 vom 21. Oktober 2009

mit Hygienevorschriften für nicht für den menschlichen Verzehr bestimmte tierische Nebenprodukte und zur Aufhebung der Verordnung (EG) Nr. 1774/2002 (Verordnung über tierische Nebenprodukte), zuletzt geändert durch Art. 63 ÄndRL 2010/63/EU vom 22. 9. 2010 (ABl. Nr. L 276 S. 33)

Richtlinie 2003/99/EG vom 17. November 2003

zur Überwachung von Zoonosen und Zoonoseerregern und zur Änderung der Entscheidung 90/424/EWG des Rates sowie zur Aufhebung der Richtlinie 92/117/EWG des Rates

Allgemeine Verwaltungsvorschrift über die Erfassung, Auswertung und Veröffentlichung von Daten über das Auftreten von Zoonosen und Zoonoseerregern entlang der Lebensmittelkette (AVV Zoonosen Lebensmittelkette) vom 10. Februar 2012

Infektionsschutzgesetz (IfSG) vom 20. Juli 2000

Gesetz zur Verhütung und Bekämpfung von Infektionskrankheiten beim Menschen, zuletzt geändert durch Art. 5 Abs. 2 G zur Umsetzung des Seearbeitsübereinkommens 2006 der Internationalen Arbeitsorganisation vom 20. 4. 2013 (BGBl. I S. 868)

DIN EN ISO 16654:2001 (November 2001)

Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln – Horizontales Verfahren für den Nachweis von *Escherichia coli* O157

11. Anhang**11.1 Reagenzien für die Mikrobiologie****11.1.1 Oxidase-Reagenz**Herstellung der Etdhidiumbromid-Stammlösung.

100 mg N, N, N', N'- Tetramethyl-1,4-phenylendiammoniumdichlorid

10 ml Aqua dest.

11.2 Puffer und Lösungen für die PCR**11.2.1 TBE-Puffer**Herstellung von 10 x TBE-Puffer

0,5 M Tris-(hydroxymethyl)aminomethan

0,01 M EDTA (Tritiplex II)

Zunächst wird die Einwaage mit 800 ml Aqua bidest. unter Rühren auf einem Magnetrührer für ca. 30 min aufgelöst. Nach vollständiger Auflösung wird mit Aqua bidest. auf 1 l aufgefüllt.

Herstellung von 1 x TBE-Puffer

10 x TBE-Puffer wird im Verhältnis 1:10 mit Aqua bidest. verdünnt.

11.2.2 Gel-Loading-BufferHerstellung der 15 %igen Ficoll-Lösung (schwer löslich)

1,5 g Ficoll

10 ml Aqua bidest. / sterilfiltriert

Herstellung der 5 %igen Bromphenol-Lösung

50 mg Bromphenolblau

1 ml Aqua bidest.

Herstellung der Stammlösung (Gel-Loading-Buffer)

10 ml 15 %ige Ficoll-Lösung

0,25 ml 5 %ige Bromphenolblaulösung

Herstellung der Gebrauchslösung für die Gelelektrophorese

2 µl Stammlösung

8 µl PCR-Amplifikat

11.2.3 Ethidiumbromid-FärbebadHerstellung der Ethidiumbromid-Stammlösung

0,1 g Ethidiumbromid

10 ml Aqua bidest.

Herstellung des Ethidiumbromid-Färbebades

50 µl 1 %ige Ethidiumbromid-Stammlösung

1,5 l Aqua bidest.

11.3

Kenndaten zu den VTEC-ausscheidenden Rehen (n = 68)

Tabelle 40: Kenndaten zu den VTEC-ausscheidenden Rehen (n = 68) mit Angaben zu der Herkunft der Proben, dem genauen Beprobungszeitpunkt, dem Geschlecht und Alter der Rehe.

Tier-nummer	Isolat ¹⁾	Forstamt ²⁾	Revierbezirk	Landkreis	Regierungsbezirk	Erlegungsdatum	Geschlecht ³⁾	Alter
1	Re 1/195-11	Gi	Salzböden	Giessen	Giessen	05.05.2008	m	adult
3	Re 3/194-11	Gi	Krofdorf	Giessen	Giessen	05.05.2008	m	subadult
31	Re 31/192-11	F	Wangershaus	Waldeck-Frankenberg	Kassel	08.10.2008	w	juvenil
47	Re 47/190-11	Gi	Krofdorf	Giessen	Giessen	25.10.2008	m	juvenil
48	Re 48/187-11; Re 48/189-11	Gi	Krofdorf	Giessen	Giessen	25.10.2008	w	juvenil
51	Re 51/183-11	Gi	Krofdorf	Giessen	Giessen	25.10.2008	m	juvenil
58	Re 58/180-11; Re 58/182-11	N	Linsingen	Schwalm-Eder-Kreis	Kassel	05.11.2008	w	adult
60	Re 60/177-11	N	Linsingen	Schwalm-Eder-Kreis	Kassel	05.11.2008	m	juvenil
65	Re 65/175-11; Re 65/176-11	N	Linsingen	Schwalm-Eder-Kreis	Kassel	05.11.2008	w	subadult
67	Re 67/173-11	N	Linsingen	Schwalm-Eder-Kreis	Kassel	05.11.2008	w	subadult
72	Re 72/168-11	B	Lahnthal	Marburg-Biedenkopf	Giessen	07.11.2008	w	adult
73	Re 73/166-11	B	Lahnthal	Marburg-Biedenkopf	Giessen	07.11.2008	w	juvenil
76	Re 76/159-11	B	Lahnthal	Marburg-Biedenkopf	Giessen	07.11.2008	w	adult
80	Re 80/156-11	B	Lahnthal	Marburg-Biedenkopf	Giessen	07.11.2008	w	adult
83	Re 83/155-11	B	Lahnthal	Marburg-Biedenkopf	Giessen	07.11.2008	m	juvenil
87	Re 87/153-11	Gi	Hungen	Giessen	Giessen	07.11.2008	w	subadult
94	Re 94/150-11	N	Hulsa	Schwalm-Eder-Kreis	Kassel	13.11.2008	w	adult
101	Re 101/148-11	Gi	Grünberg	Giessen	Giessen	15.11.2008	m	juvenil
102	Re 102/145-11; Re 102/147-11	Gi	Reiskirchen	Giessen	Giessen	15.11.2008	w	subadult
107	Re 107/140-11; Re 107/141-11	N	Otttrau	Schwalm-Eder-Kreis	Kassel	20.11.2008	w	adult
110	Re 110/137-11	N	Otttrau	Schwalm-Eder-Kreis	Kassel	20.11.2008	w	subadult
113	Re 113/136-11	N	Otttrau	Schwalm-Eder-Kreis	Kassel	20.11.2008	w	adult
115	Re 115/133-11; Re 115/134-11	N	Otttrau	Schwalm-Eder-Kreis	Kassel	20.11.2008	w	adult
121	Re 121/131-11	M	Schwarzenberg/Kirchhof	Schwalm-Eder-Kreis	Kassel	21.11.2008	m	juvenil

Tabelle 40: Fortsetzung.

Tier-nummer	Isolat ¹⁾	Forstamt ²⁾	Revierbezirk	Landkreis	Regierungsbezirk	Erlegungsdatum	Geschlecht ³⁾	Alter
122	Re 122/128-11	Gi	Reiskirchen	Gießen	Gießen	23.11.2008	m	juvenil
128	Re 128/126-11	H	Struth	Lahn-Dill-Kreis	Gießen	26.11.2008	w	adult
130	Re 130/123-11; Re 130/125-11	H	Struth	Lahn-Dill-Kreis	Gießen	26.11.2008	w	juvenil
132	Re 132/117-11	Ni	Oberlais	Wetteraukreis	Darmstadt	27.11.2008	m	juvenil
146	Re 146/103-11	Ni	Oberlais	Wetteraukreis	Darmstadt	27.11.2008	w	juvenil
147	Re 147/99-10	Ni	Oberlais	Wetteraukreis	Darmstadt	27.11.2008	w	juvenil
148	Re 148/110-11	Ni	Oberlais	Wetteraukreis	Darmstadt	27.11.2008	m	juvenil
153	Re 153/93-10	F	Louisendorf	Waldeck-Frankenberg	Kassel	28.11.2008	w	juvenil
158	Re 158/92-10	F	Louisendorf	Waldeck-Frankenberg	Kassel	28.11.2008	w	juvenil
160	Re 160/88-10; Re 160/89-10	F	Louisendorf	Waldeck-Frankenberg	Kassel	28.11.2008	w	juvenil
164	Re 164/86-10	Gi	Reiskirchen	Gießen	Gießen	29.11.2008	w	adult
167	Re 167/85-10	Gi	Reiskirchen	Gießen	Gießen	29.11.2008	w	subadult
168	Re 168/80-10	Gi	Reiskirchen	Gießen	Gießen	29.11.2008	w	subadult
176	Re 176/79-10	N	Oberbeisheim / Rensfeld	Schwalm-Eder-Kreis	Kassel	04.12.2008	m	juvenil
183	Re 183/78-10	N	Oberbeisheim / Rensfeld	Schwalm-Eder-Kreis	Kassel	04.12.2008	w	juvenil
188	Re 188/74-10; Re 188/75-10	N	Winchende	Schwalm-Eder-Kreis	Kassel	06.12.2008	w	adult
198	Re 198/72-10	N	Winchende	Schwalm-Eder-Kreis	Kassel	06.12.2008	w	juvenil
202	Re 202/104-10	N	Winchende	Schwalm-Eder-Kreis	Kassel	06.12.2008	w	adult
203	Re 203/71-10	N	Winchende	Schwalm-Eder-Kreis	Kassel	06.12.2008	w	adult
205	Re 205/70-10	N	Winchende	Schwalm-Eder-Kreis	Kassel	06.12.2008	w	k. A.
209	Re 209/69-10	H	Thiergarten	Lahn-Dill-Kreis	Gießen	10.12.2008	w	juvenil
226	Re 226/68-10	B	Münchhausen	Marburg-Biedenkopf	Gießen	12.12.2008	w	juvenil
229	Re 229/63-10	B	Münchhausen	Marburg-Biedenkopf	Gießen	12.12.2008	w	juvenil
238	Re 238/61-10	N	Frielendorf	Schwalm-Eder-Kreis	Kassel	15.12.2008	w	juvenil
240	Re 240/58-10	N	Frielendorf	Schwalm-Eder-Kreis	Kassel	15.12.2008	w	juvenil
252	Re 252/52-10; Re 252/56-10	B	Bracht	Marburg-Biedenkopf	Gießen	09.01.2009	w	juvenil

Tabelle 40: Fortsetzung.

Tier-nummer	Isolat ¹⁾	Forstamt ²⁾	Revierbezirk	Landkreis	Regierungsbezirk	Erlegungsdatum	Geschlecht ³⁾	Alter
258	Re 258/50-10	B	Wohral	Marburg-Biedenkopf	Gießen	09.01.2009	w	adult
261	Re 261/48-10	M	Morschen	Schwalzm-Eder-Kreis	Kassel	10.01.2009	m	juvenil
301	Re 301/47-10	GG	Kühkopf-Knoblochsau	Groß-Gerau	Darmstadt	08.09.2009	m	juvenil
307	Re 307/45-10	GG	Kühkopf-Knoblochsau	Groß-Gerau	Darmstadt	21.09.2009	w	subadult
311	Re 311/42-10; Re 311/44-10	GG	Kühkopf-Knoblochsau	Groß-Gerau	Darmstadt	15.10.2009	w	adult
313	Re 313/41-10	GG	Kühkopf-Knoblochsau	Groß-Gerau	Darmstadt	15.10.2009	m	juvenil
321	Re 321/38-10	H	Scheldewald	Lahn-Dill-Kreis	Gießen	31.10.2009	w	adult
324	Re 324/40-10	H	Siegbach	Lahn-Dill-Kreis	Gießen	06.11.2009	w	adult
325	Re 325/36-10	H	Siegbach	Lahn-Dill-Kreis	Gießen	06.11.2009	m	juvenil
333	Re 333/32-10	w	Beselich	Limburg-Weilburg	Gießen	07.11.2009	w	adult
335	Re 335/31-10	B	Ernsthausen	Waldeck-Frankenberg	Kassel	19.11.2009	w	juvenil
346	Re 346/28-10	Ni	Oberlais	Wetteraukreis	Darmstadt	26.11.2009	w	juvenil
347	Re 347/21-10	Ni	Oberlais	Wetteraukreis	Darmstadt	26.11.2009	m	juvenil
350	Re 350/25-10	Ni	Oberlais	Wetteraukreis	Darmstadt	26.11.2009	w	adult
361	Re 361/16-10	HL	Kautungen	Kassel	Kassel	27.11.2009	w	adult
382	Re 382/108-11	HL	Buchberg	Kassel	Kassel	08.12.2009	w	juvenil
383	Re 383/5-10	HL	Buchberg	Kassel	Kassel	08.12.2009	w	juvenil
405	Re 405/1-10	HL	Wendershausen	Werra-Meißner-Kreis	Kassel	27.01.2010	m	juvenil

¹⁾ Bei sieben Tieren konnten aus dem Kot Isolate mit unterschiedlichen Genkombinationen derektiert werden.

²⁾ B = Burgwald; F = Frankenberg; GG = Groß-Gerau; H = Herborn; HL = Hessisch-Lichtenau; M = Melsungen; N = Neukirchen; Ni = Nidda; W = Weilburg; Gi = Wetterberg

³⁾ w = weiblich; m = männlich

11.4 Ergebnisse der immunologischen Untersuchungen der VTEC-ausscheidenden Rehe

Tabelle 41: Ergebnisse der immunologischen Untersuchungen der VTEC-ausscheidenden Rehe (n = 68).

Tier-nummer	Duopath Verotoxin 1	Duopath Verotoxin 2	Wachstum auf SMAC-Agar ^{1,2)}	Kategorie für SMAC-Agar	EIA ³⁾ BPW ^{4,5)}
1	0	4	0	1	0,02
3	0	2	0	1	0,01
31	0	3	1 S ⁺	2	0,02
47	0	2	0	1	0,01
48	0	2	0	1	0,01
51	0	2	0	1	0,02
58	0	2	0	1	0,02
60	0	2	110 S ⁺	3	0,03
65	0	3	5 S ⁺	2	0,03
67	0	4	2 S ⁺ , 3 S ⁻	2	0,09
72	0	3	0	1	0,04
73	0	4	0	1	0,04
76	2	5	0	1	0,02
80	0	3	0	1	0,02
83	0	5	0	1	0,02
87	2	2	0	1	0,02
94	8	0	58 S ⁺	3	0,55
101	2	2	0	1	0,12
102	0	2	0	1	0,09
107	0	3	0	1	0,07
110	0	3	3 S ⁺	2	0,03
113	0	3	3 S ⁺ /1 S ⁻	2	0,03
115	7	0	8 S ⁺	2	1,85
121	0	3	7 S ⁻	2	0,03
122	4	0	16 S ⁺ /16 S ⁻	3	0,03
128	0	2	2 S ⁺	2	0,04
130	0	4	66 S ⁺	3	0,03
132	0	2	0	1	0,04
146	0	3	0	1	0,02
147	0	4	0	1	0,02

Tabelle 41: Fortsetzung.

Tier- nummer	Duopath Verotoxin 1	Duopath Verotoxin 2	Wachstum auf SMAC- Agar ^{1,2)}	Kategorie für SMAC-Agar	EIA ³⁾ BPW ^{4,5)}
148	2	4	0	1	0,06
153	4	4	2 S ⁺	2	0,04
158	0	5	0	1	0,02
160	0	2	1 S ⁺	2	0,01
164	0	2	52 S ⁺ /1 S ⁻	3	0,02
167	0	4	0	1	0,02
168	0	5	0	1	0,02
176	2	0	19 S ⁺ / > 200 S ⁻	3	0,02
183	0	2	1 S ⁺	2	0,02
188	0	3	0	1	0,02
198	0	3	0	1	0,02
202	0	2	1 S ⁺ /1 S ⁻	2	0,03
203	0	0	23 S ⁺	3	0,14
205	0	2	0	1	0,02
209	0	2	1 S ⁺	2	0,01
226	0	3	0	1	0,02
229	0	3	0	1	0,01
238	6	0	> 200	3	0,03
240	3	0	1 S ⁺	2	0,03
252	0	2	0	1	0,08
258	0	3	> 200	3	0,01
261	0	2	0	1	0,02
301	0	3	0	1	0,01
307	5	0	20 S ⁺	3	0,01
311	6	0	8 S ⁺	2	0,17
313	6	0	23 S ⁺	3	0,03
321	0	3	0	1	0,04
324	0	0	324 S ⁺	3	0,06
325	0	3	0	1	0,02
333	6	0	> 200 S ⁺ /S ⁻	3	0,18

Tabelle 41: Fortsetzung.

Tier-nummer	Duopath Verotoxin 1	Duopath Verotoxin 2	Wachstum auf SMAC-Agar ^{1,2)}	Kategorie für SMAC-Agar	EIA ³⁾ BPW ^{4,5)}
335	5	0	17 S ⁺	3	0,07
346	6	0	210 S ⁺	3	0,05
347	0	2	1 S ⁺	2	0,02
350	3	0	11 S ⁺	3	0,04
361	0	2	0	1	0,01
382	0	2	3 S ⁺	2	0,17
383	4	4	k. A.	k. A.	0,02
405	0	3	k. A.	k. A.	0,01

1) S⁺/S⁻ = Sorbit positiv/Sorbit negativ
2) k. A. = keine Angabe
3) EIA = Enzymimmunassay
4) BPW = Buffered Peptone Water (gepuffertes Peptonwasser)
5) Gelb unterlegten Werte. Diese Proben zeigten einen Extinktionswert < 0,150 auf, jedoch wiesen die jeweiligen Kavitäten im EIA eine distinkte gelbe Verfärbung auf, so dass sie weitergehend molekularbiologisch untersucht wurden

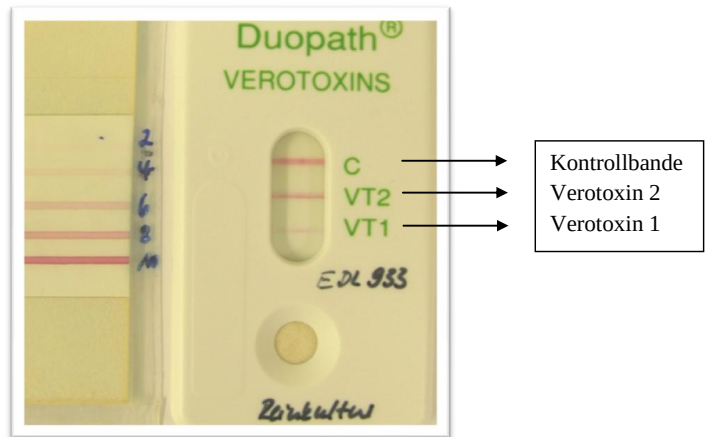


Abbildung 13: Duopath® Verotoxin-Test. Zusätzlich dargestellt ist die Farbskala. Mithilfe dieser erfolgte die Beschreibung der Stärke der rotgefärbten Linien.

Positives Duopath® Verotoxin Test
Ergebnis – bräunliche Banden

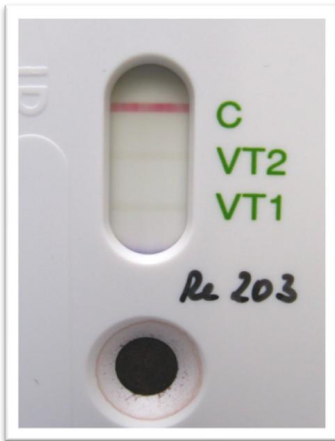


Abbildung 14: Duopath® Verotoxin-Test der Kotprobe Re 203. Dieses Tier konnte als Ausscheider von VTEC identifiziert werden.

Negatives Duopath® Verotoxin Test
Ergebnis – bräunliche Banden



Abbildung 15: Duopath® Verotoxin-Test der Kotprobe Re 200. Dieses Tier konnte als Ausscheider von VTEC nicht identifiziert werden.

Positives Duopath® Verotoxin Test
Ergebnis – rötliche Banden



Abbildung 16: Duopath® Verotoxin-Test der Kotprobe Re 335. Dieses Tier konnte als Ausscheider von VTEC identifiziert werden.

Negatives Duopath® Verotoxin Test
Ergebnis – rötliche Banden



Abbildung 17: Duopath® Verotoxin-Test der Kotprobe Re 195. Dieses Tier konnte als Ausscheider von VTEC nicht identifiziert werden.

11.5

Molekularbiologische und biochemische Ergebnisse der Einzelisolate

Tabelle 42: Ergebnisse der eigenen molekularbiologischen und biochemischen Untersuchungen der Einzelisolate sowie der Untersuchungen aus den Referenzzentren.

Tier- & Isolatr. ¹⁾	Ergebnis MK1/MK2 PCR		vtx 1 ¹⁾ vtx 2 kl. ¹⁾ vtx 2c ¹⁾ vtx 2d ¹⁾ vtx 2e ¹⁾ eae ²⁾					Biochemische Eigenschaften			vtx 1a ¹⁾ vtx 1c ¹⁾ vtx 1d ¹⁾ vtx 2b ¹⁾ vtx 2g ¹⁾ e-hly ^{1,6)} Serovar ⁷⁾																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																													
	+	-	+	-	-	+	-	-	S	F	I	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabelle 42: Fortsetzung.

Tier- nummer ¹⁾	Ergebnis MK1/MK2 PCR		vtx 1 ¹⁾ vtx 2 kl. ¹⁾ vtx 2c ¹⁾ vtx 2d ¹⁾ vtx 2e ¹⁾ eae ²⁾					Biochemische Eigenschaften			vtx 1a ¹⁾ vtx 1c ¹⁾ vtx 1d ¹⁾ vtx 2b ¹⁾ vtx 2g ¹⁾ e-hly ^{1,3)} Serovar ⁴⁾																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
	+	-	+	-	+	-	+	S	F	I	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+

Tabelle 42: Fortsetzung.

Tier- nummer ¹⁾	Ergebnis MK1/MK2 PCR	Biochemische Eigenschaften				Serovar ⁴⁾						
		S	F	I		vx 1a ¹⁾	vx 1c ¹⁾	vx 1d ¹⁾	vx 2b ¹⁾	vx 2g ¹⁾	e-hly ^{1,3)}	
Re 301/47-10	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	O74:H28
Re 307/45-10	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	O74:H28
Re 311/42-10;	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	O174:H8/
Re 311/44-10	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	O21:H21
Re 313/41-10	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	O74:H28
Re 321/38-10	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	O110:H31
Re 324/40-10	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	O36:H14
Re 325/36-10	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	O21:H21
Re 333/32-10	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	ONT:HNM
Re 335/31-10	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	O74:H28
Re 346/28-10	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	O11:H48
Re 347/21-10	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	O36:H14
Re 350/25-10	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	O11:H48
Re 361/16-10	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	O110:H45
Re 382/108-11	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	O1:H7
Re 383/5-10	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	O146:H28
Re 405/1-10	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	O36:H14

¹⁾ In dem Kot einiger Rehe konnten zwei Isolate mit unterschiedlichen Eigenschaften nachgewiesen werden. Diese werden bei den entsprechenden Tieren untereinander dargestellt.

²⁾ Die Ergebnisse der eigenen Untersuchung auf das *eae*-Gen wurden durch die beiden Referenzzentren bestätigt, so dass diese Ergebnisse nur bei den eigenen molekularbiologischen Untersuchungen aufgeführt werden.

³⁾ *e-hly* = Enterohämolysin-Gen

⁴⁾ ONT = O-Antigen nicht typisierbar; HNT = H-Antigen nicht typisierbar; d = EPEC oder EHEC mit Verlust des Verotoxin-Genes.

Gelb unterlegt = molekularbiologischen Ergebnisse der Subtypisierungen aus den eigenen Untersuchungen sowie den Untersuchungen der Referenzzentren.

Tabelle 43: Häufigkeit der untersuchten Virulenzgene in den untersuchten Landkreisen.

Landkreise	Virulenzgene (Σ) ¹⁾								eae	e-hly
	vtx 1	vtx 1a	vtx 1c	vtx 1d	vtx 2b	vtx 2d ²⁾	vtx 2g			
Groß-Gerau	0	1	1	0	1	0	3	0	4	
Wetterau-Kreis	0	0	0	3	1	0	3	0	0	
Main-Kinzig-Kreis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Gießen	0	0	2	1	5	0	6	0	2	
Marburg-Biedenkopf	0	0	0	3	1	0	6	0	1	
Lahn-Dill-Kreis	0	0	1	0	4	1	2	0	3	
Limburg-Weilburg	0	0	1	0	0	0	0	0	1	
Fulda	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Schwalm-Eder-Kreis	1	3	4	2	14	3	0	1	10	
Waldeck-Frankenberg	0	0	1	0	2	1	2	0	3	
Kassel	0	0	0	0	2	0	1	0	2	
Werra-Meißner-Kreis	0	0	0	0	0	0	1	0	1	
GESAMT	1	4	10	9	30	5	24	1	27	

¹⁾ Gelb unterlegten Werte. Diese Werte zeigen die Anzahl der Virulenzgene, die in einem Landkreis gefunden werden konnten.

²⁾ Diese Isolate hatten durch die Subkultivierung zur Archivierung und Versendung der Proben an das Referenzzentrum das *vtx 2d*-Gen verloren, welches in den eigenen Untersuchungen jedoch nachgewiesen werden konnte.

11.6

Rohdaten zur statistischen Berechnung

Tabelle 44: Auflistung der beteiligten Landkreise mit der Anzahl der beprobten Rehe.

Landkreis	Probenanzahl
Fulda	13
Main-Kinzig-Kreis	12
Gießen	29
Groß-Gerau	23
Kassel	29
Werra-Meißner-Kreis	9
Lahn-Dill-Kreis	27
Limburg-Weilburg	6
Marburg-Biedenkopf	41
Schwalm-Eder-Kreis	92
Waldeck-Frankenberg	43
Wetteraukreis	29
Gesamtanzahl	353

Tabelle 45: Übersicht über die landwirtschaftliche Fläche sowie die Waldfläche der jeweiligen Landkreise.

Landkreis	Gemarkungs- fläche, insgesamt (ha)	Land- wirtschaftliche Fläche (ha)	Wald (ha)	% Land- wirtschaftliche Fläche (ha)	% Wald (ha)
Groß-Gerau	45305	21106	11173	46,6	24,7
Wetteraukreis	110071	59126	32217	53,7	29,3
Main-Kinzig-Kreis	139756	54655	60535	39,1	43,3
Gießen	85464	38665	29973	45,2	35,1
Marburg-Biedenkopf	126256	55192	51664	43,7	40,9
Lahn-Dill-Kreis	106652	36538	50597	34,3	47,4
Limburg-Weilburg	73848	34063	25414	46,1	34,4
Fulda	138039	67501	48436	48,9	35,1
Schwalm-Eder-Kreis	153849	76244	54145	49,6	35,2
Waldeck-Frankenberg	184858	78424	84312	42,4	45,6
Kassel	129277	58259	50871	45,1	39,4
Werra-Meißner-Kreis	102470	43862	44444	42,8	43,4

Tabelle 46: Übersicht über die Tierzahlen der einzelnen Landkreise, die landwirtschaftliche Fläche und das Verhältnis Gesamt-Tierzahl zu landwirtschaftlicher Fläche für jeden Landkreis bzw. den entsprechenden Regierungsbezirk.

Landkreis	Regierungs- bezirk	Tieranzahl (n)			Σ	Landwirt- schaftliche Fläche (ha)	Verhältnis Gesamt-Tierzahl zur landwirtschaft- lichen Fläche (Tiere/ha)
		Rind*	Schaf*	Ziege*			
Groß-Gerau	Darmstadt	1.938	1.187	160	3.285	21.106	0,156
Wetterau- kreis		19.968	7.835	937	28.740	59.126	0,486
Main- Kinzig-Kreis		32.137	12.908	1.689	46.734	54.655	0,855
Gießen	Gießen	13.468	9.838	1.039	24.345	38.665	0,630
Marburg- Biedenkopf		29.157	17.599	1.141	47.897	55.192	0,868
Lahn-Dill- Kreis		11.849	13.617	1.848	27.314	36.538	0,748
Limburg- Weilburg		16.976	6.722	669	24.367	34.063	0,715
Fulda	Kassel	65.457	10.892	1.319	77.668	67.501	1,151
Schwalm- Eder-Kreis		32.266	9.706	686	42.658	76.244	0,559
Waldeck- Frankenberg		60.732	14.505	1.565	76.802	78.424	0,979
Kassel		18.321	11.173	1.109	30.603	58.259	0,525
Werra- Meißner- Kreis		18.668	7.702	728	27.098	43.862	0,618

*Daten der Tierseuchenkasse aus 2011

11.7 Sequenzen

Alignment – vtx 2d / vtx 2b Typisierung

		10	20	30	40	50	
1099	A T C G C A G G G C C A C T C T T T A A A T A C A T C C G G A G A A T A A C A G G A G T T A A A T						vtx 2d Sequenz
1099	 T G						vtx 2b Sequenz EH250
998							vtx 2b Sequenz 5293/98
984							vtx 2b Sequenz 24196/97
923	C A A A A T A G A G G						vtx 2d Sequenz C466-01b
1							stx 2b Primer F1
1							stx 2b Primer R1
1							vtx 2d Primer VTAM II
1							vtx 2d Primer VTAM I
		60	70	80	90	100	
1149	A T G A A G A A G A T A T T T G T A G C G G C T T T A T T T G C T T T T G T T T C T G T T A A T G C						vtx 2d Sequenz
1149							vtx 2b Sequenz EH250
1048							vtx 2b Sequenz 5293/98
1034							vtx 2b Sequenz 24196/97
972							vtx 2d Sequenz C466-01b
5							stx 2b Sequenz F1
1							stx 2b Primer R1
1							vtx 2d Primer VTAM II
24							vtx 2d Primer VTAM I
		110	120	130	140	150	
1199	A A T G G C A G C T G A T T T G T G C A A A A G G T A A A A T T G A G T T C T C T A A G T A T A A T G						vtx 2d Sequenz
1199							vtx 2b Sequenz EH250
1098							vtx 2b Sequenz 5293/98
1084							vtx 2b Sequenz 24196/97
1022							vtx 2d Sequenz C466-01b
27							stx 2b Primer F1
1							stx 2b Primer R1
1							vtx 2d Primer VTAMII
24							vtx 2d Primer VTAMI
		160	170	180	190	200	
1249	A G A A T G A T A C A T T T C A C A G T A A A A G T G G C C G G G A A A G A G T A C T G G A C T A A C						vtx 2d Sequenz
1249							vtx 2b Sequenz EH250
1148							vtx 2b Sequenz 5293/98
1134							vtx 2b Sequenz 24196/97
1072							vtx 2d Sequenz C466-01b
27							stx 2b Primer F1
1							stx 2b Primer R1
1							vtx 2d Primer VTAMII
24							vtx 2d Primer VTAMI
		210	220	230	240	250	
1299	C G T T G G A A T C T G C A A C C G C T A C T G C A A A G C G C A C A G T T A A C A G G A A T G A C						vtx 2d Sequenz
1299							vtx 2b Sequenz EH250
1198							vtx 2b Sequenz 5293/98
1184							vtx 2b Sequenz 24196/97
1122							vtx 2d Sequenz C466-01b
27							stx 2b Primer F1
1							stx 2b Primer R1
1							vtx 2d Primer VTAMII
24							vtx 2d Primer VTAMI
		260	270	280	290	300	
1349	G G T A A C A A T C A A A T C A A A T A C C T G T G C G T C A G G T T C A G G A T T T G C T G A A G						vtx 2d Sequenz
1349							vtx 2b Sequenz EH250
1248							vtx 2b Sequenz 5293/98
1234							vtx 2b Sequenz 24196/97
1172	T . C C G A A C						vtx 2d Sequenz C466-01b
27							stx 2b Primer F1
1							stx 2b Primer R1
22							vtx 2d Primer VTAMII
24							vtx 2d Primer VTAMI

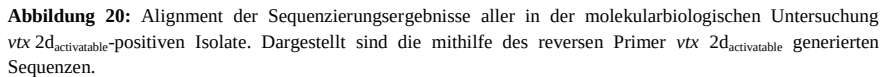
Abbildung 18: Sequenzunterschiede (grau hinterlegt) zwischen den Verotoxin-Subtypen VT 2b und VT 2d. Zusätzlich dargestellt sind die Primersysteme, welche im Rahmen der eigenen Untersuchungen eingesetzt (grün hinterlegt) sowie bei SCHEUTZ ET AL. (2012) zur Subtypisierung des vtx 2b Toxintyps (rot hinterlegt) verwendet wurden. Nähere Erläuterungen siehe Kap. 4.1.8.2.

Abbildung 19: Sequenzunterschiede (grau hinterlegt) zwischen den Verotoxin-Subtypen VT 2 klassisch und VT 2g. Zusätzlich dargestellt sind die Primersysteme, welche im Rahmen der eigenen Untersuchungen eingesetzt (grün hinterlegt) sowie in BEUTIN ET AL. (2007) zur Subtypisierung des vtx 2g Toxintyps (rot hinterlegt) verwendet wurden. Nähere Erläuterungen siehe Kap. 4.1.8.2.

		410	420	430	440	450	
801	C A G A A G C C T T A C G C T T C A G G C A G A T A C A G A G A A T T C G T C A G G C A C T G						vtx 2 Sequenz
753	 G A A						vtx 2g Sequenz
1							GK3 Primer
1							GK4 Primer
20							stx 2g Primer 209F
1							stx 2g Primer 781R
		460	470	480	490	500	
851	T C T G A A A C T G C T C T C T G T G T A T A C G A T G A C G C C G G G A G A C G T G G A C C T C A C						vtx 2 Sequenz
803	 G A						vtx 2g Sequenz
1							GK3 Primer
1							GK4 Primer
29							stx 2g Primer 209F
1							stx 2g Primer 781R
		510	520	530	540	550	
901	T C T G A A C T G G G G G C G A A T C A G C A A T G T G C T T C C G G A G T A T C G G G G A G A G G						vtx 2 Sequenz
853	 A						vtx 2g Sequenz
1							GK3 Primer
1							GK4 Primer
20							stx 2g Primer 209F
1							stx 2g Primer 781R
		560	570	580	590	600	
951	A T G G T G T C A G A G T G G G G A G A A T A T C C T T A A T A A T A T A T C A G C G A T A C T G						vtx 2 Sequenz
903	 A A						vtx 2g Sequenz
1							GK3 Primer
1							GK4 Primer
20							stx 2g Primer 209F
1							stx 2g Primer 781R
		610	620	630	640	650	
1001	G G G A C T G T G G C C G T T A T A C T G A A T T G C C A T C A T C A G G G G G C G C G T T C T G T						vtx 2 Sequenz
953	 A G						vtx 2g Sequenz
1							GK3 Primer
1							GK4 Primer
20							stx 2g Primer 209F
1	 A						stx 2g Primer 781R
		660	670	680	690	700	
1051	T C G C G C C G T G A A T G A A G A G A G T C A A C C A G A A T G T C A G A T A A C T G G C G A C A						vtx 2 Sequenz
1003	 A G						vtx 2g Sequenz
1							GK3 Primer
1							GK4 Primer
20							stx 2g Primer 209F
17							stx 2g Primer 781R
		710	720	730	740	750	
1101	G G C C T G T T A T A A A A T A A C A A T A C A T T A T G G G A A A G T A A T A C A G C T G C A						vtx 2 Sequenz
1053	 A						vtx 2g Sequenz
1							GK3 Primer
1							GK4 Primer
20							stx 2g Primer 209F
17							stx 2g Primer 781R
		760	770	780	790	800	
1151	G C G T T T C T G A A C A G A A A G T C A C A G T T T T T A T A T A C A A C G G G T A A A T - A A A						vtx 2 Sequenz
1103	 G C A G						vtx 2g Sequenz
1							GK3 Primer
1							GK4 Primer
20							stx 2g Primer 209F
17							stx 2g Primer 781R
		810	820	830	840	850	
1200	G G A G T T A A C A T G A A G A A G A T G T T A T G C G G G T T T A T T T G C A T T A G C T T						vtx 2 Sequenz
1153	 G						vtx 2g Sequenz
1							GK3 Primer
1							GK4 Primer
20							stx 2g Primer 209F
17							stx 2g Primer 781R

Abbildung 19: Fortsetzung

Abbildung 19: Fortsetzung



	110	120	130	140	150	
4610	GCGCTAAAGGTTAAATTGAGTTTTC	CAAGTATAATGAGAAATGATACATTC				vtx 2d _{aktivierbar} Sequenz
960						vtx 2d _{aktivierbar} Subunit A
1227	.T.		A.	G.G.	A.C.	vtx 2g Sequenz
18						vtx 2d _{aktivierbar} Primer
100						W 89/11
101	.T.		A.	G.G.	A.C.	Re 48/186
101	.T.		A.	G.G.	A.C.	Re 48/189
101	.T.		A.	G.G.	A.C.	Re 51/184
101	.T.		A.	G.G.	A.C.	Re 72/168
101	.T.		A.	G.G.	A.C.	Re 76/162
101	.T.		A.	G.G.	A.C.	Re 80/156
101	.T.		A.	G.G.	A.C.	Re 83/155
101	.T.		A.	G.G.	A.C.	Re 102/145
101	.T.		A.	G.G.	A.C.	Re 102/147
101	.T.		A.	G.G.	A.C.	Re 132/117
101	.T.		A.	G.G.	A.C.	Re 147/99
101	.T.		A.	G.G.	A.C.	Re 158/92
101	.T.		A.	G.G.	A.C.	Re 167/84
101	.T.		A.	G.G.	A.C.	Re 167/85
101	.T.		A.	G.G.	A.C.	Re 168/80
101	.T.		A.	G.G.	A.C.	Re 209/69
101	.T.		A.	G.G.	A.C.	Re 252/52
101	.T.		A.	G.G.	A.C.	Re 252/56
101	.T.		A.	G.G.	A.C.	Re 301/47
101	.T.		A.	G.G.	A.C.	Re 307/45
101	.T.		A.	G.G.	A.C.	Re 313/41
101	.T.		A.	G.G.	A.C.	Re 324/40
101	.T.		A.	G.G.	A.C.	Re 335/31
101	.T.		A.	G.G.	A.C.	Re 347/21
101	.T.		A.	G.G.	A.C.	Re 382/108
101	.T.		A.	G.G.	A.C.	Re 405/1
	160	170	180	190	200	
4660	ACAGTAAAGTGGCCGGGAAGAATACT	GGACCACTGGGAATCTGCA				vtx 2d _{aktivierbar} Sequenz
960						vtx 2d _{aktivierbar} Subunit A
1277	.T.	G.T.A.		T.A.C.	G.	vtx 2g Sequenz
18						vtx 2d _{aktivierbar} Primer
150						W 89/11
151	.T.	G.T.A.		T.A.C.	G.	Re 48/186
151	.T.	G.T.A.		T.A.C.	G.	Re 48/189
151	.T.	G.T.A.		T.A.C.	G.	Re 51/184
151	.T.	G.T.A.		T.A.C.	G.	Re 72/168
151	.T.	G.T.A.		T.A.C.	G.	Re 76/162
151	.T.	G.T.A.		T.A.C.	G.	Re 80/156
151	.T.	G.T.A.		T.A.C.	G.	Re 83/155
151	.T.	G.T.A.		T.A.C.	G.	Re 102/145
151	.T.	G.T.A.		T.A.C.	G.	Re 102/147
151	.T.	G.T.A.		T.A.C.	G.	Re 132/117
151	.T.	G.T.A.		T.A.C.	G.	Re 147/99
151	.T.	G.T.A.		T.A.C.	G.	Re 158/92
151	.T.	G.T.A.		T.A.C.	G.	Re 167/84
151	.T.	G.T.A.		T.A.C.	G.	Re 167/85
151	.T.	G.T.A.		T.A.C.	G.	Re 168/80
151	.T.	G.T.A.		T.A.C.	G.	Re 209/69
151	.T.	G.T.A.		T.A.C.	G.	Re 252/52
151	.T.	G.T.A.		T.A.C.	G.	Re 252/56
151	.T.	G.T.A.		T.A.C.	G.	Re 301/47
151	.T.	G.T.A.		T.A.C.	G.	Re 307/45
151	.T.	G.T.A.		T.A.C.	G.	Re 313/41
151	.T.	G.T.A.		T.A.C.	G.	Re 324/40
151	.T.	G.T.A.		T.A.C.	G.	Re 335/31
151	.T.	G.T.A.		T.A.C.	G.	Re 347/21
151	.T.	G.T.A.		T.A.C.	G.	Re 382/108
151	.T.	G.T.A.		T.A.C.	G.	Re 405/1

Abbildung 20: Fortsetzung

Abbildung 20: Fortsetzung

-----310-----		
4810	G A C T G A G G C A T A A C	vtx 2d _{aktivierbar} Sequenz
960		vtx 2d _{aktivierbar} Subunit A
1427	 A . A	vtx 2g Sequenz
18		vtx 2d _{aktivierbar} Primer
300		W 89/11
301	 A . A	Re 48/186
301	 A . A	Re 48/189
301	 A . A	Re 51/184
301	 A . A	Re 72/168
301	 A . A	Re 76/162
301	 A . A	Re 80/156
301	 A . A	Re 83/155
301	 A . A	Re 102/145
301	 A . A	Re 102/147
301	 A . A	Re 132/117
301	 A . A	Re 147/99
301	 A . A	Re 158/92
301	 A . A	Re 167/84
301	 A . A	Re 167/85
301	 A . A	Re 168/80
301	 A . A	Re 209/69
301	 A . A	Re 252/52
301	 A . A	Re 252/56
301	 A . A	Re 301/47
301	 A . A	Re 307/45
301	 A . A	Re 313/41
301	 A . A	Re 324/40
301	 A . A	Re 335/31
301	 A . A	Re 347/21
301	 A . A	Re 382/108
301	 A . A	Re 405/1

Abbildung 20: Fortsetzung

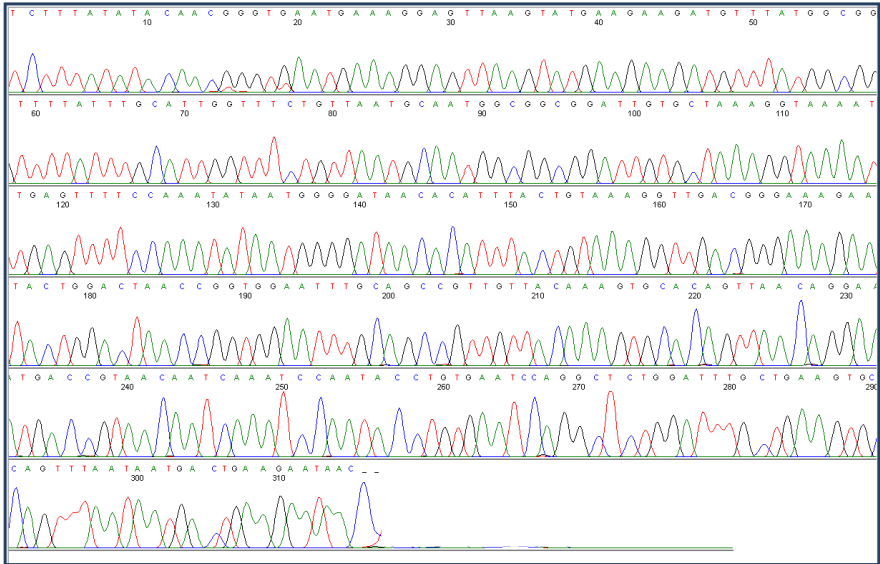
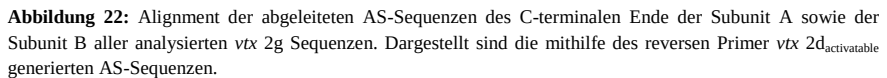


Abbildung 21: Beispielhafte Darstellung eines Elektropherogramms der Probe Re 48. Die Elektropherogramme der anderen 19 Isolate hatten dieselbe Qualität, so dass sie nicht aufgeführt werden. Dargestellt ist eine Sequenz, die mithilfe des reversen Primer stx 2d_{activatable} amplifiziert wurde.



4808	D . G I	vtx 2d _{aktivatable} Sequenz
958		vtx 2d _{aktivatable} Subunit A
1427	. . R . T	vtx 2g Sequenz
16		vtx 2d _{aktivatable} Primer
298	. . .	W 89/11
301	. . R . T	Re 48/186
301	. . R . T	Re 48/189
301	. . R . T	Re 51/184
301	. . S . T	Re 72/168
301	. . R . T	Re 76/162
301	. . R . T	Re 80/156
301	. . R . T	Re 83/155
301	. . R . T	Re 102/145
301	. . R . T	Re 102/147
301	. . R . T	Re 132/117
301	. . R . T	Re 147/99
301	. . R . T	Re 158/92
301	. . R . T	Re 167/84
301	. . R . T	Re 167/85
301	. . R . T	Re 168/80
301	. . R . T	Re 209/69
301	. . R . T	Re 252/52
301	. . R . T	Re 252/56
301	. . R . T	Re 301/47
301	. . R . T	Re 307/45
301	. . R . T	Re 313/41
301	. . R . T	Re 324/40
301	. . R . T	Re 335/31
301	. . R . T	Re 347/21
301	. . R . T	Re 382/108
301	. . R . T	Re 405/1

Abbildung 22: Fortsetzung

Erklärung:

“Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der “Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis” niedergelegt sind, eingehalten.”

Andrea Christine Bartels

Danksagung

Abschließend möchte ich allen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Bülte, der mir das interessante Dissertationsthema zur Verfügung gestellt und mich durch seine stetige Diskussionsbereitschaft bei der Anfertigung der Arbeit unterstützt und angeleitet hat.

Mein weiterer besonderer Dank gilt den bei den Probennahmen beteiligten Forstämtern des Landes Hessen sowie der auf den Jagden involvierten Jägerschaft. Ohne ihre Kooperation und immerwährende Unterstützung während der gesamten Probenentnahmen, wäre eine so enorme Probenanzahl an Tieren nicht zustande gekommen. Zudem erleichterte die stets angenehme Atmosphäre sowie immer wiederkehrende aufheiternde Worte, die doch an manchen Tagen erschwerte Probennahme unter klimatisch strengen Bedingungen. An dieser Stelle möchte ich mich auch bei Sandra Nikolaus, Jorge Fernández Silva, Marta Fischer, Sonja Schmidt, Kristina Babić-Stegelman, den zahlreichen Praktikanten sowie vor allem meinen Lebensgefährten Henrik Wagner für die zahlreiche und zeitintensive Unterstützung während der Probenentnahmen bedanken.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde danke ich für die gute Zusammenarbeit. Insbesondere möchte ich mich bei Frau Claudia Walter, Frau Karin Simon, Frau Cornelia Dürschmidt und Frau Brigitte Marx für die Hilfe bei der Bearbeitung meiner Proben sowie die stets angenehme Arbeitsatmosphäre im Labor bedanken.

Dr. Klaus Failing und besonders Prof. Dr. Horst Brandt danke ich für die immerwährende Beratung und Unterstützung bei der Planung des Projektes sowie auch bei der statistischen Auswertung meiner Daten.

Mein weiterer Dank gilt Herrn Privatdozent Dr. Lothar Beutin vom nationalen Referenzlabor für *Escherichia coli* am Bundesinstitut für Risikobewertung sowie Herrn Prof. Dr. Jorge Blanco vom Referenzzentrum für *E. coli* in Lugo/Spanien für die Serotypisierung der VTEC-Isolate.

Ferner möchte ich mich auch bei meinen Kolleginnen Kim Nguyen, Sandra Weirich, Kristina Babić Stegelmann und Annalena Molitor für die gute Zusammenarbeit, das immer offene Ohr und das angenehme Miteinander bedanken. Stefan Starke danke ich für seine Unterstützung bei vielen molekularbiologischen Fragen und den damit verbundenen fachlichen Diskussionen.

Meiner Familie, meinen Freunden und nicht zu vergessen meinen Tieren möchte ich ganz herzlich dafür danken, dass sie zu jeder Zeit für mich da waren, wenn ich sie gebraucht habe!

Ganz besonders möchte ich mich bei meinem Lebensgefährten Henrik Wagner bedanken. Er hat mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite gestanden und mich immerwährend – ob Tag oder Nacht – unterstützt und aufgemuntert. Schön, dass es dich gibt!

Das Projekt wurde durch das Hessische Ministerium für Umwelt, Energie, Landwirtschaft und Verbraucherschutz gefördert (Referenznummer: 895 1400 10 62 18 301).

ISBN 978-3-86345-204-9



Verlag: Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH
35392 Gießen · Friedrichstraße 17 · Tel. 0641 / 24466 · Fax: 0641 / 25375
E-Mail: info@dvg.de · Internet: www.dvg.de