

**UNTERSUCHUNGEN ZUM NACHWEIS VON VERO-
TOXINOGENEN *E. coli* (VTEC), SPEZIELL SEROVAR O157,
IN LEBENSMITTELN TIERISCHEN URSPRUNGS MIT
VERSCHIEDENEN ANREICHERUNGSVERFAHREN**

SANDRINE DELORME



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



édition scientifique
VVB LAUFFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

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

1. Auflage 2008

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

1st Edition 2008

© 2008 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

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

Betreuer: Prof. Dr. M. Bülte

**Untersuchungen zum Nachweis
von verotoxinogenen *E. coli* (VTEC), speziell Serovar O157,
in Lebensmitteln tierischen Ursprungs
mit verschiedenen Anreicherungsverfahren**

INAUGURAL-DISSERTATION

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

eingereicht von

SANDRINE DELORME

Tierärztin aus Troyes (Frankreich)

Gießen 2008

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

Dekan: Prof. Dr. Dr. habil G. Baljer

1. Berichterstatter: Prof. Dr. M. Bülte

2. Berichterstatter: PD. Dr. C. Menge

Tag der mündlichen Prüfung: 19. August 2008

Meiner Familie

(A ma famille)

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1	1
1	1
2	3
2.1	3
2.1.1	3
2.1.2	4
2.1.3	6
2.1.3.1	9
2.1.3.2	12
2.1.3.3	14
2.2	21
2.2.1	21
2.2.2	30
2.2.3	34
2.3	38
2.3.1	38
2.3.1.1	38
2.3.1.2	39
2.3.1.3	43
2.3.2	47
2.3.2.1	47
2.3.3	49
2.3.4	50

3	EIGENE UNTERSUCHUNGEN	51
3.1	Material	51
3.1.1	Referenzstämme	51
3.1.2	Probenmaterial	51
3.1.3	Labormaterial	53
3.1.3.1	Nährmedien	53
3.1.3.2	Diagnostika	54
3.1.3.3	Laborgeräte und Material	55
3.1.3.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	55
3.2	Methoden	57
3.2.1	Aufarbeitung des Probenmaterials	57
3.2.2	Immunomagnetische Separation (IMS) und Subkultivierung von präsumtiven <i>E. coli</i> O157	59
3.2.3	Enzyme immunoassay (EIA) und Subkultivierung von präsumtiven VTEC und <i>E. coli</i> O157	60
3.2.4	Erregernachweis	61
3.2.4.1	Nachweis der Spezies <i>E. coli</i>	61
3.2.4.2	Multiplex Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	62
3.2.4.3	Bestimmung des Serovars	64
3.2.4.4	Zusätzliche Untersuchungen	64
3.3	Ergebnisse	66
3.3.1	Nachweis von <i>E. coli</i> O157 und verotoxinogenen <i>E. coli</i> (VTEC)-Stämmen in Lebensmitteln tierischen Ursprungs	66
3.3.2	Abhängigkeit des Nachweises vom Anreicherungsverfahren	69
3.3.3	Biochemische Eigenschaften der isolierten Stämme	72

4	DISKUSSION	74
4.1	Zum Nachweis von VTEC in verschiedenen Lebensmitteln	75
4.2	Serovare und Virulenzspektrum	80
4.3	Nachweismethoden	82
4.4	Überwachung und Prophylaxe	86
5	SCHLUSSFOLGERUNGEN	89
6	ZUSAMMENFASSUNG	90
7	SUMMARY	93
8	LITERATURVERZEICHNIS	95
9	DANKSAGUNG	142

Übersicht relevanter bzw. häufig verwendeter Abkürzungen und Einheiten

Länder (internationale Abkürzungen)

A	Austria (Österreich)
ARG	Argentina (Argentinien)
AUS	Australia (Australien)
B	Belgium (Belgien)
BR	Brazil (Brasilien)
CND	Canada (Kanada)
CH	Confoederatio Helvetica (Schweiz)
CZ	Czech Republic (Tschechische Republik)
D	Germany (Deutschland)
DK	Denmark (Dänemark)
E	Espana (Spanien)
F	France (Frankreich)
FL	Finland (Finnland)
GB	Great Britain (Großbritannien)
GR	Greece (Griechenland)
I	Italy (Italien)
IRL	Ireland (Irland)
JPN	Japan
KO	Korea
NL	Netherlands (Niederlande)
NZ	New Zealand (Neuseeland)
S	Sweden (Schweden)
SER	Serbia (Serbien)
SLK	Slovakia (Slowakei)
UG	Uganda
USA	United States of America (Vereinigte Staaten)
VIET	Vietnam
ZA	South Africa (Südafrika)

Gesundheitlich bedenkliche *E. coli*

EaggEC	Enteroggregative <i>E. coli</i>
EHEC	Enterohämorrhagische <i>E. coli</i>
EIEC	Enteroinvasive <i>E. coli</i>
EPEC	Enteropathogene <i>E. coli</i>
ETEC	Enterotoxinogene <i>E. coli</i>
VTEC	Verotoxinogene <i>E. coli</i>

Toxine

LT	Hitzelabiles Toxin
SLT	Shiga-like Toxin
ST	Hitzestabiles Toxin
Stx	Shiga-Toxin
VT	Verotoxin
VT1, 2	Verotoxin 1, 2
VT2v/e/vp	Verotoxin 2 variant/edema/variant porcine
VT2vh	Verotoxin 2 variant human
VT2d	Verotoxin 2 d
VT2f	Verotoxin 2 f

Nährmedien

BRILA	Brillantgrün-Galle-Lactose-Bouillon
CASO	Caseinpepton-Sojamehlpepton-Bouillon
CT-SMAC	Cefixim-Tellurit-Sorbit-MacConkey-Agar
ECD	<i>Escherichia coli</i> -Direkt-Agar
Ehly	Enterohämolyisin-Agar
HC	Hämorrhagische Colitis-Agar
LST+ N	Laurylsulfat-Tryptose-Bouillon mit Novobiocinzusatz
mTSB+N	modifizierte Trypton-Soja-Bouillon mit Novobiocinzusatz
PC	Plate Count-Agar

Weitere Begriffe:

A./Aqua dest.	Aqua destillata
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
ASU	Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren
<i>BfpA</i>	Bundle-forming pili A-Gen
ca.	circa
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
d.h.	das heißt
DIN	Deutsches Institut für Normung
DNA (S)	Desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
<i>eae</i>	<i>E. coli</i> attaching and effacing-Gen
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>EhlyA</i>	Enterohämolyisin A-Gen
EIA	Enzyme immunoassay
ELISA	Enzyme linked immunosorbant assay
et al.	et altera
<i>espP</i>	<i>E. coli</i> secreted serine protease-Gen
<i>espS</i>	<i>E. coli</i> secreted proteins-Gen
<i>etp</i>	EHEC type II secretion pathway-Gen
FLI	Friedrich Loeffler Institut
<i>fliC</i>	Flagellen Gen (H)
FRET	Fluorescence resonance energy transfer
g	Gramm

Gb ₃	Globotriaosylceramide 3
h	hora (Stunde)
HACCP	Hazard Analysis and Critical Control Point
HC	Hämorrhagische Colitis
HUS	Hämolytisch-urämisches Syndrom
IfSG	Infektionsschutzgesetz
IMS	Immunomagnetische Separation
ISO	International Standard Organisation
KbE	Kolonie-bildende Einheiten
kDa	Kilodalton
LEE	Locus of Enterocyte Effacement
<i>ler</i>	LEE encoded regulator-Gen
LFGB	Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch
LMWP	Low molecular weight protein
LPS	Lipopolysaccharide
MAR	Multiple antibiotic resistance
MDa	Megadalton
MEE	Multi-Enzyme Elektrophorese
min.	Minute
MUG	4-Methylumbelliferyl-β-D-Glucuronid
NM	Non Motile
NRZ	Nationales Referenzzentrum
o.g.	oben genannte
O157:H7	<i>E. coli</i> Serovar O157:H7 (O: Somatisches Antigen und H: Geißel-Antigen)
OMP	Outer membrane associated protein
ONT	O nicht typisierbar
p.	Seite
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase Kettenreaktion)
QMRAS	Quantitative microbiological risk assessment
RKI	Robert-Koch-Institut
RNA (S)	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
s.	siehe
<i>saa</i>	STEC autoagglutinating adhesin-Gen
sec.	second (Sekunde)
sog.	sogenannte
syn.	Synonym
<i>tir</i>	translocated intimin receptor-Gen
TTP	Thrombotisch-thrombozytopenische Purpura
u.a.	unter anderen/unter anderem
u.z.	und zwar
U/min.	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
z.B.	zum Beispiel

Tabellenverzeichnis

	Seite
<u>Tabelle 1</u> Einteilung von pathogenen <i>E. coli</i> -Stämmen	5
<u>Tabelle 2</u> Serovare von enterohämorrhagischen <i>E. coli</i> (EHEC) weltweit (Literaturauswahl)	9
<u>Tabelle 3</u> Mögliche Komplikationen einer Erkrankung bei einer EHEC-Infektion	10
<u>Tabelle 4</u> Biochemische Abgrenzungsmöglichkeiten von <i>E. coli</i> O157:H7 zu anderen <i>E. coli</i>	12
<u>Tabelle 5</u> Kennzeichnende Eigenschaften zur Unterscheidung von Verotoxinen	15
<u>Tabelle 6</u> Zusammenfassung anderer VTEC/EHEC-Virulenzfaktoren	18
<u>Tabelle 7</u> EHEC-Ausbrüche und sporadische Erkrankungen in Europa (Literaturauswahl) (Teil 1 und 2)	25-6
<u>Tabelle 8</u> EHEC-Ausbrüche und sporadische Erkrankungen außerhalb Europas (Literaturauswahl) (Teil 1 und 2)	27-8
<u>Tabelle 9</u> Nachweis verotoxinogener <i>E. coli</i> -Stämme bei Nutztieren außerhalb Europas	32
<u>Tabelle 10</u> Nachweis verotoxinogener <i>E. coli</i> -Stämme bei Nutztieren in Europa	33
<u>Tabelle 11</u> Nachweis verotoxinogener <i>E. coli</i> -Stämme (VTEC) in Lebensmitteln tierischen Ursprungs in Europa (Teil 1 und 2) (Literaturauswahl)	35-6
<u>Tabelle 12</u> Nachweis verotoxinogener <i>E. coli</i> -Stämme (VTEC) in Lebensmitteln tierischen Ursprungs außerhalb Europas (Literaturauswahl)	37
<u>Tabelle 13</u> Für die Untersuchung auf verotoxinogene <i>E. coli</i> berücksichtigte Lebensmittel tierischen Ursprungs	52
<u>Tabelle 14</u> Primer zum Nachweis von Virulenzgenen bei <i>E. coli</i> -Stämmen	56
<u>Tabelle 15</u> Biochemische Eigenschaften der <i>E. coli</i> O157-Stämme	62
<u>Tabelle 16</u> PCR-Programme zum Nachweis von Virulenzgenen bei <i>E. coli</i> -Stämmen	64

<u>Tabelle 17</u>	Zeitdifferenz zwischen 1. und 2. Untersuchungsgang	65
<u>Tabelle 18</u>	Anzahl der untersuchten Lebensmittel tierischen Ursprungs, sowie Anzahl der Verotoxin-positiven Isolate	66
<u>Tabelle 19</u>	Charakterisierung der isolierten verotoxinogenen <i>E.coli</i> aus Lebensmitteln tierischen Ursprungs	67
<u>Tabelle 20</u>	Nachweis von VTEC in Abhängigkeit vom Anreicherungsverfahren (BRILA oder LST+N) und EIA-Ergebnisse in Verbindung mit den Anreicherungsbouillons (Teil 1 und 2)	70-1
<u>Tabelle 21</u>	Biochemische Eigenschaften der isolierten Stämme	73

1 EINLEITUNG

Die erste Lebensmittelinfektion durch EHEC (enterohämorrhagische *E. coli*) wurde 1982 in den USA nachgewiesen. In der Folgezeit wurde weltweit zunehmend sowohl über sporadische Erkrankungen als auch über größere Ausbrüche durch solche Stämme berichtet. Insbesondere in Japan und Schottland kam es zu größeren Epidemien. Der bisher größte Ausbruch in der Bundesrepublik Deutschland fand 1995/1996 in Bayern statt und führte zu einer Meldepflicht von EHEC-Erkrankungen (ANONYMUS, 2007). Im Vordergrund der durch EHEC verursachten Erkrankungen standen in der Vergangenheit vor allem Stämme des Serovars O157:H7. Bei der HUS-Epidemie (hämolytisch-urämisches Syndrom) in Bayern hingegen trat erstmalig das Serovar O157:H⁻ auf. Mittlerweile ist die serologische Vielfalt der EHEC-Stämme deutlich gestiegen.

Unter der Bezeichnung VTEC (Verotoxinogene *E. coli*) werden, ungeachtet ihrer klinischen Bedeutung, alle *E. coli*-Stämme mit Verotoxinbildung zusammengefasst. Die EHEC stellen eine Subgruppe der VTEC dar. VTEC-Stämme gelten als EHEC, wenn sie mindestens ein Verotoxin bilden, weitere Virulenzfaktoren besitzen und klinische Erkrankungen beim Menschen verursachen.

Die Toxine werden in die Verotoxin 1- und Verotoxin 2-Gruppe unterteilt, von denen jede mehrere Varianten (VT1, 1c, 1d und VT2, 2c, 2d, 2e, 2f, 2g) aufweist. Als weitere Virulenzfaktoren können u.a. das Enterohämolysin und der Haftungsfaktor Intimin genannt werden.

Wie auch in anderen Ländern konnten in der Bundesrepublik Deutschland Rinder und kleine Wiederkäuer als wichtigste Erregerreservoir identifiziert werden. Als Vektoren für Erkrankungen des Menschen sind daher häufig Lebensmittel der Tierart Rind, die roh oder nicht ausreichend erhitzt verzehrt wurden, nachgewiesen worden. Schmierinfektionen, d.h. eine Übertragung von Mensch zu Mensch, werden zunehmend dokumentiert. Bei einem größeren Ausbruch einer O157:H7-Infektion in

der Bundesrepublik in einer Kindertagesstätte war die Infektionsquelle ein Lebensmittel, welches durch symptomlos ausscheidendes Personal fäkal kontaminiert war.

Ziel der eigenen Untersuchungen war es, von Januar 1996 bis April 1997, Daten zur Prävalenz von VTEC-Stämmen in Lebensmitteln tierischen Ursprungs, insbesondere aus dem Einzel- und Großhandel im Gießener Raum, zu ermitteln. Des Weiteren sollte Lammfleisch aus Australien, das über die Grenzkontrollstelle am Frankfurter Flughafen importiert worden war, auf das Vorkommen von VTEC untersucht werden. Dabei wurden parallel zwei verschiedene Anreicherungsverfahren (Brillantgrün-Galle-Lactose-Bouillon und Laurylsulfat-Tryptose-Bouillon mit Novobiocinzusatz) und zwei sich anschließenden Nachweisverfahren (Enzyme Immunoassay und immunomagnetische Separation) durchgeführt.

2 LITERATUR

2.1 *Escherichia coli*

2.1.1 Taxonomie der Spezies *E. coli*

Zur Familie der *Enterobacteriaceae* gehört die Gattung *Escherichia*, die sich aus sechs verschiedenen Spezies (*E. coli*, *E. albertii*, *E. blattae*, *E. fergusonii*, *E. hermanii* und *E. vulneris*) zusammensetzt. Die Spezies *Escherichia coli* (*E. coli*) wurde erstmals von dem Kinderarzt Dr. Theodor ESCHERICH im Jahre 1885 aus dem Stuhl von Säuglingen isoliert.

Der Mikroorganismus ist ein normaler Bewohner des Dickdarms von Menschen, Säugetieren (Ausnahme: Meerschweinchen und Chinchilla) und Vögeln (Ausnahme: Psittaciden). Es handelt sich um plumpe, gramnegative, nicht sporenbildende, peritrich begeißelte Stäbchen mit abgerundeten Enden. Sie sind 2-6 µm lang und 1-1,5 µm breit. *E. coli* hat keine besonderen Nährsubstratansprüche und wächst auf einfachem Nähragar bei einem Temperaturoptimum von 30-37 °C in 1-3 mm großen, leicht gewölbten, grau-weißen, feucht glänzenden Kolonien mit glattem Rand (S-Form) oder in kleineren Kolonien mit matter Oberfläche und gezähntem Rand (R-Form). Wie alle *Enterobacteriaceae* spaltet *E. coli* Glukose sowie andere Zucker oxidativ und fermentativ unter Bildung von Säure. Der Keim reduziert Nitrat zu Nitrit, ist Oxidase-negativ und Katalase-positiv. Im Vergleich zu vielen anderen Bakterien erweist sich *E. coli* als besonders widerstandsfähig gegen oberflächenaktive Substanzen. *E. coli* lässt sich von anderen *Enterobacteriaceae* biochemisch durch folgende Reaktionen abgrenzen: positive Indol- und Methylrotprobe, negative Voges/Proskauer-Reaktion, Unverwertbarkeit von Citrat als Kohlenstoffquelle, fermentative aerobe Spaltung von Glukose und Laktose (Gasbildung), Decarboxylierung von Lysin, negative Urease-Reaktion und H₂S wird nicht gespalten (BERGEY, 1994).

Im Hinblick auf die Differenzierung pathogener *E. coli*-Stämme kommt der Serotypisierung große Bedeutung zu. Die Erreger werden nach O (Oberflächen oder somatisch)-, K (Kapsel)- und H (Geißel, von Hauch)-Antigenen in verschiedene Serotypen eingeteilt (KAUFFMANN, 1944). Durch die Kombinationen von Virulenzeigenschaften verschiedener Pathovaren ist die Zuordnung zu einer bestimmten Gruppe nicht immer eindeutig (SCHEUTZ und ROWE, 1994).

2.1.2 Einteilung gesundheitlich bedenklicher *E. coli*-Stämme

Neben den überwiegend vorkommenden kommensalischen *E. coli*-Stämmen bei Mensch und Tier existiert eine Vielzahl von Stämmen mit virulenten Eigenschaften. Entsprechend ihrem unterschiedlichen Pathogenitätspotential können diese in Pathogruppen eingeteilt werden (s. Tabelle 1).

Zu den bekannten Pathogruppen der enterotoxinogenen *E. coli* (ETEC), der enteroinvasiven *E. coli* (EIEC) und der enteropathogenen *E. coli* (EPEC) kam durch die Arbeit von KONOWALCHUK et al. (1977) die Gruppe der verotoxinogenen *E. coli* (VTEC) dazu (LEVINE, 1987a; KARMALI, 1989). Bei diesen VTEC-Stämmen konnte ein Toxin nachgewiesen werden, das wegen der irreversibel zytotoxischen Wirkung auf Verozellen (Nierentumorzellen der Grünen Afrikanischen Meerkatze) von dieser Arbeitsgruppe als Verotoxin bezeichnet wurde. Aufgrund der immunologischen Verwandtschaft mit dem Shiga-Toxin von *Shigella dysenteriae* Typ 1 wurde dieses Toxin auch als „Shiga-like-toxin“ (SLT) (CANTEY und BLAKE, 1977; O'BRIEN et al., 1982) und nachfolgend als auch Shiga-toxin (Stx) (ACHESON et al., 1996a) bezeichnet. Diese parallel geführten unterschiedlichen Bezeichnungen sind international anerkannt, führen aber insbesondere bei der Nomenklatur der unterschiedlichen Zytotoxine leicht zu Verwirrungen (HILL und KEASLER, 1991; TYLER et al., 1991). DJORDJEVIC et al. (2004) hat noch die Bezeichnung cSTEC (complex STEC) hinzugefügt. Dabei handelt es sich um ein „Shiga-Toxin producing“ *E. coli* mit *eae* und/oder *ehxA*-Genen. Diese werden oft in Stuhlproben von HUS oder HC-erkrankten Menschen isoliert.

Tabelle 1 Einteilung von pathogenen *E. coli*-Stämmen

Akronym Bezeichnung	Virulenzfaktoren	Erkrankung	Erstbeschreibung
EPEC Enteropathogene <i>E. coli</i> Class I, Class II	Adhäsion, Zytotoxine	Säuglings- enteritis	NETER, 1959
ETEC Enterotoxinogene <i>E. coli</i> LT ⁺ -Stämme ¹ ST ⁺ -Stämme ²	Enterotoxine, Haftungsfähigkeit	choleraähnliche Diarrhoe (Reisediarrhoe)	SMITH u. HALLS, 1967
EIEC Enteroinvasive <i>E. coli</i>	Invasivität, Enterotoxine	Ruhrähnliche Erkrankung	DuPONT et al., 1971
EAggEC Enteroaggregative <i>E. coli</i>	Adhäsion Enterotoxine	Kinderenteritis	BHAN et al., 1989; MATHEWSON et al., 1985
VTEC Verotoxinogene <i>E. coli</i>	Verotoxine		KONOWALCHUK et al., 1977
EHEC Enterohämorrhagi- sche <i>E. coli</i>	Verotoxine, Haftungsfähigkeit, Enterohämolysin- bildung	D, HC, HUS, TTP ³	RILEY et al., 1983
CNEC Cytotoxic necrotizing <i>E. coli</i>	Zytotoxische Nekrotisierungsfaktoren; Hämolysin	Diarrhoe	De RYCKE et al., 1989
DAEC Diffuse adhering <i>E. coli</i>	Adhäsion	Kinderenteritis	GIRON et al., 1991
CLDTEC Cytotolethal distending toxin-producing <i>E. coli</i>	Adhäsion, Toxin	Diarrhoe	JOHNSON u. LIOR, 1988

¹ thermolabile ² thermostabile ³ D: Diarrhoe; HC: Hämorrhagische Colitis; HUS: Hämolytisch-urämisches Syndrom; TTP: Thrombotisch-thrombozytopenische Purpura

Unter der Bezeichnung VTEC werden, ungeachtet ihrer klinischen Bedeutung, alle Stämme mit Verotoxinbildungsvermögen zusammengefasst (KARMALI, 1989). Mit VTEC wurde auch der Begriff enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC) verknüpft. Die EHEC stellen eine Subgruppe der VTEC dar. Streng genommen ist der Begriff EHEC ausschließlich für von entsprechend erkrankten Menschen stammende Isolate anzuwenden (s. 2.1.3).

Als weitere gesundheitlich bedenkliche diarrhöische Stämme sind auch die enteroaggregativen *E. coli* (EaggEC) zu erwähnen, die vornehmlich in Entwicklungsländern bei Kindern mit persistierenden Diarrhöen isoliert werden konnten (BHAN et al., 1989). Sie spielen in unseren Regionen eine deutlich untergeordnete Rolle.

In den letzten 15 Jahren sind die „cytotoxic necrotizing“ *E. coli* (CNEC) zunehmend untersucht worden. Zwei Formen des „cytotoxic necrotizing-factors“ (CNF) sind bisher beschrieben worden, wobei CNF 1 vorwiegend in Zusammenhang mit extraintestinalen Infektionen bei Menschen und CNF 2 fast ausschließlich bei enteralen Erkrankungen des Rindes eine Rolle spielen (OSWALD et al., 1994). CNEC sind selten, wurden aber bereits aus Rohmilch-Weichkäse isoliert (QUINTO und CEPEDA, 1997).

Weitere pathogene *E. coli*, wie „diffuse adhering“ *E. coli* (DAEC) und „cytolethal distending toxin-producing“ *E. coli* (CLDTEC) spielen in unseren Regionen eine untergeordnete Rolle. Sie werden bei Durchfallerkrankungen und Harnwegsinfektionen nachgewiesen (FORESTIER et al., 1996; CERQUEIRA et al., 1997).

2.1.3 Enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC)

EHEC sind VTEC-Stämme, die ein oder mehrere Verotoxin(e) produzieren, weitere Virulenzfaktoren, wie z.B. den Haftungsfaktor Intimin und/oder das Enterohämolysin, besitzen und eine klinische Erkrankung verursachen (LEVINE, 1987a). Dabei handelt

es sich um eine hämorrhagische Colitis (HC) (RILEY, 1983 u. 1987), ein hämolytisch-urämisches Syndrom (HUS) (KARMALI et al., 1983 u. 1985; TARR et al., 2005), und gelegentlich - insbesondere bei älteren Menschen - auch um eine thrombotisch-thrombozytopenische Purpura (TTP) (MORRISON et al., 1985). Es kann aber auch zu nicht-blutigen Diarrhöen kommen (PAI et al., 1988; BEUTIN et al., 1994; BOCKEMÜHL und KARCH, 1996).

RILEY et al. (1983) waren an der Untersuchung von zwei Ausbrüchen hämorrhagischer Colitiden im Jahre 1982 beteiligt, die in den US-Staaten Oregon und Michigan in bis dahin unbekanntem Ausmaß aufgetreten waren. Nach Ausschluss aller anderen in Frage kommenden Krankheitsursachen wurden die bis dahin sehr seltenen *E. coli* des Serovars O157:H7 im Stuhl der betroffenen Patienten gefunden. O'BRIEN und LAVECK (1983) konnten nachweisen, dass diese Stämme Verotoxin bildeten. Da in der Folgezeit immer wieder O157:H7-Stämme im Zusammenhang mit hämorrhagischer Colitis isoliert wurden, wurde von den Autoren der Begriff EHEC eingeführt. Diese Bezeichnung wurde national (KARCH und BOCKEMÜHL, 1989a; BOCKEMÜHL et al., 1990) und international anerkannt (LEVINE, 1987a; KARMALI, 1989).

Durch phylogenetische Analysen ergaben sich Hinweise, dass sich die 1982 als Krankheitserreger identifizierten O157:H7-Stämme aus einem enteropathogenem *E. coli* („Dyspepsiecoli“) O55:H7 entwickelt haben, der neben der Fähigkeit zur Adhärenz an Darmzellen weitere Virulenzfaktoren erworben hatte, nämlich das über Bakteriophagen vermittelte VT-Bildungsvermögen und wahrscheinlich auch die über ein Plasmid codierte Fähigkeit zu einer initialen Adhäsion (WHITTAM et al., 1993).

Als Ergebnisse ihrer Untersuchungen haben GULIETTA et al. (1997) die Hypothese aufgestellt, dass sich grundsätzlich jeder *E. coli*-Stamm in Abhängigkeit von Virulenzfaktoren in einen pathogenen Stamm verwandeln kann. SCHMIDT et al. (1999) haben durch eine Arbeit über O26-, O111- und O103-Stämme gezeigt, dass diese eng verwandt sind und dass minimale Änderungen in ihrem Virulenzmuster

den Unterschied bewirken. FURST et al. (2000) haben weiterhin beobachtet, dass O52:H19- und O75:H-Stämme mehrere stx-Gene (*stx1*, *stx2* und *stx2c*) besaßen. Ein O104:H21-Stamm, der HC-Erkrankungen 1994 in Montana (USA) verursachte, zeigte nach genetischen Untersuchungen eine Ähnlichkeit zu einem O8:H19-Stamm (FENG et al., 2001).

Escherichia coli O157:H7 ist nicht der einzige infektiöse Erreger, der HC/HUS verursachen kann. Die EHEC-Gruppe umfasst Stämme aus einer Vielzahl von Serovaren, welche in Tabelle 2 dargestellt sind.

Die Erreger unterliegen einer gewissen Dynamik. Im Gegensatz zu anderen Ländern (Vereinigte Staaten, Vereinigtes Königreich, Japan, Kanada), in denen das Serovar O157 dominiert, wurde der Anteil dieses Serovars in der Bundesrepublik Deutschland jedoch nur mit 30-40 % ermittelt. Hier werden zunehmend weitere EHEC-Serovare, insbesondere O157:NM, O26:H11/H⁻, O103:H2/H8/H⁻, O145:H28/H⁻ sowie O118:H16, nachgewiesen (BOCKEMÜHL et al., 1998; BÜLTE, 2002; SONNTAG et al., 2004; KARCH et al., 2005).

Das Serovar O157:H7 gilt weiterhin als Prototyp der EHEC-Gruppe. Ein Keimgehalt von unter 50 Kolonie-bildenden Einheiten (KbE) genügt nach bisherigem Kenntnisstand, um bei Menschen eine Erkrankung zu verursachen (WILLSHAW et al., 1994). Bei dem bisher größten Ausbruch in den USA um die Jahreswende 1992/1993 wurde beobachtet, dass ca. 700 Bakterien ausreichend waren, um Erkrankungen hervorzurufen (TUTTLE et al., 1999). In einer umfangreichen Darstellung hat BETTELHEIM (2005) alle weltweit bekannten VTEC aufgelistet.

Tabelle 2 Serovare von enterohämorrhagischen *E. coli* (EHEC) weltweit
(Literaturauswahl)

Land	Serovar/Serogruppe	Literaturquellen
USA	O157:H7/H ⁻ O26, O111, O103, O121, O45, O145	BESSER et al., 1999; FEY et al., 2000 BROOKS et al., 2005
Australien	O26:H11, O111:H ⁻ , O128:H2, O103:H2	BETTELHEIM, 2000a
Japan	O157:H7, O26, O111:H ⁻ , O118:H2	ANONYMUS, 1997c IIZUKA et al., 2005
Deutschland	O157, O26, O111, O103, O118, O145	BOCKEMÜHL et al., 1998; FRUTH et al., 2002; SONNTAG et al., 2004 KARCH et al., 2005
England	O157, O26:H11	WILLSHAW et al., 2001
Irland	O157, O26, O103, O146, O145, O111	CARROLL et al., 2005
Italien	O111:NM ¹ , O26	CAPRIOLI et al., 1994
Frankreich	O103:H2 O6:H4, O91:H/21 O rough:H16	MARIANI-KURDJIAN et al., 1993; BONNET et al., 1998
Finnland	O15:HNM, O26:H11, O103:H2, O145, O rough:HNM	EKLUND et al., 2001

¹ NM: Non Motile, nicht beweglich

2.1.3.1 Klinisches Bild beim Menschen

Das klinische Bild einer EHEC-Infektion (s. Tabelle 3) manifestiert sich häufig nach einer durchschnittlichen Inkubationszeit von fünf Tagen als kolikartige Bauchkrämpfe mit einer wässrigen und dann eventuell hämorrhagischen Diarrhoe. Die HC klingt gewöhnlich nach etwa acht Tagen komplikationslos ab (CARTER et al., 1987). Differentialdiagnostisch muss von einer exazerbierenden Colitis ulcerosa unterschieden werden (LJUNGH und WADSTRÖM, 1988).

Tabelle 3 Mögliche Komplikationen einer Erkrankung bei einer EHEC-Infektion

Erkrankung	Leitsymptome	Literaturquellen
HC (Hämorrhagische Colitis)	auch als ischämische Colitis bezeichnet: - zuerst schmerzhafte kolikartige Bauchschmerzen, dann Brechreiz - 24-48h später profuse hämorrhagische Diarrhoe	KARMALI, 1989; CHAPMAN et al., 1989; RILEY et al., 1983 und 1987
HUS (Hämolytisch-urämisches Syndrom)	- akut einsetzende hämolytische Anämie - Thrombozytopenie - Nierenversagen	TARR et al., 2005 Beschreibung ohne Zusammenhang mit EHEC: GASSER et al., 1955
TTP (Thrombotisch-thrombozytopenische Purpura)	ähnelt HUS, zusätzlich Fieber und zentralnervöse Störungen, auch als Moschcowitz-Syndrom bezeichnet. Ausdruck eines Multiorganversagens	Beschreibungen ohne Zusammenhang mit EHEC: MOSCHCOWITZ, 1924; AMOROSI et al., 1966

Nicht bei allen EHEC-Infektionen entsteht eine HC. Einige Menschen entwickeln eine Diarrhoe ohne Hämorrhagie, und andere zeigen überhaupt keine Symptome. Diese latenten Ausscheider können ein Problem darstellen, da sie eine Infektionsquelle für andere sind (REIDA et al., 1994; GALLIEN et al., 1997; AFZA et al., 2006).

In etwa 3-20 % der Fälle - besonders bei Kindern unter zehn Jahren und bei älteren Menschen über 65 Jahre - kann als Folge einer enteralen Infektion mit EHEC etwa drei bis zwölf Tage nach der Ansteckung ein enteropathisches hämolytisch-urämisches Syndrom (D+HUS) auftreten. Das D+HUS tritt in 5-10 % der EHEC-Infektionen bei Kindern auf, oft mit oder nach Sistieren des Durchfalls. In 50% der HUS-Fälle wird eine Dialyse erforderlich, da ca. 10-30 % der Erkrankungen mit einer terminalen Niereninsuffizienz enden (lebenslange Dialysepflicht bzw. Tod der Patienten [THORPE, 2004]); dabei können auch andere Organsysteme erkranken und die Prognose verschlechtern. Neurologische und kardiologische Komplikationen sind befürchtet und können bei 10 % der Fälle auftreten (TARR et al., 2005). Außerdem kann sich unter Einschluss neurologischer Symptome als weitere Folge der Erkrankung bei Erwachsenen die Thrombotisch-thrombozytopenische Purpura (TTP) ausbilden (KARMALI, 1989).

Die Therapie dieser Erkrankungen beschränkt sich hauptsächlich auf intravenöse Rehydratation ohne Antibiotika-Gabe (WONG et al., 2000; TARR et al., 2005). Ca. 80 % der HUS-Patienten sind anämisch und brauchen eine Blut-Transfusion (TARR et al., 2005). Plasma-Austausch soll bei HUS-Patienten in der Frühphase gute Heilungsraten erzielen (NAKATANI et al., 2002). ARMSTRONG und ROWE (1997) haben klinische Studien zur HUS-Therapie mit einem Gb₃-Rezeptoranalogen (Synsorb-Pk) durchgeführt. Es bindet VT1 und VT2 mit hoher Affinität. Leider hatte die Gabe von diesem Mittel im Vergleich zur Plazebo-Kontrollgruppe bisher bei Patienten mit HUS keinen signifikanten Effekt auf den Heilungsprozess. OKAYAMA et al. (2004) versuchten einen Toxin-Inhibitor herzustellen, um neurologischen Schäden vorzubeugen. Außerdem wird versucht, Impfstoffe zu entwickeln, um eine passive oder aktive Immunität erwirken zu können (MUKHERJEE et al., 2002; DEAN-NYSTROM et al., 2002). ZHU et al. (2005a) bemühten sich, einen Impfstoff gegen das „LEE encoded regulator“ (*ler*)-Gen zu produzieren, das sowohl bei EHEC als auch bei EPEC vorkommt. Die Tatsache, dass es keine spezifische HUS-Therapie gibt, zeigt sich die Notwendigkeit einer frühen Diagnostik.

In der Humanmedizin gestaltet sich die Diagnostik von EHEC häufig schwierig, da diese Organismen nach einer Infektion innerhalb von fünf bis sieben Tagen im Stuhl nicht mehr nachweisbar sind und sich selbst in der akuten Phase der Erkrankung oft nur wenige EHEC-Zellen innerhalb der physiologischen *E. coli*-Darmflora befinden. Mischinfektionen, wie z.B. Noroviren mit EHEC oder zwei unterschiedliche EHEC-Stämme bei einem Patienten, sind ebenfalls möglich (KATO et al., 2005; IIZUKA et al., 2005). Im Allgemeinen bilden HUS-Patienten Antikörper gegen das Zellwand-Antigen Lipopolysaccharid (LPS), die im indirekten Hämagglutinationstest (HAT) oder im Immunoblot nachgewiesen werden können (KARCH et al., 1996a). Die große Zahl der bisher in Erscheinung getretenen unterschiedlichen EHEC-Serovare ist ein limitierender Faktor für die Diagnosestellung, so dass solche Tests überwiegend in der Erfassung des EHEC O157-assoziierten HUS Verwendung finden. Bei negativem Befund kann auch auf Antikörper gegen LPS der Serogruppen O26, O111 und O103 untersucht werden (KARCH et al., 1996a). Im Jahr 2000 ist es gelungen, durch die Zusammenarbeit mehrerer Laboratorien in verschiedenen Bundesländern und durch die Serotypisierung VTEC-verdächtiger Proben, O26:H11 zu isolieren. Elf Personen

hatten positive Stuhlproben und fünf davon waren symptomlos. Die Durchfälle waren nicht blutig (WERBER et al., 2002).

2.1.3.2 Biochemische Eigenschaften

Einige gegenüber saprophytären *E. coli* abweichende biochemische Eigenschaften der EHEC O157-Stämme sind in Tabelle 4 aufgelistet. 94-98 % der *E. coli*-Stämme verstoffwechseln binnen 24 h Sorbit. Über 95 % besitzen das Enzym β -D-Glucuronidase und sind somit in der Lage MUG (4-Methylumbelliferyl- β -D-Glucuronid) abzubauen. Die typischen EHEC des Serotyps O157:H7 vermögen dies nicht. H⁻-Varianten hingegen sind zu über 50 % Sorbit- und β -D-Glucuronidase-positiv (ALEKSIC et al., 1992). Damit können Stämme dieses pathogenen Serovars nur ausnahmsweise von anderen Sorbit-positiven *E. coli*-Stämmen bei der mikrobiologisch-kulturellen Erfassung präsumtiv differenziert werden (ALEKSIC et al., 1992; KARCH und KOHLER, 1999; MURINDA et al., 2004a; KARCH et al., 2005).

Tabelle 4 Biochemische Abgrenzungsmöglichkeiten von *E. coli* O157:H7 zu anderen *E. coli*

Reaktion	<i>E. coli</i> O157:H7	<i>E.coli</i>	Literatur
Sorbitfermentierung	negativ (innerhalb v. 24 h)	94-98 % positiv	FARMER u. DAVIS, 1985; SCOTLAND et al., 1987
β -D-Glucuronidase-Aktivität	negativ, kein MUG ¹ -Abbau	bei über 95 % positiv	KILIAN u. BULOW, 1976; BÜLTE u. REUTER, 1989; THOMPSON et al., 1990
Raffinose-Verwertung	positiv bei fast allen (95 %)	positiv nur bei 20-50 %	FARMER u. DAVIS, 1985; TRUMPF, 1990
Hämolyse nach 4 Stunden nach 24 Stunden	Enterohämolyse negativ positiv	β -Hämolyse positiv positiv	BEUTIN et al., 1994; PATON et al., 1996a

¹MUG: 4-Methylumbelliferyl- β -D-Glucuronid

Eine weitere Einschränkung bei der phänotypischen Differenzierung liegt in der negativen Sorbit-Verwertung der nicht menschenpathogenen Spezies *Escherichia hermannii*, die ebenfalls in der Lage ist, mit O157-Antiserum zu agglutinieren. Diese

Spezies wird überwiegend in pflanzlichen Lebensmitteln nachgewiesen und kann von *E. coli* durch die Cellobiose-Fermentation getrennt werden (MARCH und RATNAM, 1989). Fast alle O157:H7-Stämme verwerten Raffinose. Die Fermentation dieses Zuckers ist ansonsten nur bei 20-50 % der *E. coli*-Gruppe nachweisbar. Anzumerken ist ebenfalls das verminderte Wachstum bzw. Nicht-Wachstum von O157:H7-Stämmen bei 44-44,5 °C (DOYLE und SCHOENI, 1984; RAGHUBEER und MATCHES, 1990).

Als weiteres Erkennungskriterium ist die Enterohämolyse zu nennen. Sie wurde ursprünglich von BEUTIN et al. (1988) bei einigen EPEC-Stämmen entdeckt und als Enterohämolysin bezeichnet. 1989 konnten BEUTIN und seine Mitarbeiter Enterohämolysin bei VTEC-Stämmen nachweisen. Dieses Zytolysin unterscheidet sich morphologisch, genetisch und serologisch von dem bekannten *E. coli*-alpha-Hämolysin. Im Gegensatz dazu kommt Enterohämolysin bei apathogenen, aber auch bei anderen Pathotypen von *E. coli* (außer EHEC) mit einer Häufigkeit von ca. 1 % nur sehr selten vor. Anhand der Morphologie der Hämolysezonen und der Inkubationszeit können *E. coli* alpha-Hämolysin und Enterohämolysin auf Schafblutagar unterschieden werden. In einer Studie konnte BETTELHEIM (1995) dank dieser phänotypischen Methode 82 von 84 VTEC identifizieren. Nur drei von 180 nicht-VTEC-Stämmen zeigten die oben genannte Hämolyseform. BEUTIN et al. (1994) sowie BETTELHEIM (1995) haben daher vorgeschlagen, dass die Enterohämolysinbildung auf einem entsprechenden Nährmedium zum „Screening“ auf VTEC bzw. EHEC genutzt werden kann.

Enterohämolysin-negative EHEC bzw. VTEC können nicht erfasst werden, wenn nur die Enterohämolyse als Screening-Merkmal herangezogen wird. Alpha-Hämolysin-bildende Kolonien können besonders bei Stuhlproben die Auswertung der kleineren Hämolysehöfe von Enterohämolysin-bildenden Kolonien erschweren bzw. unmöglich machen. Außerdem gibt es EHEC- bzw. VTEC-Stämme, die zwar das *Ehly*-Plasmid besitzen, aber die Enterohämolyse phänotypisch nicht ausprägen (BOCKEMÜHL et al., 1997). Bei einer Untersuchung von Lebensmittelisolationen stellte BÜLTE (2001)

fest, dass nur 57 % der VTEC-Stämme das Virulenz-Gen EHEC-*hlyA* aufwiesen.

2.1.3.3 Virulenzfaktoren

EHEC unterscheiden sich von den bisher bekannten darmpathogenen *E. coli*-Stämmen dadurch, dass sie nicht wie EIEC Enterozyten invadieren und auch keine der bei ETEC bekannten Enterotoxine (ST, LT) bilden. Sie besitzen jedoch grundsätzlich Verotoxine (s. Tabelle 5), die in die Verotoxin 1- und die Verotoxin 2-Gruppe unterteilt werden, von denen jede mehrere Varianten (VT1, 1c, 1d und VT2, 2c, 2d, 2e, 2f, 2g) aufweist. Sie hemmen die Proteinbiosynthese der Zielzellen und verursachen ihren Zelltod. EPEC und EHEC bzw. VTEC haben die gemeinsame Fähigkeit, AE-Läsionen („attaching and effacing“) im Darm zu verursachen. EPEC besitzen ein *bfpA*-Gen („bundle-forming pili A“-Gen), das bei VTEC/EHEC nicht nachweisbar war (WIELER et al., 1996). Mit spezifischen *eae*-Primern sind EPEC von EHEC bzw. VTEC mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zu unterscheiden (GANNON et al., 1993; BEUTIN et al., 2004). Die meisten Isolate von Patienten mit HC und HUS produzieren Intimin, d.h. sind *eae*-positiv, und reagieren mit der pCVD419-Gensonde, die aus dem hochkonservierten Plasmid pO157 entwickelt worden ist (NATARO und KAPER, 1998). Zur Entfaltung der vollen Pathogenität sind neben dem Verotoxinbildungsvermögen nach derzeitigem Kenntnisstand zumeist weitere Virulenzfaktoren erforderlich (s. Tabelle 6): Ein chromosomal kodiertes *eae*-Gen, welches u.a. auf der Pathogenitätsinsel „Locus of Enterocyte Effacement“ (LEE) lokalisiert ist und ein Enterohämolysin-Gen, das durch das Plasmid pO157 determiniert wird (BEUTIN et al., 1989; BEUTIN et al., 2004).

Verotoxine

Verotoxine bestehen aus einer enzymatisch wirksamen A-Untereinheit und fünf B-Untereinheiten (O'BRIEN und HOLMES, 1987), die bevorzugt an die Glykolipidrezeptoren (Globotriosylceramid) binden (LINGWOOD et al., 1987). Diese Rezeptoren befinden sich vor allem in Nieren, Dickdarm, Bauchspeicheldrüse und

dem Gehirn des Menschen (WADDEL et al., 1988; BOYD und LINGWOOD, 1989). VT-Gene konnten auch bei *Citrobacter freundii* (SCHMIDT et al., 1993; TSCHÄPE et al., 1995) und *Enterobacter cloacae*-Stämmen (PATON et al., 1996b) gefunden werden, die mit Durchfallerkrankungen und dem HUS assoziiert sind.

Wie in Tabelle 5 ersichtlich, stellen die Verotoxine eine heterogene Familie dar, die aus den zwei Hauptgruppen VT1 und VT2 bestehen (STROCKBINE et al., 1986). Verotoxin 1 wurde erstmals in dem EPEC-Stamm H30 (O26:H11) nachgewiesen, der von KONOWALCHUK et al. (1977) beschrieben worden war.

Tabelle 5 Kennzeichnende Eigenschaften zur Unterscheidung von Verotoxinen

Toxin	Zytotoxische Aktivität auf Zellen		Neutralisation mit Antitoxin gegen		Kodierung	Toxin-rezeptor
	Vero ¹	HeLa ²	VT1	VT2		
<i>Shigella d.</i> ³ Typ 1	+	+	+	-	chromosomal	Gb ₃ ⁴
VT1,c,d	+	+	+	-	Phage	Gb ₃
VT2	+	+	-	+	Phage	Gb ₃
VT2e	+	-	-	+	chromosomal	Gb ₄ ⁵
VT2c	+	-	-	+	Phage	Gb ₃
VT2d	niedrig	-	-	+	Phage	Gb ₃
VT2f	+	-	-	+	Phage	Gb ₃
VT2g	+	+	-	+	Phage	Gb ₃

¹ Vero-Zellen (Nierentumorzellen der African Green Monkey = Afrikanische Grüne Meerkatze)

² Humane Zervix-Epitheloid-Karzinomzellen ³*dysenteriae* ⁴Globotriosylceramid

⁵Globotetraosylceramid

In Untersuchungen zeigte sich, dass VT1 und *Shiga*-Toxin in vielerlei Hinsicht starke Gemeinsamkeiten aufwiesen. O'BRIEN et al. (1982) bestätigten mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers, der gegen das *Shiga*-Toxin gerichtet war, dass Verotoxin mit dem *Shiga*-Toxin von *Shigella dysenteriae* Typ 1 eng verwandt ist. Das *Shiga*-Toxin gehört zur Gruppe der Exotoxine und besteht ebenfalls aus einer aktiven A-Untereinheit (DONOHUE-ROLFE et al., 1984) und 5 einzelnen B-Untereinheiten (DONOHUE-ROLFE et al., 1984; STROCKBINE et al., 1988). Als Bindungsrezeptor wird ebenfalls das Globotriosylceramid angegeben (LINDBERG et al., 1987). Dieses Toxin verursacht bei verschiedenen Zelllinien, wie HeLa-Zellen oder Verozellen, zytopathische Effekte (O'BRIEN und LAVECK, 1983; DONOHUE-ROLFE et al., 1984).

Die VT1-Gruppe unterteilt sich in VT1, VT1c (ZHANG et al., 2002), VT1d (BÜRK et al., 2003), welches auch beim Menschen gefunden wurde (KUCZIUS et al., 2004). Die Variante VT1c scheint bei VTEC vom Schaf am häufigsten zu sein (BRETT et al., 2003).

Obwohl VT2 und VT1 in ihrem Aufbau und ihrer Struktur ähnlich sind, unterscheiden sie sich immunologisch. VT2 lässt sich nicht mit dem Antiserum gegen VT1 neutralisieren. Beide Toxine haben nur 55 % Homologie in der Aminosäuresequenz (JACKSON et al., 1987). VT2 wurde in seiner Wirkung bei Kaninchen als 100-fach letaler beschrieben als VT1 und zeigte im Gegensatz dazu eine 1000-fach geringere Zytotoxizität auf Verozellen (O'BRIEN und HOLMES, 1987; HEAD et al., 1988).

Eine Toxinvariante, die zu 90 % mit VT2 homolog ist, wird von den schweinepathogenen VTEC gebildet (MARQUES et al., 1987). Sie gelten als Ursache der Ödemkrankheit und werden als VT2e (WEINSTEIN et al., 1988; syn. VT2vp, MARQUES et al., 1987; SLTII-v, GYLES et al., 1988; SLTII-vp, SAMUEL et al., 1990) bezeichnet. Im Gegensatz zu VT1 und 2 bindet es das Gb₄ (Globotetraosylceramid)-Molekül (LINGWOOD et al., 1987) und ist nicht über einen Phagen kodiert (MARQUES, 1987). Als weitere Verotoxinvariante haben ITO et al.

(1990) einen VT2vh oder VT2c (variant human)-bildenden Stamm (syn. VT2v: TYLER et al., 1991; SLTII-vh: SAMUEL et al., 1990; SLTII-c: SCHMITT et al., 1991) des Serovars O91:H21 beschrieben. VT2vh lässt sich weiterhin in die Untergruppen VT2vh-a und VT2vh-b unterteilen. Andere VT2-Varianten, die VT2d-Gruppe, wurden von PATON et al. (1992 und 1993) in den Serotypen OX3:H21 und O111:H gefunden, sowie von PIERARD et al. (1998) bei der Serogruppe Ount. Im Jahr 2000 entdeckten SCHMIDT et al. eine neue Toxin-Variante bei Tauben (VT2f), die Ähnlichkeit mit VT-2va des *E. coli* O128:B12-Stammes von GANNON et al. (1990) aufweist. In einem aus Rindern stammenden Serotyp, der O2:H25, fanden LEUNG et al. (2003) die VT2g-Variante.

Die Gene für die Verotoxine sind auf lambdoiden Prophagen lokalisiert, die im Chromosom der VTEC bzw. EHEC integriert sind (SMITH et al., 1983; STROCKBINE et al., 1986). Die VT-konvertierenden Bakteriophagen von *E. coli* O157 sind in ihrer molekularen Grösse heterogen (62 bis 73 kb) und weisen ähnliche Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen (RFLP) auf. Die Toxingene liegen in der Nähe des Replikationsursprunges der lambdoiden Phagen (DATZ et al., 1996). Nach der Isolierung von Stämmen aus Stuhlproben von gastrointestinalerkrankten Patienten haben KARCH et al. (1992) nachgewiesen, dass einige Stämme nach Subkultivierung ihre Verotoxine verloren hatten.

Die wichtigsten weitere Virulenzfaktoren sind in der Tabelle 6 zusammengefasst.

Tabelle 6 Zusammenfassung anderer VTEC/EHEC-Virulenzfaktoren

Bezeichnung	Lokalisation ¹	Gen
Intimin (Haftungsfaktor)	Chr	<i>eae</i> (α , β , γ , δ/κ , ε , ζ , η , θ , ι)
Enterohämolysin	Pla	<i>EhlyA</i> , B, C, D
VT2-Transporter-Protein	Bph	<i>Ile X</i> tRNA
Hitzestabiles Enterotoxin	Chr	<i>astA</i>
Katalase-Peroxidase	Pla	<i>katP</i>
Serinprotease	Pla	<i>espP</i>
Typ II-Sekretionssystem	Pla	<i>etpD</i>
Typ III-Sekretionssystem	Chr	<i>sepA/sepI</i> , LEE-kodiert
Protein-Sekretion	Chr	<i>esp</i> , LEE-kodiert
Intimin-Rezeptor-Protein	Chr	<i>tir</i> , LEE-kodiert
STEC autoagglutinating adhesin	Pla	<i>saa</i>
Subtilase cytotoxin AB	Pla	<i>subA</i> , <i>subB</i>

¹Chr: Chromosom; Pla: Plasmid; Bph: Bacteriophagen

Adhärenz

Die „attaching und effacing“-Läsionen (AE) verursachen eine pathologische Veränderung in den Enterozyten (SHERMANN et al., 1988). Dieses Merkmal wurde zum ersten Mal bei der EPEC-Gruppe beschrieben (ROTHBAUM et al., 1982), findet sich jedoch auch bei enteropathogenen *Hafnia alvei*-Stämmen (ALBERT et al., 1992) und *Citrobacter rodentium* (vorher *Citrobacter freundii* biotype 4280, SCHAUER und FALKOW, 1993).

Die Adhärenz der EHEC an den Darmepithelien führt letztendlich zur Zerstörung des Bürstensaums. Hierbei gelangen die Bakterien sehr nah (ca. 10 nm) an die Plasmamembran der Enterozyten. Direkt unter der Anheftungsstelle lösen sich die Mikrovilli auf. An dieser Stelle bilden die Enterozyten einen becherförmig eingestülpten Sockel, an dem die Bakterien haften. Darunter werden die Elemente des Zytoskeletts der

Enterozyten neu geordnet. Ein für die Adhärenz und Ausprägung der Läsionen wichtiges Gen-Produkt, das Intimin, ist ein 97 kDa großes, äußeres Membranprotein, dem eine wichtige Funktion bei der Anheftung an die Epithelzellen zukommt (LOUIE et al., 1993). Dieses Protein wird von dem *eae*-Gen (*E. coli* attaching and effacing-Gen) kodiert, welches sich auf einer Pathogenitätsinsel, dem sogenannten LEE („Locus of enterocyte effacement“) befindet (McDANIEL et al., 1995). Es wurden 17 genetische Varianten des *eae*-Gens bei VTEC und EPEC gefunden (17 bei VTEC; BLANCO et al., 2005). Sie wurden durch griechische Buchstaben (α 1, α 2, β 1, ξ R/ β 2B, δ / κ / β 2O, γ 1, γ 2/ θ , δ / κ , ε 1, ν R/ ε 2, ζ , η , ι 1, μ R/ ι 2, λ , μ B, ν B, ξ B) in Kombination mit Zahlen bestimmt. Mittlerweile wurden auch *eae*-negative EHEC-Stämme (O91, O123, O128) bekannt, die sowohl aus Stuhlproben von Enteritispatienten (PATON et al., 1996a) als auch von einigen wenigen HUS-Patienten stammten (De AZAVEDO et al., 1994). Neben dem *eae*-Gen sind auf dem LEE-Lokus noch *esp*-Gene (*E. coli* secreted protein-Gen), ein *tir*-Gen (translocated intimin receptor-Gen), das einen Intimin-Rezeptor kodiert, und ein Typ III-Sekretionssystem, das für die Sekretion und Translokation der Esp-Proteine verantwortlich ist, lokalisiert (PATON u. PATON, 1998).

Virulenzplasmid

Bei *E. coli* O157 wird ein ca. 60 MDa (Megadalton) großes Plasmid gefunden, das als pO157 bezeichnet wird. Es wurde auch bei VTEC anderer Serovare gefunden, variiert bei diesen jedoch in der Größe.

Das Plasmid wurde von KARCH et al. (1996a) kartiert; dabei konnte gezeigt werden, dass das Enterohämolysin-Operon dort lokalisiert war (SCHMIDT und KARCH, 1996). Weiterhin identifizierte diese Arbeitsgruppe auf dem Plasmid ein Gen für eine bifunktionelle Katalase-Peroxidase (*kafP*, Katalase-Peroxidase-Gen), die im Wildtyp exprimiert wird und zusätzlich zu den chromosomal kodierten Katalase-Peroxidasen von *E. coli*, Hydroxyperoxidase I (HPI) und HPII, vorkommt (KARCH et al., 1996a). Eine starke Katalase-Aktivität schützt vor O₂-Radikalen. Aus dem Plasmid pO157

wurde eine Gensonde hergestellt (LEVINE et al., 1987b), die zu 99 % für EHEC spezifisch ist. Diese Sonde (pCVD 419) wird zur Identifizierung der EHEC eingesetzt. KARCH et al. (1996a) haben gezeigt, dass die Sonde aus einem Teil des Enterohämolysin-Operons besteht und eine entsprechende PCR entwickelt, die diagnostisch genutzt werden kann (SCHMIDT et al., 1995). Über dieses Plasmid werden auch eine *E. coli*-Serinprotease (*espP*-Gen, *E. coli* secreted serine protease) und ein Typ II-Transportsystem (*etp*-Gene, EHEC type II secretion pathway) kodiert. Die Serinprotease spaltet Pepsin A und den humanen Gerinnungsfaktor V (BRUNDER et al., 1997); das *etp*-Gen besitzt eine Transport- und Gerinnungsfunktion. Bei einem LEE-negativen O113:H21-Stamm konnten PATON et al. (2001) ein neues *saa* (STEC autoagglutinating adhesin)-Gen nachweisen, das eventuell für die Haftung der Bakterien verantwortlich sein sollte und sich auf dem Virulenzplasmid befindet. 2004 haben PATON et al. in dem gleichen Stamm ein Cytotoxin nachgewiesen, das Subtilase cytotoxin AB (SubAB) genannt wurde. BLANCO et al. (2004b) konnten das *saa*-Gen in mehreren bovinen Serotypen nachweisen.

EHEC-Enterohämolysin (Ehly)

EHEC verursachen auf bestimmten Blutagarplatten eine spezielle Hämolyse, die als enterohämolytischer Phänotyp bezeichnet wird. Die Erythrolyse durch Enterohämolysin wird erst nach 20-24 stündiger Inkubation bei 37 °C sichtbar. Lysehöfe sind trüb und in der Regel kleiner als beim alpha-Hämolysin (BEUTIN et al., 1988). In einer Untersuchung von 64 VTEC-Stämmen fanden BEUTIN et al. (1989) bei 57 der Stämme (89 %), dass das Protein weder serologisch noch genetisch mit dem α -Hämolysin übereinstimmte. Das EHEC-Enterohämolysin ist ein 107 kDa großes Protein, das in Wildstämmen sowohl zellassoziiert als auch in geringem Maß zellfrei vorkommt. Die Gene sind in einem Operon organisiert (SCHMIDT und KARCH, 1996). Das EHEC-Enterohämolysin ist ein porenbildendes Zytotoxin.

Die toxische Wirkung bei der Infektion ist aber nicht eindeutig geklärt. Derzeit wird das Protein eher als immunologischer Marker betrachtet. Bei Rekonvaleszenten

einer HUS-Infektion lag eine spezifische Immunreaktion mit gereinigtem EHEC-Enterohämolysin als Antigen vor (SCHMIDT et al., 1995). Ein Beweis für die Assoziation zwischen EHEC-*hly* und pathogenen VTEC war, dass EHEC-Enterohämolysin-Gene bei 94,3 % der EHEC-Isolate von HUS-Patienten und bei 72,7 % der Isolate von Enteritis-Fällen nachgewiesen wurden (BOCKEMÜHL u. KARCH, 1996). Bei EHEC-Stämmen von Patienten mit HUS wurde EHEC-Enterohämolysin statistisch signifikant häufiger gefunden als bei O111-Stämmen von Patienten mit Enteritis (SCHMIDT und KARCH, 1996).

Innerhalb der Serogruppe O157 tragen viele der bisher untersuchten Stämme das EHEC-Enterohämolysin-Strukturgen. Bei anderen Serogruppen, wie EHEC O111-Stämmen, wurde ein entsprechendes Enterohämolysin-Gen nachgewiesen, welches nahezu identisch mit dem EHEC-Enterohämolysin von *E. coli* O157 war (KARCH et al., 1996a).

2.2 Epidemiologie der VTEC

2.2.1 Vorkommen beim Menschen

In den letzten Jahren ist die Zahl der Erkrankungen durch EHEC weltweit angestiegen. Nach den ersten Ausbrüchen 1982 in den USA (RILEY et al., 1983) und in Kanada (STEWART et al., 1983) wurde auch Europa erfasst. 1985 wurde in England die erste Infektion registriert (MORGAN et al., 1988), gefolgt von Belgien (ROBAEYS et al., 1987) und Deutschland (TSCHÄPE und BÖHME, 1990). Heutzutage sind die Erreger überall in Europa verbreitet (CAPRIOLI et al., 1997; KARCH et al., 2005). Regelmäßig wird von sporadischen EHEC-Fällen, Familien-erkrankungen oder Epidemien berichtet (LIPTAKOVA et al., 2004; FERGUSON et al., 2005; KATO et al., 2005). Ein Überblick über die globale Situation ist in den Tabellen 7 und 8 dargestellt. EHEC verursacht HUS bei Kleinkindern unter fünf Jahren. Drei von 100 000 Einwohnern in Chile (RIOS et al., 1999), 1,8 in Frankreich (DECLUDT et al., 2000) und 0,1 in Deutschland (RKI, 2006) waren daran erkrankt.

Aber je nach deutschen Bundesländern ist die Inzidenz höher: Hamburg (0,3), Thüringen (0,2) und Bayern (0,2) (RKI, 2006). In den Niederlanden wurde eine zehnjährige Studie über EHEC-Erkrankungen durchgeführt. Schätzungsweise gibt es jedes Jahr ca. 1250 EHEC-Gastroenteritiden, davon werden 180 Fälle vom Arzt behandelt und 40 gemeldet. 0,6 % davon sind tödlich. Von 20 diagnostizierten HUS-Fällen bei Kleinkindern sind es durchschnittlich 2,5 %, die ein terminales Nierenversagen entwickeln (HAVELAAR et al., 2004).

Obwohl der Serotyp *E. coli* O157 nach wie vor dominiert, nimmt der Anteil an nicht-O157 *E. coli*-Erkrankungen zu. In den USA ist bereits jede fünfte EHEC-Infektion auf nicht-O157 *E. coli* zurückzuführen (GRIFFIN, 1997; BROOKS et al., 2005). In verschiedenen Ländern herrschen jeweils bestimmte Serovare vor, z.B. O111 in Australien (BETTELHEIM, 1996) oder O103 in Frankreich (MARIANI-KURKDJIAN et al., 1993). In Deutschland spielt das Serovar O157 immer noch die größte Rolle (70,5 % für HUS-Fälle, 31,3 % der Enteritisfälle). Die Serovare O26, O111, O103 nehmen an Bedeutung zu (BOCKEMÜHL et al., 1997; BEUTIN et al., 2004).

Infektionsquellen

In einer epidemiologischen Untersuchung in den U.S.A wurden von 1982-2002 8598 Fälle von O157:H7-Erkrankungen untersucht (RANGEL et al., 2005). 61 % der Fälle sind auf Übertragung durch **kontaminierte Lebensmittel**, 39 % auf einen **anderen Übertragungsweg** wie: Mensch-zu-Mensch (8 %), Schwimmbad (3 %), Tierkontakt (4 %), Trinkwasser (15 %) oder unbekannte Ursache (9 %) zurückzuführen. 32 % der EHEC-Infektionen wurden durch den Verzehr kontaminierter Lebensmittel im privaten Haushalt und 26 % durch Nahrungsaufnahme in einer Gemeinschafts-verpflegung verursacht (PAVIA et al., 1990). Das Robert-Koch-Institut (RKI) hatte 2004 einen ähnlichen Bericht über VTEC-Erkrankungen herausgegeben. Bei den statistischen Auswertungen wurden die Fälle in drei Altersgruppen (0-3 Jahre, 3-9 und ab 10 Jahre) aufgeteilt. Für jede Gruppe wurden die wichtigsten Risikofaktoren wie folgt geschätzt: Bei Patienten unter drei Jahren stehen Leben auf einem Bauernhof, direkter Kontakt zu Wiederkäuern, zu erkrankten Menschen und Spielen im Sandkasten im Vordergrund (67 %). Eine Übertragung des Erregers durch rohe

Lebensmittel (Milch, Gemüse) ist nicht auszuschließen. Bei der zweiten Risikogruppe erfolgen 50 % der Übertragung durch Menschenkontakt und die anderen 50 % durch Ansteckung in öffentlichen Schwimmeinrichtungen. Bei über 10-jährigen Kindern stecken sich 80 % mit Lebensmitteln an (Lammfleisch, streichfähige Rohwürste und Fruchtsaft aus Eigenherstellung). In einer kanadischen Untersuchung stellten REYMOND et al. (1996) fest, dass durch den Dauerkontakt zu den VTEC-ausscheidenden Wiederkäuern die Bauernhofbewohner in der Umgebung von Toronto einen höheren Antikörper-Titer gegen VT1 hatten als die Stadtbewohner. Unklar bleibt, ob der hohe Titer einen schützenden Effekt hat.

RANGEL et al. (2005) haben zusammengefasst, dass kontaminierte Lebensmittel Rindfleischprodukte (47 %) wie Hamburger oder gekochtes Fleisch (AHMED und COWDEN, 1997), Milch- (4 %) bzw. Fruchtprodukte (10 %), Salate (10 %) wie Blatt- (68 %) und Mischsalate (32 %) [MERMIN et al., 1997] und andere Nahrungsmittel (29 %) sein können. Außerdem überstehen viele EHEC-Stämme den Reifungsprozess fermentierter Lebensmittel (DUFFY et al., 2000), wie z.B. Rohwurst (PATON et al., 1996a), Joghurt (MORGAN et al., 1993) oder Rohmilchkäse (DESCHENES et al., 1996) durch die ausgeprägte Säuretoleranz der Erreger. Des Weiteren konnten sie in Mayonnaise (TSCHÄPE und BÖHME, 1990), frisch gepresstem Apfelsaft (BESSER et al., 1993; GLYNN et al., 1997), Rettichsprossen und Trinkwasser nachgewiesen werden (SWERDLOW et al., 1992; McQUIGGE, 2000; RANGEL et al., 2005). Die Mikroorganismen überleben bei 4 °C, wobei das Substrat eine Rolle spielt (MASSA et al., 1997). Ein pH-Wert von 3,62 oder 6,2 bei 4 °C scheint einen geringen Einfluss auf das Kolonienwachstum zu haben (MUTAKU et al., 2005), dagegen reduzieren ein pH-Wert von 4 und eine Salzkonzentration von 4,0 % bei 50 °C über 60 min. das Kolonienwachstum von *E. coli* O157:H7 um 10^3 (HARA-KUDO et al., 2005). Eine argentinische Studie konnte nachweisen, dass non-O157:H7 einen pH-Wert kleiner als 2,5 über 24 h nicht überleben (MOLINA et al., 2003). Zwei große Ausbrüche in Japan und Schottland 1996 bestätigten die oben genannten Infektionsquellen. Bei der EHEC-Epidemie (12.680 symptomatische Patienten), welche sich in Japan ausbreitete, waren 425 Kinder an HC erkrankt. 121 Kinder entwickelten ein HUS. Nachdem Schulkinder der Stadt Sakai (Präfektur

Osaka) infizierte Schulspeisen (sog.“lunch boxes“) verzehrten und erkrankten, wurden darüber weitere Familienangehörige angesteckt (RKI, 1996b; FUKUSHIMA et al., 1999a). Der Ausbruch in Schottland (mehr als 300 Kranke) wurde durch den Verzehr von gekochtem Fleisch ausgelöst, welches tertiär durch verunreinigte Schneidemesser kontaminiert wurde (COWDEN, 1997).

Die Kontamination von Milch- und Fleischprodukten kann primär über Tiere, sekundär über den Melkvorgang (CLARKE et al., 1989) oder den Schlachtprozess (CHAPMAN et al, 1993) stattfinden. In der Schweiz wurden 5590 Stuhlproben von gesunden Mitarbeitern dreier großer fleischverarbeitender Betriebe (vom Schlachthof bis zur Fleischverarbeitung) untersucht. Es konnte nur ein O157:H7-Stamm, aber 47 VTEC-Stämme anderer Serovare, darunter O91, O103 und O128, nachgewiesen werden (STEPHAN et al., 2000). Die letztgenannten wurden auch bei HUS-Patienten gefunden. Arbeiter in Schlachthöfen sind einem größeren Infektionsrisiko ausgesetzt. Eine ähnliche Untersuchung wurde in einem Herstellungsbetrieb für streichfähige Rohwürste in Deutschland gemacht. Dabei wurde VTEC bei zwei verschiedenen Mitarbeitern gefunden (GAREIS et al., 2000). Weiterhin können Gemüse über Händler oder durch Düngung (fäkale Kontamination) kontaminiert werden (SAMADPOUR et al., 1990).

Tabelle 7 EHEC-Ausbrüche und sporadische Erkrankungen in Europa (Literaturauswahl) (Teil 1)

Land ¹	Jahr	Vektor	Serovar	D/HC ²	HUS/TTP ³	Tote	Referenz
GB	1985-93	Kartoffeln, Putenrolle Joghurt, Beefburger	O157:H7	74	25	-	MORGAN et al., 1988; SALMON et al., 1989; MORGAN et al., 1993; WILLSHAW et al., 1994
	1994	pasteur. Milch	O157:H7	> 100	10	-	UPTON u. COIA, 1994
	1996	Wurst, Fleisch (gekocht)	O157:H7	496	25	20	ANONYMUS, 1997a; COWDEN et al., 1997
	1997	Weide	O157:H7	7	1	-	CRAMPIN et al., 1999
	2005	Gekochtes Fleisch	O157:H7	157	-	1	ANONYMUS, 2005e
IRL	2005	Kindergarten	O157:H7	15	3	-	ANONYMUS, 2005b
FL	1997	Seewasser/Strand	O157:H7	14	-	-	PAUNIO et al., 1999
S	2002	Grüner Salat	O157:H7	37	-	-	WELINDER-OLSON et al., 2004
DK	2003-04	Kuhmilch	O157:H7	25	-	-	ANONYMUS, 2004
SLK	2004	Kuhmilch	O157:H7	2	3	-	LIPTAKOVA et al., 2004
CR	1995	Unpast. Ziegenmilch	O157:H7	1	4	-	BIELASZEWSKA et al., 1997
	1998	Unpast. Kuhmilch	O157:H-	-	2	-	BIELASZEWSKA et al., 2000
B	1987	Hamburger	O157:H7	1	-	-	ROBAEYS et al., 1987
F	1992	Frischkäse (Kuh, Ziege)	non-O157:H7	4	3	1	ANONYMUS, 1994
	1993-96	unbekannt	O157 u. non-O157	-	286	-	DECLUDET et al., 2000
	2005	Rinderhackfleisch	O157:H7	13	13	-	ANONYMUS, 2005d

¹GB: Großbritannien, IRL: Irland, FL: Finnland, S: Schweden, SLK: Slowakei, CR: Tschechien, B: Belgien, F: Frankreich; ²Diarrhoe/Hämorrhagische Colitis; ³Hämolytisch-urämisches Syndrom/Thrombotisch-thrombozytopenische Purpura

Tabelle 7 EHEC-Ausbrüche und sporadische Erkrankungen in Europa (Literatúrauswahl) (Teil 2)

Land ¹	Jahr	Vektor	Serovar	D/HC ⁴	HUS/TTP ⁵	Tote	Referenz
D	1988	Mayonnaise	O101:HNT	322	-	-	TSCHÄPE, 1990
	1989	Rohe Milch	O22:H8	1	1	-	BOCKEMÜHL, 1990
	1992	Kind.gart. Mahlzeit	O157:H7	39	3	1	REIDA et al., 1994
	1995	Teewurst, Mortadella ²	O157:H-	>100	45	7	RKI ⁶ , 1996a
	1996-97 Bayern	Rohe Milch Tier-, Personenkontakt	O157:H-, O103:H2	188	22	-	HUBER et al., 1998
	2000	Meeresprodukte	O26 :H11	7	-	-	WERBER et al., 2002
	2002	Unterschiedlich	[SFO157:H-] ³	4	10	1(TTP)	ANONYMUS, 2002
	2003	"	EHEC	1.065	x	-	RKI, 2004
	2004	"	"	836	x	-	"
	2005	"	EHEC	1.162	79	4	RKI, 2006
A	1999	Personenkontakt	O157:H-	3	-	-	ALLERBERGER et al., 2000
	2003	Weide	O153:H7	1	2	-	GRIF et al., 2005

¹D: Deutschland, A: Österreich; ²vermutet; ³Sorbit fermentierend; ⁴Diarrhoe/Hämorrhagische Colitis; ⁵Hämolytisch-urämisches Syndrom/Thrombotisch-thrombozytopenische Purpura; ⁶RKI: Robert Koch Institut; x keine Angaben

Tabelle 8 EHEC-Ausbrüche und sporadische Erkrankungen außerhalb Europas (Literatúrauswahl) (Teil 1)

Land ¹	Jahr	Vektor	Serovar	D/HC ²	HUS/ITP ³	Tote	Referenz
USA	1982	Hamburger	O157:H7	26	-	-	RILEY et al., 1983
	1984-88	Hamburger, Rinderhackfleisch	O157:H7	156	15	6	SPIKA et al., 1986; GRIFFIN et al., 1988; PAVIA et al., 1990; BELONGIA et al., 1991 SWERDLOW, 1992
	1989	Wasser	O157:H7	243	2	4	CDC ⁴ , 1993
	1992-93	Hamburger	O157:H7	> 700	53	4	LEAHY, 1995
	1995	Salat	O157:H7	100	-	-	ANONYMUS, 1997b
	1997	Luzernesprossen	O157:H7	108	3	-	ANONYMUS, 2000
	1999	Unbekannt	O111:H8	8	2	-	FERGUSON et al., 2005
	2003	Alfalfa Sprossen	O157:H7	19	1	-	ANONYMUS, 2005a
	2004-2005	Tierkontakt - Tieraustellung	O157:H7	143	22	-	STEWART et al., 1983; HOCKIN et al., 1983; CARTER et al., 1987
	2004-2005	Rinderhackfleisch, Hamburger Sandwiches	O157:H7	108	14	19	BORCZYK et al., 1987
CDN	1982-85	rohe Milch	O157:H7	46	3	-	HOCKIN u. LIOR, 1987
	1986	Rinderhackfleisch	O157:H7	16	-	-	WILLIAMS et al., 2000
	1987	Salami	O157:H7	39	-	-	McQUIGGE, 2000
	1998	Leitungswasser	O157:H7/ Campylobacter	2.300	28	7	HONISH et al., 2005
	2000	Gouda	O157:H7	11	2	-	ANONYMUS, 2005c
	2002	Wasserspiele	O157:H7	9	1	-	
	2004						
	2004						

¹USA: Vereinigte Staaten von Amerika, CDN: Kanada; ²Diarrhoe/Hämorrhagische Colitis; ³Hämolytisch-urämisches Syndrom/Thrombotisch-thrombozytopenische Purpura;⁴CDC: Center for Disease Control

Tabelle 8 EHEC-Ausbrüche und sporadische Erkrankungen außerhalb Europas (Literatúrauswahl) (Teil 2)

Land ¹	Jahr	Vektor	Serovar	D/HC ⁴	HUS/ITP ⁵	Tote	Referenz
AUS	1995	Mettwurst	O111:H-	> 100	22	1	GOLDWATER. u. BETTELHEIM., 1995
NZ	1993	Unbekannt	O157:H7 O113:H21 O26, O91:H21	72 3 1/1	-	-	BAKER et al., 1999
JPN	1996 1997 2005	Brunnenkresse ² Reitichsprossen Kindergarten Unbekannt	O157:H7/ H- O157:H7 O26:H11/NoroV ³ , O111, O26, O146, O157	12680/425 96 27 103	121 - - -	11 1 - -	FUKUSHIMA et al., 1999a ANONYMUS, 1997b IIZUKA et al., 2005 KATO et al., 2005

¹AUS: Australien, NZ: Neuseeland, JPN: Japan; ² ursprünglich vermutet, nachgewiesen Reitichsprossen/Meeresprodukte; ³Noroviren; ⁴Diarrhoe/Hämorrhagische Colitis ;

⁵Hämolytisch-urämisches Syndrom/Thrombotisch-thrombozytopenische Purpura

Als weiterer Übertragungsweg kann die Mensch-zu-Mensch Übertragung genannt werden. Die Mutter-Kind Übertragung oder eine familiäre Epidemie ist sekundär, da Erkrankte andere Familienmitglieder schleichend anstecken (GRIF et al., 2005; LIPTAKOVA et., 2004; KATO et al., 2005). Ärzte in Frankreich berichteten von einem erstaunlichen HUS-Fall bei einem sieben Tage alten Baby. VT2 wurde in dem Stuhl der Mutter und O157:H7 im Stuhl des Kindes nachgewiesen (ULINSKI et al., 2005). Durch mangelhafte Hygienebedingungen können sich Mitarbeiter von Krankenhäusern und Laboratorien oder Schulkinder infizieren (WELINDER-OLSSON et al., 2004; BOLDUC et al., 2004; IIZUKA et al., 2005; KATO et al., 2005; SPINA et al., 2005; ANONYMUS 2005b).

Umweltfaktoren wie Sandspielkästen in den Städten (RKI, 2004) oder Bauernhöfe mit ihrer Umgebung (Weiden, Wasserquellen) stellen ein anderes Infektionsrisiko dar. COBBOLD und DESMARCHELIER (2000) haben Proben aus der Umgebung von drei Milchbetrieben genommen. Von 147 Proben (z.B. Erde, Fliegen und Staub) waren sechs Proben (4,1 %) VTEC-positiv. Beim Besuch eines Konzerts im Freien, das auf einer leeren Weide stattfand, wurden Jugendliche mit O157 *E. coli* infiziert. Der Stamm wurde auch bei einer Kuh aus einem nahestehenden Milchbetrieb gefunden (CRAMPIN et al., 1999). Experimentell infizierte Fäzes können im Freien bis zu 97 Tage und im Wasser bis zu 109 Tagen infektiös bleiben (MAULE, 2000; SCOTT et al., 2006). Bei Kotuntersuchungen von Wildtieren, die in der Umgebung von Bauernhöfen lebten, fanden NIELSEN et al. (2004) eine mit VTEC infizierte Ratte (*Rattus norvegicus*) und einen Star (*Sturnus vulgaris*). Die Erreger wurden auch bei Rindern von dem Hof isoliert. Wildwiederkäuer wurden auch als Reservoir betrachtet, aber nach Kotuntersuchungen von Rehen konnten DUNN et al. (2004) dies nicht bestätigen. Demzufolge können O157-Stämme sowohl über direkte Infektion von Tier zu Tier als auch über eine Vielzahl biotischer (z.B. Fliegen, Wildtauben) und abiotischer Vektoren (z.B. Wasser, Futter) übertragen werden. Aufgrund von Bewässerungssystemen und intensiver Tierlandwirtschaft ist der Fluss Oldman River in Alberta, Kanada, regelmäßig mit *E. coli* O157:H7 und *Salmonella* spp. kontaminiert. 1-3 % der, über einen Zeitraum von zwei Jahren untersuchten

Wasserproben, waren *E. coli* O157:H7-positiv (GANNON et al. 2004). Einwohner der kanadischen Stadt Walkerton hatten sich mit EHEC infiziert, nachdem sie verschmutztes Wasser getrunken hatten. Heftige Regenfälle spülten Abfallprodukte eines nahegelegenen Bauernhofes in den Fluss (AULD et al., 2004).

2.2.2 Vorkommen beim Tier

Als Hauptreservoir für VTEC bzw. potentielle EHEC gelten **große** (MOHAMMAD et al., 1986; BÜLTE et al., 1990; WIELER et al., 1996; ZWEIFEL et al., 2005) und **kleine Wiederkäuer** (BETTELHEIM et al., 2000b; ZWEIFEL et al., 2004; DJORDJEVIC et al., 2004) (s. Tabellen 9 und 10). VTEC kommen als natürliche Kommensalen der Darmflora bei Wiederkäuern vor (BETTELHEIM et al., 2005), insbesondere bei Tieren im Alter von 4-12 Monaten (HEUVELINK et al., 1998). Die höchste Keimkonzentration befindet sich im Rektum (PAIBA et al., 2002; LOW et al., 2005). Auch die Fütterung könnte bei der VTEC-Ausscheidung eine große Rolle spielen (GEUE et al., 2005). Mit Getreide (Gerste) gefütterte Rinder scheiden mehr VTEC O157 aus (DEWELL et al., 2005). Die Vielfalt der Serotypen ist bei Weideschafen kleiner als bei Tieren mit Getreidefütterung (DJORDJEVIC et al., 2004). Außerdem scheiden Tiere VTEC mit einer saisonalen Variabilität (verstärkte Ausscheidung im Sommer) aus (KUVDA et al., 1997). Diese Saisonalität bestätigte sich auch in anderen Ländern. In einer amerikanischen Untersuchung über *E. coli* O157 und *Salmonellen* haben EDRINGTON et al. (2004) festgestellt, dass bei Milchkühen von vier Bauernhöfen die höchste Ausscheidungsrate im August war.

In einer Studie bei gesunden Nutztierbeständen in Hessen konnten VTEC aus dem Kot von 18 % der Rinder, 32,1 % der Ziegen und 75,3 % der Schafe isoliert werden (ZSCHÖCK et al., 2000). Solche Prävalenzen sind als typisch auch für den europäischen und internationalen Raum anzusehen (BLANCO et al., 2004a; JO et al., 2004; ZWEIFEL et al., 2004 und 2005). In Australien wurden u.a. folgende Serotypen aus Schafkotproben isoliert: O5:H⁻, O75:H8, O91:H⁻, O123:H⁻ und O128:H2 (DJORDJEVIC et al. 2004). O5:H⁻, O91:H⁻ und O128:H2 wurden bei HUS-

Patienten gefunden. Bei mit VTEC-erkrankten Kälbern haben WIELER et al. (1996) gezeigt, dass unter den VTEC-Stämmen auch einige präsumtiv humanpathogene Serovare nachzuweisen waren (z.B. O118 mit den Virulenzgenen *eae* und *vtx1*). Die Serotypenvielfalt der ausgeschiedenen VTEC-Stämme ist sehr groß (BLANCO et al., 2004a; BETTELHEIM et al., 2005). In der Bundesrepublik Deutschland dominieren bei Tieren die non-O157-VTEC-Stämme (GEUE et al., 2002). Das Vorkommen von non-O157 steigt in den USA stetig an, obwohl *E. coli* O157:H7 bei Rindern dominieren. Sie werden in Prävalenz-Raten von 2,1-70,1 % isoliert (HUSSEIN und BOLLINGER, 2005).

Die „World Health Organisation“ fand heraus, dass eine Sanierung der mit VTEC befallenen Tierbestände mit dem Ziel der Eindämmung von EHEC-Infektionen des Menschen nicht durchführbar erscheint (WHO, 1994 u. 1995). Bei einer Grundsanierung müssen die Tiere, als auch das Umfeld berücksichtigt werden (LeJEUNE et al., 2004; DEWELL et al., 2005; SCHOUTEN et al., 2005b). LEJEUNE und KAUFFMAN (2005) haben den Unterschied bei Sand oder Sägespäne untersucht. Bei Haltung der Tiere auf Sand war die Keimverteilung reduziert.

Jahrelang spielten die anderen Tierarten als VTEC-Reservoir eine untergeordnete Rolle. VTEC-Stämme vom **Schwein** waren im Gegensatz zu solchen des Rindes nur in Ausnahmefällen als humanpathogen beschrieben worden (KARMALI, 1989). Nach neueren Untersuchungen wurden jedoch potentielle EHEC in Schweinefäzes gefunden (HEUVELINK et al., 1999a; MUNIESA et al., 2000), so dass CORNICK und HELGERSON (2004) diese Tierart als Reservoir nicht mehr ausschließen, wenn der Infektionsdruck ansteigt. Obwohl bei Menschen und **Kaninchen** Stämme des Serovars O103:H2 gefunden wurden und Erkrankungen verursachten (HUS und Durchfall bei abgesetzten Kaninchen), wurde eine horizontale Übertragung ausgeschlossen (MARIANI-KURKDJIAN et al., 1993). In einer Studie von GARCIA und FOX (2003) waren acht mit dem Stamm O153:H7/H⁻ infizierte Kaninchen (aus 49) in einem Fachgeschäft gefunden worden.

Tabelle 9 Nachweis verotoxinogener *E. coli*-Stämme bei Nutztieren außerhalb Europas

Land ¹	Tierkollektiv	Probenzahl	VTEC-pos. Proben (%)	Isolierte VTEC und Probenzahl (%)		Literatur
USA	Milchrinder	662	56 (8,4)	O157:H7	1 (0,15)	WELLS et al., 1991,
	Kälber	604	118 (19,5)	O157:H7	17 (2,8)	"
	Milchrinder	4361	x ⁴	O157:H7	52 (1,2)	GARBER et al., 1999
	Milchrinder	888	x	O157:H7	27 (0,3)	RILEY et al., 2003
	Milchrinder	720	x	O157:H7	52 (7,2)	EDRINGTON et al., 2004
	Rinder	676	x	O157:H7	47 (7,0)	GREENQUIST et al., 2005
	Rinder	1026	x	O157:H7	21 (2,1)	DODSON et al., 2005
CDN	Milchrinder	1131	x	non O157	107 (9,5)	WILSON et al., 1992
	Kälber	659	x	non O157	163 (24,7)	"
	Rinder	267	x	O157:H7	35 (13,1)	"
	Kälber	876	x	O157, O103	4 (0,4)	GOW et al., 2003
AUS	Schafe	101	45 (44)	O5:H-, O91:H-	x	BETTELHEIM et al., 2000b
	Milchrinder	588	98 (16,7)	O163:H19	10 (1,7)	COBBOLD et al., 2000
	Schafe ²	475	248 (52)	O157:H7 O26:H11 non O157	11 (1,8) x	" DJORDJEVIC et al., 2004
JPN	Rinder	272	62 (23)	O157, O26, O113, 145	19 (30,6)	KIJIMA-TANAKA et al., 2005
	Schweine	179	32 (14)	x	x	"
	Geflügel	158	x	x	x	"
BR	Milchrinder	197	15 (7,6)	O157:H7	3 (1,5)	CERQUEIRA et al., 1999
	Milchrinder	153	98 (64)	O157:H7	2 (2)	IRINO et al., 2005
ARG	Rinder	200	86 (43)	O157:H7	1 (1,2)	MEICHTRI et al., 2004
VIET	Milchkühe	100	8 (0,8)	O157:H7	2 (0,25)	NAKASONE et al., 2005
KO	Rinder	1854	81 (4,3)	O157:H7/NM ³	69/12	JO et al., 2004
	Schwein	345	1(0,3)	O157:NM	1	"
	Geflügel	418	0	0	0	"

¹USA: Vereinigte Staaten von Amerika, CDN: Kanada, AUS: Australien, JPN: Japan, BR: Brasilien, ARG: Argentinien, VIET: Vietnam, KO: Korea; ²Mutterschafe und Lämmer verschiedenen Alters; ³NM: non motile; ⁴x : keine Angaben/nicht untersucht

Tabelle 10 Nachweis verotoxinogener *E. coli*-Stämme bei Nutztieren in Europa

Land ¹	Tierkollektiv	Probenzahl	VTEC-pos. Proben (%)	Isolierte VTEC und Probenzahl (%)		Literatur
F	Rinder	471	162 (34)	O157:H7	1 (0,2)	PRADEL et al., 2000
D	Milchkühe	726	131 (18)	O26	1 (0,1)	ZSCHÖCK et al., 2000
	Schafe	28	9 (32,1)	Non-O157	x	"
	Ziegen	93	70 (75,3)	Non-O157	x	"
	Pferde	400	1 (0,25)	O113:H21	1	PICHNER et al., 2005
CH	Rinder	2930	x ⁴	O157:H7	6	AL-SAIGH et al., 2004
	Rinder	544	76 (14)	x	x	ZWEIFEL et al., 2005
	Schafe	653	196 (30)	x	x	"
NL	Schweine	145	2 (1,4)	O157	1 (0,6)	HEUVELINK et al., 1999a
	Geflügel	501	0	x	x	"
	Pute	459	6 (1,3)	O157	1 (0,2)	SCHOUTEN et al., 2005a
	Gefl./Sw./Klb. ²	7163	x	O157:H7	853 (11,9)	
S	Milchkühe	371	33 (8,3)	O157:H7	33	ERIKSSON et al., 2005
GB	Schlachtrinder	4800	x	O157:H7	620 (12,9)	CHAPMAN et al., 2001
	Schafe	7200	x	O157:H7	100 (7,4)	"
	Schafe	676	x	O157:H7	44 (6,5)	OGDEN et al., 2005
E	Kühe	268	94 (35)	O2, O8, O22, O77, O82, O105, O113, O171	x	BLANCO et al., 1997
	Kälber	90	34 (37)		x	"
	Rinder	1069	514 (48)	O157:H7	8 (0,7)	BLANCO et al., 2004a
	Ziegen	222	106 (47)	O5:H, O76:H19	x	CORTES et al., 2005
I	Rinder	145	16	O157:7	8 (50)	BONARDI et al., 2004
	Wasserbüffel	289	x	O157:H7	42 (14,5)	GALIERO et al., 2005
SER	Rinder, Sw ³	2017	261	O26, O111, O157	10 (3,9)	COBELJIC et al., 2005
	Schafe, Ziegen	243	166	O128, O55	4 (2,5)	"
	Geflügel	400	4	0	0	"
GR	Ziegen, Schafe, Rinder	351	x	O157:H7	1 (0,2)	DONTOROU et al., 2004
UG	Rinder	159	16	Non-O157	x	KADDU-MULINDW et al., 2001

¹F: Frankreich, D: Deutschland, CH: Schweiz, NL: Niederlande, S: Schweden, GB: Großbritannien, E: Spanien, I: Italien, SER: Serbien, GR: Griechenland, UG: Uganda; ²Geflügel/Schweine/Kälber: gepoolte Proben; ³Sw: Schwein; ⁴x: keine Angaben/nicht untersucht

Pferde, Geflügel, Hunde und Katzen schienen keine wichtige Rolle in der Epidemiologie der VTEC zu spielen (BEUTIN et al., 1993; PICHNER et al. 2005; GOLL, 2005). HEUVELINK et al. fanden 1999a einen EHEC-Stamm in Putenfäzes. In einer Studie über VTEC in verschiedenen Spezies (Milchkühe, Schweine, Hunde, Papageien, Leguane, Menschen) fanden MURINDA et al. (2004c), dass die Isolate von Rindern und Menschen toxigenische Ähnlichkeiten hatten, während Isolate anderer Herkunft wenig miteinander zu tun hatten.

2.2.3 Vorkommen in Lebensmitteln tierischen Ursprungs

Ausgewählte Ergebnisse über das Vorkommen von O157 und anderen VTEC-Stämmen in Lebensmitteln in und außerhalb Europas sind den Tabellen 11 und 12 zu entnehmen.

In Europa wird das Serovar O157 nur selten nachgewiesen, während andere VTEC häufiger zu kultivieren sind (WILSCHAW et al., 1994; PRADEL et al., 2000; BÜLTE, 2001). In den USA fallen jedoch höhere Nachweisraten auf (GRIFFIN u. TAUXE, 1991; RANGEL et al., 2005). In Ländern wie z.B. Kanada und Australien kommt der non-O157 häufiger vor (BETTELHEIM, 2005). In Milch und Milchprodukten wurde der Erreger erst in den letzten Jahren nachgewiesen, wobei nur wenige Keime (MURINDA et al., 2002) und meistens non-O157 gefunden wurden (BÜLTE, 2001; HARTUNG, 2001; PICOZZI et al., 2005).

Demzufolge ist die Diskrepanz zwischen den vorherigen Ergebnissen bezüglich der Prävalenz von VTEC bzw. potentielle EHEC in Kotproben von Nutztierbeständen, insbesondere Wiederkäuern, und den Ergebnissen der Schlachttierkörperuntersuchungen bemerkenswert (ELDER et al., 2000; CHAPMAN et al., 2001). Die Prozentzahlen kommen nicht an die Zahlen von Herdenuntersuchungen heran.

Tabelle 11 Nachweis verotoxinogener *E.coli*-Stämme (VTEC) in Lebensmitteln tierischen Ursprungs in Europa (Literaturauswahl) (Teil 1)

Land ¹	Lebensmittel	Proben	VTEC: n (%)		Literatur
			O157:H7	Andere	
D	Rohmilch	245	0	0	KUNTZE et al., 1996
	Rohmilch	180	0	22 (12,2)	GALLIEN et al., 1998
	Vorzugsmilch	175	0	175 (2,3)	"
	Rohmilchkäse	72	0	2 (2,7)	TEUFEL et al., 1998
	Rohmilchkäse	267	0	2 (0,7)	BÜLTE, 2001
	Stutenmilch	1028	0	0	"
	Rohmilchprod.	337	0	7 (2,0)	HARTUNG, 2001
	Gemischt ²	563	0	x	JÖCKEL, 1997
	Rinderhackfl.	105	0	13 (12,3)	TEUFEL et al., 1998
	Rehfleisch	53	0	4 (11)	THOMS, 1999
	Wurstwaren	158	0	14 (8,8)	TIMM et al., 1999
	Schweinefleisch	307	1 (0,3)	0	BÜLTE, 2001
	Rinderhackfl.	1381	3 (0,2)	92 (6,6)	"
	Rinderhackfl.	454	2 (0,4)	x	"
	Lammfleisch	267	0	14 (5,2)	"
	Tierkörp. (Lamm)	87	0	63 (72,4)	"
Pferdefleisch	100	0	1 (1)	PICHNER et al., 2005	

¹ D: Deutschland; x: keine Angaben/nicht untersucht; ² Rohmilch/-Käse, Rohwurst/-schinken, Rohkostsalate, Hackfleisch

Tabelle 11 Nachweis verotoxinogener *E.coli*-Stämme (VTEC) in Lebensmitteln tierischen Ursprungs in Europa (Literaturauswahl) [Teil 2]

¹Land	Lebensmittel	Proben	VTEC: n (%)		Literatur
			O157:H7	Andere	
F	Rindfleisch	411	0	10 (2,4)	PRADEL et al., 2000
	Käseproben	603	0	6 (1,0)	„
	Tierkörper ² (Rd.) ⁶	1432	41 (2,8)	102 (7,1)	ANDRAL et al., 2004
NL	Rinderhackfl.	571	6 (1,1)	x ⁷	HEUVELINK et al., 1999b
	Schweinehackfl.	76	2 (0,5)	x	„
	Schweineprod.	393	1 (0,3)	x	„
	Geflügel	300	0	x	„
	Schafffleisch	46	0	x	„
	Fertiggerichte ³	328	1	x	„
GB	Hähnchen	71	0	0	SMITH et al., 1991
	Rindfleisch	310	0	54 (17)	WILLSHAW et al., 1994
	Tierkörp. (Sw.) ⁶	1500	21 (1,4)	x	CHAPMAN et al., 2001
	Tierkörp. (Lamm)	1500	10 (0,7)	x	„
	Fleisch (Rd./Sf.) ⁶	4983	22 (0,5)	x	„
IRL	Rohmilch	420	9 (2,14)	-	McKEE et al., 2003
	Rind/Hackfleisch	1533	43 (2,8)	x	CAGNEY et al., 2004
	Rindfleisch	800	x	2 (0,25)	MURPHY et al., 2005
B	Rindfleisch	498	0	9 (1,8)	PIERARD et al., 1997
	Schafffleisch	53	0	3 (5,7)	„
	Wild	58	0	10 (17,2)	„
	Tierkörp. (Rd.)	7567	67 (0,85)	x	CHAHED et al., 2005
	Körperteile (Rd.)	520	5 (0,96)	x	„
	Rindfleisch	2341	4 (0,17)	x	„
	Schwein ⁴	467	0	x	„
	Tierkörp. (Kalb)	150	0	x	„
	Geflügel	576	0	x	„
	Fisch	153	0	x	„
E	Milchprodukte ⁵	502	1 (0,2)	9 (1,8)	REY et al., 2005
I	Rinderhackfl.	500	5 (0,1)	x	FABIO et al., 2004
	Ziegen-/Kuhmilch	144	1(0,7)	11 NT ⁸ (8,0)	PICOZZI et al., 2005
CZ	Geflügel	329	4 (1,2)	5 (1,5)	LUKASOVA et al., 2004
	Fleisch (Rd./Sw.)	294	3 (1)	4 (1,4)	„
	Milch	225	2 (0,9)	2 (0,9)	„
	Salate	51	0	0	„
SER	Gemischtes	956	0	15 (1,6)	COBELJIC et al., 2005

¹F: Frankreich, NL: Niederlande, GB: Großbritannien, IRL: Irland, B: Belgien, E: Spanien, I: Italien, CZ: Tschechische Republik, SER: Serbien; ²Verschiedene Entnahmestellen am Tierkörper; ³Kartoffelomelette, Schweinefleisch, Hühnchenkrokette, Schweinewurst, Fleischbällchen; ⁴Tierkörper, Fleisch; ⁵Schaf-/Ziegenmilch, Frischkäse und Käse; ⁶Rd.: Rind, Sw.: Schwein, Sf.: Schaf; ⁷x: keine Angaben/nicht untersucht; ⁸Nicht typisierbar

Tabelle 12 Nachweis verotoxinogener *E.coli*-Stämme (VTEC) in Lebensmitteln tierischen Ursprungs außerhalb Europas

Land ¹	Lebensmittel	Proben (n)	VTEC: n (%)		Literatur
			O157:H7	Andere	
USA	Schweinefleisch	264	4 (1,5)	X ⁷	DOYLE u. SCHOENI, 1987
	Rindfleisch	164	6 (3,7)	x	"
	Geflügel	263	4 (1,5)	x	"
	Lammfleisch	205	4 (1,9)	x	"
	Rindfleisch	1668	2 (0,12)	x	GRIFFIN u. TAUXE, 1991
	Geflügel	3977	0	x	"
	Rinderhackfl.	107	3 (2,8)	x	PADHYE u. DOYLE, 1991
	Rohe Milch	115	11 (9,6)	x	"
	Rohe Milch	23	1 (4,3)	x	WELLS et al., 1991
	Tierkörper (Rind)				ELDER et al., 2000
	Präviszeration	341	148 (43,4)	x	"
	Posteviszeration	332	59 (17,8)	x	"
	Postverarbeitung	330	6 (1,8)	x	"
	Rohe Milch	268	2 (0,7)	x	MURINDA et al., 2002
CND	Milch	1012	0	7 (0,7)	CLARKE et al., 1989
	Rindfleisch	225	0	82 (36,4)	"
	Schweinefleisch	235	0	25 (10,5)	READ et al., 1990
	Geflügelfleisch	200	0	0	"
	Tierkörper (Rd.) ²	1459	x	22 (1,5)	JOHNSON et al., 2003
	Tierkörper (Sw.) ²	1557	x	33 (2,1)	"
	Tierkörper (Gf.) ²	1480	x	0	"
BR	Rindfleisch	14	0	1 (7,1)	FRANCO et al., 1991
	Milch u. Milch - produkte	36	0	0	"
	Geflügel	21	0	0	"
AUS	Tierkörper (Rd.)	893	4 (0,45)	x	VANDERLINDE et al., 1998
	Rindfleisch ³	685	0	x	"
	Tierkörper (Sf.)	465	0	x	VANDERLINDE et al., 1999
	Schaffleisch ³	415	1	x	"
	Tierkörper (Rd.) ⁴	606	87 (14)	x	FEGAN et al., 2005
NZ	Rindfleisch	91	0	10 (10,9)	BROOKS et al., 2001
	Lammfleisch	37	0	6 (17,1)	"
	Schweinefleisch	35	0	1 (4)	"
	Geflügelfleisch	36	0	0	"
	gemischtes (R/S) ²	10	0	1 (10)	"
	Würste	9	0	0	"
T	Rindfleisch	95	4 (4,2)	x	VUDDHAKUL et al., 2000
KO	Gemischtes ⁵	226	4 (1,8)	x	JO et al., 2004
ZA	Gemischtes ⁶	132	0	x	MOSUPYE u. HOLY, 2000

¹USA: Vereinigte Staaten von Amerika, CDN: Kanada, BR: Brasilien, AUS: Australien, NZ: Neuseeland, T: Thailand, ZA: Südafrika, KO: Korea ; ²Rd.: Rind, Sf.: Schaf, Gf.: Geflügel, Sw.: Schwein, R/S: Rind und Schwein; ³Eingepacktes gefrorenes Rindfleisch bzw. Schaffleisch, ⁴Verschiedene Entnahmestellen ⁵Rind/Schwein/Geflügel; ⁶Straßenverkauf: Rind, Geflügelfleisch, Salat, Fleischsauce; ⁷x: keine Angaben/nicht untersucht;

2.3 Nachweismethoden für verotoxinogene *E. coli* (VTEC) in Lebensmitteln

Der Nachweis der Spezies *E. coli* in einem Lebensmittel dient zumeist als Hygiene-Indikator: je höher die Keimzahl, desto unzureichender ist die Verarbeitungshygiene. *E. coli* kann auch eine Indexfunktion für eine potentielle Gesundheitsgefährdung besitzen. Die selektive Bestimmung der Spezies *E. coli* in Lebensmitteln ist in der ASU (Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren) nach § 64 des LFGB (Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch) beschrieben. Für die Erfassung von VTEC oder einzelner Serogruppen, wie *E. coli* O157, wurden verschiedene Nachweismethoden entwickelt (VERNOZY-ROZAND, 1997; BÜLTE et al., 1998). Die Anwendbarkeit und Eignung der verschiedenen Methoden ist abhängig von der Matrix des Untersuchungsmaterials, wie z.B. Stuhl- und Kotproben, Serum oder Lebensmittel, sowie dem Ausmaß der Kontamination mit VTEC und nicht zuletzt von der Routinetauglichkeit. Bei den nachfolgenden Erläuterungen der zumeist angewendeten Methoden wird eine Unterscheidung in phänotypische und genotypische Verfahren vorgenommen.

2.3.1 Phänotypische Nachweismethoden

2.3.1.1 Verozelltest

Eine zuverlässige, aber relativ aufwendige Methode zum Nachweis von Verotoxinen stellt der Verozelltest dar (KONOWALCHUK et al., 1977). Er soll zur Testung von Kulturüberständen nach Anzucht benutzt werden. Damit werden VT 1, 2 und 2v erfasst. Verotoxine führen an den Zellkulturen durch Blockade auf der Translationsebene (BROWN et al., 1980) zu irreversiblen Zellschäden, die mitunter nach 24h lichtmikroskopisch erfasst werden können. Positive Ergebnisse sind grundsätzlich durch Neutralisationstests zu bestätigen, da bei Zellkulturtests nicht selten unspezifische, falsch-positive Ergebnisse auftreten können (BALJER et al., 1990; KARCH et al., 1990; WACHSMUTH et al., 1991). Der Test dauert drei Tage, bei zusätzlicher Durchführung der Toxin-Neutralisation eine Woche, deshalb wird er nicht in der Routinediagnostik angewendet.

2.3.1.2 Kulturelle Verfahren

Die Anreicherungs- bzw. Subkultivierungsbedingungen sollen sowohl eine optimale Vermehrung der gesuchten Mikroorganismen als auch eine weitestgehende Inhibition der Begleitflora sicherstellen. Dies wird durch den Zusatz selektiv wirkender Substanzen zu den entsprechenden Nährmedien sowie durch Anwendung optimaler Inkubationsbedingungen gewährleistet.

Anreicherungsmedien

Im Allgemeinen finden folgende Flüssignährmedien Anwendung: Laurylsulfat-Tryptose-Bouillon mit Novobiocin (**LST**; MALLMANN u. DARBY., 1941). LST wird bei dem Nachweis von coliformen Keimen bzw. *E. coli* angewandt (ISO 11866, p. 141). Je nach Lebensmittel empfehlen EKHOLM und HIRSHFIELD (2001) bestimmte Kombinationen, wie z.B. LST-MUG (Metyllumbelliferyl-beta-D-glucuronide). Weitere Nährmedien für VTEC in Lebensmitteln sind modifizierte Trypton-Soja-Bouillon mit Novobiocin (**mTSB + N**; DOYLE und SCHOENI, 1987; FABIO et al. 2004), modifizierte Trypton-Soja-Bouillon mit Phosphat-Puffer (**mTSB + PB**, BARKOCY-GALLAGHER et al., 2005), Brillantgrün-Galle-Lactose-Bouillon (**BRILA**; McKENZIE et al., 1948; HECKÖTTER, 1999), modifizierte *Escherichia coli*-Bouillon mit Novobiocin (**mEC + N**; OKREND et al., 1990a), sowie die „EHEC-Enrichment-Broth“ (**EEB**; WEAGANT et al., 1995). In mit Antibiotika supplementierten Anreicherungskulturen kann es jedoch vor allem bei vorgeschädigten bzw. gestressten Zellen stammspezifisch zu wachstumshemmenden Einflüssen kommen. Dies gilt darüber hinaus auch für den Zusatz anderer selektiver Substanzen, wie z.B. Gallensalze (McCARTHY et al., 1998).

Subkultivierungsmedien

Typische *E. coli* O157:H7-Stämme können anhand entsprechend supplementierter Nährböden über die mangelnde Fähigkeit zur Verstoffwechslung von Sorbit und

über fehlende β -D-Glucuronidaseaktivität erfasst werden. Hingegen sind H⁻-Varianten (zu einem Großteil Sorbit- und β -D-Glucuronidase-positiv) und non-O157 Stämme (meistens Sorbit-positiv, variable Enzymaktivität) auf diesen Nährboden von anderen *E. coli* nicht abgrenzbar.

Der **Sorbit-MacConkey-Agar (SMAC)** gehört zu den am häufigsten eingesetzten festen Subkultivierungsmedien zur Unterscheidung des Sorbitverhaltens von *E. coli* (MARCH und RATNAM, 1986). Die Spezifität dieses Agars wurde durch Zusatz von Cefixim und Rhamnose als weiteres diagnostisches Merkmal (CR-SMAC; CHAPMAN et al., 1991) gesteigert. Eine Supplementierung mit Tellurit (CT-SMAC; ZADIK et al., 1993) verschafft einen Selektionsvorteil, während non-O157-VTEC ebenso wie einige Sorbit-positive *E. coli* O157:H⁻ (KARCH et al., 1996b) im Wachstum unterdrückt werden.

Ähnlich verbreitet sind Nährmedien, die als weiteres diagnostisches Potential zum Nachweis von *E. coli* O157:H7 die negative β -D-Glucuronidaseaktivität nutzbar machen. Hierzu werden den Nährböden fluorogene oder chromogene Substanzen, wie z.B. 4-Methylumbelliferyl- β -D-glucuronid (MUG; SZABO et al., 1986) oder 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronid (BCIG; OKREND et al., 1990b), zugesetzt. Ihre Anwendung zum Nachweis von *E. coli* in Lebensmitteln wird in der DIN (Deutsche Industrie Norm) 10110 und 10183 (p. 141) beschrieben. Zu den fluorogenen Nährmedien zählen der „**Hemorrhagic Colitis**“ (**HC**)-Agar (SZABO et al. 1986) sowie der Fluorocult[®] *E. coli* O157:H7 (FC)-Agar der Firma Merck. Diagnostische Vorteile besitzt der HC-Agar durch einen Zusatz von Trypton, so dass ein direkter Nachweis der Indolbildung erfolgen kann. Die Auswertung der Fluoreszenz ist allerdings bei starker Begleitflora kaum möglich (BEUTIN et al., 1994). Kommerzielle chromogene Nährmedien finden erst in den letzten Jahren Verbreitung. Der Rainbow[®] Agar (RB) O157 enthält chromogene Substanzen, die zusätzlich über das Enzym β -Galaktosidase umsetzbar sind. Ein Zusatz von Tellurit und Novobiocin erhöht die Isolierungsrate von *E. coli* O157 (REISSBRODT et al., 1998). In einer Vergleichsstudie zwischen verschiedenen chromogenen und

fluorogenen Medien (RB, Biosynth Culture Medium, HC) mit SMAC-Agar für *E. coli* O157:H7 in Lebensmitteln stellten MANAFI und KREMSMAIER (2001) fest, dass Rainbow-Agar die niedrigste Rate an falsch-positiven Ergebnissen erzielt (2,1 %), gefolgt von BCM (3,3 %), HC (6,2 %) und SMAC (53,7 %).

Das phänotypische Merkmal Enterohämolysinbildung auf **Enterohämolysin (Ehly)-Agar** wurde ursprünglich zum Nachweis von VTEC aus Stuhlproben eingesetzt. BEUTIN et al. (1989) konnten in Untersuchungen von klinischen Stuhlproben auf VTEC anhand dieses Merkmals 81,5 % der VTEC nachweisen, mit den für klassische *E. coli* O157 typischen Merkmalen der fehlenden Sorbitfermentierung und β -D-Glucuronidaseaktivität, nur 48,1 % bzw. 61,1 %. Insgesamt bildeten 85,2 % der als EHEC eingegrenzten VTEC Enterohämolysin. Durch entsprechende Modifizierung konnte die Selektivität über den Zusatz von Vancomycin (POZZI et al., 1996), Cefsulodin und Cefixim erhöht werden (LEHMACHER et al., 1998). Obwohl EHEC, bis auf wenige Ausnahmen, die Gene für das Enterohämolysin tragen, exprimiert jedes vierte Isolat nicht das phänotypische Merkmal (SCHMIDT und KARCH, 1996). Nach Untersuchungen von CHART et al. (1998) kann die Ausprägung der Hämolyse auf dem Blutagar zudem von Inkubationsbedingungen, wie der Temperatur und dem Sauerstoffgehalt, beeinflusst werden.

Inkubationsbedingungen

Die Mikroflora von vielen Lebensmitteln ist sehr heterogen, so dass es grundsätzlich wünschenswert ist, die Begleitflora zu reduzieren. Wie bei den Anreicherungsmedien spielt neben den bereits erwähnten Zusätzen auch die Inkubationstemperatur eine wichtige Rolle. OKREND et al. (1990a) konnten zeigen, dass bei gleicher Wachstumsrate des Zielkeimes – eines *E. coli* O157:H7-Stammes – die Begleitflora bei 42 °C reduziert war, im Vergleich zu 35 °C. Die Inkubationszeit richtet sich nach der Dichte der kompetitiven Begleitflora, sowie der sich anschließenden Schritte zur Isolierung. Häufig sind Zeiträume von sechs Stunden vorgesehen, da innerhalb dieses Zeitraumes eine ausreichende Vermehrung der nachzuweisenden

Organismen, ohne die Gefahr einer Überwucherung durch die Begleitflora, gegeben ist. Andernfalls erfolgt eine Verlängerung um weitere 12-18 Stunden.

Die Vorteile einer Schüttelanreicherung gegenüber einer statischen Inkubation sind in der Literatur nicht eindeutig belegt. Eine effektive Unterdrückung der Begleitflora von Rinderhackfleisch bei gleichzeitig guter Vermehrung von *E. coli* O157:H7 konnten BLAIS et al. (1997a) während einer statischen Anreicherung bei 42 °C erreichen. Hingegen erzielten KLIE et al. (1997) gute Ergebnisse beim Nachweis von VTEC in Rohmilch unter Schütteln im Rahmen eines zweistufigen Anreicherungsverfahrens bei 37 °C.

Resusztation

Bei durch Kälte-, Hitze-, oder Säureeinwirkung vorgeschädigten Zellen kann ein Resusztationsschritt notwendig sein. Eine ausschließliche Inkubation auf nicht-selektiven Medien (AHMED und CONNER, 1995; CLAVERO und BEUCHAT, 1995) oder eine Vorinkubation auf diesen mit anschließender Subkultivierung auf selektiven Medien (McCLEERY und ROWE, 1995; SILK und DONNELLY, 1997), kann die Nachweisrate von Hitze- oder Kälte-geschädigten Bakterien erhöhen. Bei Untersuchungen von UYTENDAELE et al. (1998) zur Ermittlung der Nachweisgrenze der Polymerase-Kettenreaktion, war es bei tiefgefrorenen Proben notwendig, statt einer ansonsten ausreichenden sechs- bis neunstündigen, eine 24-stündige Anreicherung durchzuführen. SAGE und INGHAM (1998) konnten bei Einmischversuchen von *E. coli* O157:H7-Stämmen in Apfelsaft beobachten, dass die durch das Einfrieren geschädigten Zellen vermehrt sensitiv gegen das in den Nachweismethoden enthaltene Novobiocin waren.

Biochemische Reaktionen

Neben der negativen Sorbitfermentierung und der negativen Glucuronidaseaktivität können *E. coli* O157:H7-Stämme auch über weitere StoffwechsellLeistungen, wie

Rhamnoseabbau, präsumptiv erfasst werden. *E. coli* O157:H7 verstoffwechseln Rhamnose überwiegend nicht, non-O157 *E. coli* hingegen zu über 80 % (FARMER und DAVIS, 1985; TRUMPF, 1990; MURINDA et al., 2004b).

2.3.1.3 Immunologische Nachweisverfahren

Als immunologische Nachweisverfahren für *E. coli* O157:H7-Stämme mittels mono- oder polyklonaler Antikörper werden **ELISA** (Enzyme linked immunosorbent assay), **EIA** (Enzyme immunoassay) (TODD et al., 1988; OKREND et al., 1990a; PADHYE und DOYLE, 1991; NEELY et al., 2004), **ELA** (Enzyme labeled antibody, SZABO et al., 1990), **LFIA** (Lateral flow immunoassay; Van AMERONGEN et al., 1993; ALDUS et al., 2003), **Immunoblot** (DOYLE und SCHOENI, 1986), **Immunfluoreszenz** (TISON, 1990) oder **Latex-Agglutinationstests** (FARMER et al., 1985) beschrieben. Wegen der oft geringen Zellzahl in Lebensmitteln ist eine Anreicherung erforderlich. Aufgrund der schnellen Durchführbarkeit und hohen Nachweisempfindlichkeit kommt dem rezeptorspezifischen ELISA besondere Beachtung zu.

Enzyme immunoassay und Enzyme linked immunosorbant-Assay

Der EIA oder ELISA stellt die Kombination zweier wesentlicher Testschritte dar, nämlich die substanz-spezifische Antigen-Antikörper-Reaktion und die anschließende „Visualisierung“ mittels gefärbter Enzym-Substrat-Reaktion (DREHER und MÄRTLBAUER, 1995). Farbreaktionen werden optisch und/oder photometrisch ausgewertet. Es gibt Nachweisverfahren zur Bestimmung der Verotoxine und zum direkten Nachweis der Serogruppe O157. Dabei ist zu beachten, dass es zu einer Kreuzreaktion von O157-Antigenen mit anderen Mikroorganismen, wie *Hafnia* und *Citrobacter* oder auch anderen *Escherichia*-Spezies (z.B. *E. hermannii*), kommen kann. Dieses Phänomen kann auch beim Latextestsystem auftreten. Zur Erfassung nicht typisch reagierender O157-Stämme sowie potentieller EHEC anderer Serovarietäten ist daher die Durchführung eines EIA's zum Verotoxinnachweis empfehlenswert (BÜLTE et al., 1996). Zur Sensitivitätssteigerung von Verotoxin-

Nachweissystemen kann ein Zusatz sog. Enhancer-Substanzen, wie z.B. Mitomycin C oder Carbadox, unerlässlich sein (STAHL und BÜLTE, 2000; DOLL et al., 2001).

Es gibt vielfältige, verschiedenartig aufgebaute Testsysteme (MÄRTLBAUER und BECKER, 1996), die Mikroorganismen oder deren Toxine nachweisen können. In den letzten Jahren haben sich vor allem Testsysteme durchgesetzt, die das Verotoxin nachweisen und damit als Screening-Verfahren eingesetzt werden können. Hier sind beispielweise der Premier EHEC Assay (ACHESON et al., 1996b) und der Verotest (SCHUY und BÜLTE, 1997) zu nennen. Die Sensitivität des Premier-EHEC-Tests bei Einsatz von Kulturüberständen ist vergleichbar mit dem eines Zytotoxizitätstests (KEHL et al., 1997). Vornehmlich *E. coli* O157, aber auch andere Serogruppen wie O26, die ähnliche Verotoxine besitzen, werden über den EHEC-Tek-ELISA nachgewiesen (JOHNSON et al., 1995). Der „Reverse-Passive-Latex-Agglutinations“-Test (RPLA) ermöglicht eine Differenzierung zwischen VT1 und VT2 (BEUTIN et al., 1996b). Eine Automatisierung eines EIA, wie beispielsweise mit dem Mini-Vidas-System (VERNOZY-ROZAND et al., 1998), ermöglicht die Untersuchung einer großen Anzahl an Proben. Um wenige Erreger (10 Zellen pro 0,075 ml) in einer flüssigen Matrix, wie Wasser, zu isolieren, haben ZHU et al. (2005b) einen fluoreszierenden „Sandwich-Immunoassay“ entwickelt, den „Waveguide Biosensor“. Eine Antikörper-Antigen-Reaktion wird in Glas-Kapillarröhrchen abgelesen. Die Durchführung von Enzyme immunoassays dauert - ohne Berücksichtigung des zuvor erforderlichen Anreicherungsschritts - wenige Stunden bis hin zu einem Tag.

Kolonie-Immunoblot

Dieses Verotoxin-Nachweisverfahren (TIMM et al. 1996) ist eine Weiterentwicklung der von HULL et al. (1993) beschriebenen Methode. Aufgrund einer speziellen Doppelmembran-Technik, ist nach Durchführung eines immunologischen Reaktionsschrittes mit anschließender Farbreaktion eine gleichzeitige Identifikation und Isolierung des Erregers von der bewachsenen zweiten Membran möglich. Das

im Agar enthaltene Mitomycin C steigert die Toxinproduktion. Als Test-Kits zum Nachweis von *E. coli* O157 gibt es den Polymacron™EIA-Test (BLAIS et al., 1997b) oder den 3M Petrifilm®-Test (OKREND et al., 1990c; WOODY et al., 1998). Der Petrifilm®-Test, mit dem auch eine direkte Erregerisolierung möglich ist, besitzt allerdings eine niedrige Spezifität (SERNOWSKI und INGHAM 1992).

Hydrophobic grid membrane filter (HGMF)-Enzyme labeled antibody-Verfahren

Das HGMF-Verfahren ist für den Nachweis der *E. coli*-Serogruppe O157 als auch für den Toxinnachweis bei gleichzeitiger Erregerisolierung geeignet (DOYLE und SCHOENI, 1987; TODD et al., 1988; SZABO et al., 1990). Nach Passage der angereicherten bzw. verdünnten Lebensmittelprobe durch einen Membranfilter wird dieser über Nacht auf einem selektiven Agar inkubiert und am nächsten Tag einem Immunoblot-Verfahren unterzogen. Über Enzym-gebundene Antikörper, die z.B. direkt gegen *E. coli* O157 gerichtet sind, werden die Zielzellen anhand von Farbreaktionen sichtbar gemacht. Eine Erregerisolierung ist indirekt über die sogenannte „Replika-Technik“ möglich.

Agglutinationstests

Die Serologie bietet die Möglichkeit einer gezielten Erfassung bestimmter Serogruppen bzw. -typen, wobei aber keine Aussage über das Virulenzprofil gemacht werden kann. Auch hier gibt es eine Reihe von kommerziell verfügbaren Agglutinationstests zum Nachweis verschiedener O-Antigene. Einfache Methoden, wie die Objektträgeragglutination, können zwar eingesetzt werden, allerdings muss die abschließende Bestätigung gegebenenfalls in einem Speziallabor erfolgen, das die Widal-Reaktion (Titrations-Verfahren) durchführen kann.

Immunomagnetische Separation (IMS) von *E. coli* O157-Stämmen

Die IMS stellt ein immunologisches Verfahren zur Separation und Konzentration von Bakterien, wie z.B. *E. coli* O157, Listerien oder Salmonellen, aus Anreicherungskulturen dar. Bei der immunomagnetischen Separation (IMS) werden paramagnetische Partikel verwendet, die mit Antikörpern gegen *E. coli* O157 beschichtet sind. Das Untersuchungsmaterial wird nach Anreicherung in einem Flüssigmedium mit diesen Partikeln vermischt. Mithilfe eines Magnetstreifens werden die Partikel mitsamt den anhaftenden O157-Zellen isoliert. Auf diese Weise können die *E. coli* O157-Zellen aufkonzentriert werden; Reinkulturen werden aber auch hier in der Regel nicht erzielt. Immerhin können mittels IMS 100 *E. coli* O157-Zellen pro Gramm Stuhl in einer Mischflora bei einer Konzentration von ca. 10^7 anderen *E. coli* nachgewiesen werden, während bei direktem Nachweisverfahren 10^5 bis 10^6 *E. coli* O157-Zellen/g Stuhl für ein positives Resultat erforderlich sind (KARCH et al., 1996a; HECKÖTTER et al., 1996). Die Anwendung eines modifizierten Waschpuffers, wie „PBS plus Tween“ 20 (Phosphate-buffered Saline), verbessert die Keimisolierung (BARKOCY-GALLAGHER, et al. 2005). Durch eine optimale Wahl der Inkubationsbedingungen sowie der verwendeten Subkultivierungsmedien, kann die Nachweisrate gesteigert und die Hintergrundflora reduziert werden (BENNETT et al., 1995; OGDEN et al., 2001). Eine Verlängerung der Anreicherungszeit von sechs auf 24 Stunden ist bei Einsatz eines sehr selektiven Subkultivierungsmedium, wie dem CT-SMAC-Agar, erforderlich um geringe Ausgangskontaminationen mit *E. coli* O157 im Probenmaterial detektieren zu können (HECKÖTTER, 1999).

Weit verbreitet sind Dynabeads[®] anti-*E. coli* O157 der Firma Dynal (Norwegen), darüber hinaus ist das System Captivate[™] O157 der Firma Lab M (UK) kommerziell verfügbar. Über die Firma Denka Seiken (Japan) sind immunomagnetische Partikel zur Separation von *E. coli* O26 und O111 erhältlich. Um die Arbeitsgänge zu beschleunigen, können automatisierte IMS (AIMS) verwendet werden (FEGAN et al., 2005).

Die IMS ist mit anderen Methoden, wie der „Real-time“ PCR (FU et al., 2005), der DNS-Hybridisierung (CHEN et al., 1998; CHANDLER et al., 2001) oder auch ELISA-Verfahren (JOHNSON et al., 1995) kombinierbar, wobei die Spezifität und die Sensitivität erheblich gesteigert werden können.

2.3.2 Genotypische Nachweismethoden

In den vergangenen Jahren ermöglichte die Weiterentwicklung molekularbiologischer Methoden eine gezielte Erfassung und exakte Charakterisierung von pathogenen Mikroorganismen. Phänotypisch nicht differenzierbare Stämme können nun auf definierte Virulenzgene untersucht werden. Die Erbinformationen für Virulenzfaktoren im bakteriellen Genom können auf dem Chromosom, auf Plasmiden oder auf Bakteriophagen kodiert sein. CHAUDHURI et al. (2004) haben eine Genom-Auflistung der verschiedenen Bakterien (*Escherichia coli*, *Shigella* und *Salmonellen*) erstellt.

2.3.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) [MULLIS und FALOONA, 1987]

Das Prinzip der DNS-Amplifikation besteht aus der zyklischen Wiederholung von drei Schritten: Die **Trennung** oder Denaturierung der beiden komplementären DNS-Stränge durch Erhitzen, das **Anbinden** oder Hybridisieren von zwei komplementären Startern (Primer) an je einen der beiden DNS-Stränge bei einer Temperatur zwischen ca. 35 und 55 °C (je nach Art und Länge der Primer). Diese Starter sind synthetische DNS-Stücke von etwa zehn bis 30 Nukleotiden, deren Basen so angeordnet sind, dass sie an den Enden des interessierenden Gensegmentes anbinden. Dieser Vorgang wird auch als „Annealing“ bezeichnet. Der dritte Schritt ist die **Synthese** der komplementären DNS-Abschnitte vom 3'-Ende der Starter ausgehend (primer extension) entlang der beiden DNS-Einzelstränge. Das geschieht mit einer DNS-Polymerase (z.B. Taq-DNS-Polymerase, isoliert aus dem Heißwasser-Bakterium *Thermus aquaticus*) bei einem Temperaturoptimum von etwa 72 °C. Dieses Enzym kann nicht die Synthese eines DNS-Einzelstranges initiieren, sondern addiert die in

jedem PCR-Ansatz enthaltenen komplementären Nukleotide entsprechend der komplementären DNS. Die Startermoleküle sind so orientiert, dass die Polymerase die DNS des Komplementärstranges in Richtung des jeweils anderen Starters synthetisiert. Nach einem Zyklus liegt eine vollständige Kopie des ursprünglichen DNS-Doppelstranges im Bereich der beiden Startermoleküle vor. Die Einführung der Polymerase, die den Denaturierungsschritt bei 94 °C ohne wesentliche Wirkungseinbuße übersteht, ermöglicht eine Automatisierung des Prozesses. Es muss nicht in jedem Zyklus erneut Enzym hinzugegeben werden, daher der Name Polymerase-Kettenreaktion (PCR).

Mit jedem Zyklus vermehrt sich die DNS exponentiell: Nach dem zweiten Zyklus liegen vier Doppelstränge vor, nach einem weiteren Zyklus acht, dann 16 usw. Nach 30 Zyklen sind bis zu ca. 10^9 Moleküle des gewünschten Genabschnittes vorhanden. Diese amplifizierte DNS kann mittels Gelelektrophorese sichtbar gemacht werden. In Lebensmitteln liegen inhibitorische Substanzen vor, die PCR erheblich beeinflussen können (OLSEN et al., 1995). Mögliche inhibitorische Einflüsse können neben dem Verdünnen des Probenmaterials auch durch Waschschriffe, Zentrifugation und chemische DNS-Extraktion verringert oder sogar aufgehoben werden. Deshalb ist ein Anreicherungsschritt erforderlich. Bei dieser Methode war es möglich, 1 VTEC auf 10^8 coliforme Keime zu identifizieren (PATON et al., 1993).

Es gibt Primer, die über den Nachweis hochkonservierter DNS-Regionen Verotoxin-Gensequenzen nachweisen, die bei fast allen Verotoxingruppen vorkommen (KARCH und MEYER, 1989b). Weiterhin existieren Primer, mit denen spezifisch die einzelnen Toxintypen (VT1, VT2, VT2-Varianten) oder andere Virulenzgene wie *eae*, *EHEC-hlyA* sowie das VT2-Transporter-Gen (*ile X tRNA*), erfasst werden können (JOHNSON et al., 1990; BÜLTE 2001). Im Screening-Verfahren sollten zunächst Primer eingesetzt werden, die die gesamte Gruppe der Verotoxine erfassen. Dazu eignen sich insbesondere die degenerierten Primer nach KARCH und MEYER (1989b). Die Bestimmung einzelner Virulenzfaktoren kann als Einschätzung der potentiellen Virulenz der jeweiligen Lebensmittelisolate dienen.

2.3.3 Feintypisierung

Die Feintypisierung von Stämmen vor allem eines Serotyps dient der Aufdeckung von Infektketten und Übertragungswegen und dem weiteren Verständnis epidemiologischer Zusammenhänge. In der Regel handelt es sich um Methoden, die auf der Analyse molekularer Strukturen beruhen und fast ausschließlich in Referenzlaboratorien durchgeführt werden. Im Folgenden wird eine Auswahl der wichtigsten Methoden dargestellt.

Ein aussagekräftiges Mittel zur Klärung epidemiologischer Fragestellungen stellt nach Ansicht von GRIFFIN und TAUXE (1991) die **Phagentypisierung** dar. Aus der Angabe des Typs wird erkennbar, durch welche Phagen der entsprechende Stamm lysiert wird. Isolate gleichen Phagen- und Toxintyps sind weiter unterscheidbar über die **Pulsfeldgelelektrophorese** (PFGE), die zum heutigen Zeitpunkt die beste Methode der Diskriminierung von O157-VTEC darstellt (WILLSHAW et al., 2001). Durch selten schneidende Restriktionsendonukleasen wird die DNS in Fragmente gespalten und danach im elektrischen Wechselfeld aufgetrennt. Gelelektrophoretisch wird das sog. Fingerprint sichtbar, das über Dendogramme die Ermittlung des genetischen Verwandtschaftsgrades ermöglicht. Auch die **Random Amplified Polymorphic DNA-PCR** (RAPD-PCR) hat sich als adäquates Mittel der Feindifferenzierung innerhalb epidemiologischer Fragestellungen bewiesen (HOPKINS und HILTON, 2001). Je enger zwei Genome miteinander verwandt sind, desto ähnlicher ist das resultierende Fingerprint-Muster. Nur durch den Einsatz verschiedener zufälliger (random) Primer können enge Verwandtschaftsgrade differenziert werden (WELSH und MacCLELLAND, 1990). Bei der **Restriction fragment length polymorphism analysis** (RFLP) erfolgt eine enzymatische Verdauung der gesamten DNS über Restriktionsenzyme mit anschließender gelelektrophoretischer Auftrennung. In Australien konnte mittels der RFLP ermittelt werden, dass in einem durch Mettwurst ausgelösten Ausbruch drei verschiedene O111:H-Genotypen involviert waren (PATON et al., 1996a).

2.3.4 Standardisierte Verfahren (p. 141)

Zum Nachweis von *E. coli* O157 in Lebens- und Futtermitteln mittels der IMS wurde die Methode L 00.00-68 (DIN EN ISO 16654) in die Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren (ASU) nach § 64 LFGB aufgenommen. Dieses Verfahren wurde durch L 06.00-44 (DIN ISO 10167) für den Nachweis von *E. coli* O157 in Fleisch und Fleischerzeugnissen ergänzt.

Der Serogruppen-unabhängige Nachweis von VTEC in Hackfleisch mittels molekularbiologischer Methoden wird durch die Methode L 07.18-1 (§ 64 LFGB) geregelt. Die wesentlichen Elemente dieses Verfahrens umfassen ein PCR-Screening des angereicherten Lebensmittels, sowie die spezifische Isolierung des Erregers mittels der Koloniehybridisierung.

3 EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1 Material

3.1.1 Referenzstämme

Als positiver EHEC-Kontrollstamm wurde *E. coli* Serovar O157 NCTC 12079 (National Collection of Typed Cultures, London, GB) eingesetzt. Dieser Stamm verfügt über die *vtx1*-, *vtx2*-, *eae*- und *Ehly*-Gene. Als negativer Kontrollstamm diente *E. coli* ATCC 25922 (American Type Culture Collection, Rockville, USA), der keinerlei EHEC-typische Virulenzfaktoren besitzt. Die Lagerung und Konservierung der Referenzstämme erfolgte entweder in einem Gemisch aus Lactose-Bouillon (LB: Difco Nr. 0004-01-5) oder Hefeextrakt-Glucose Bouillon (HGB), sowie jeweils 20 % Glycerin (Merck Nr. 4039). Dieses Gemisch wurde in Kryoröhrchen (Nunc Nr. 479 25111) und Mikrotiterplatten (Greiner Nr. 656101) bei -25 und parallel -70 °C eingefroren.

3.1.2 Probenmaterial

Von Januar 1996 bis April 1997 wurden die verschiedenen Fleisch- und Rohmilchkäseproben in Einzelhandelsgeschäften und an Marktständen in Gießen und Umgebung erworben. Eine Übersicht über die einbezogenen Lebensmittel ist in Tabelle 13 entnehmen. Alle Proben wurden noch am Einkaufstag oder am darauf folgenden Tag untersucht. Ein Teil der Proben wurde für eventuelle Nachuntersuchungen bei -20 °C eingefroren.

Aus der Gruppe der Rohmilchkäseproben wurden Weich- und Hartkäse berücksichtigt, die lose oder verpackt angeboten wurden. Sie stammten aus der Bundesrepublik Deutschland (n=30), Frankreich (n=19), der Schweiz (n=16), Holland (n=2) und Italien (n=1). Sie waren aus Kuh- (n=56), sowie Schaf- und Ziegenmilch (n=12) hergestellt worden.

Tabelle 13 Für die Untersuchung auf verotoxinogene *E. coli* berücksichtigte Lebensmittel tierischen Ursprungs

<u>Lebensmittel</u>	<u>Tierart</u>	<u>Anzahl (n)</u>
Rohmilchkäse		
(Weich-/Hartkäse)	Rind Ziege Schaf	56 7 5
Gesamt		68
Hackfleisch¹		
<u>Roh</u> (Tartar, Hackfleisch, Gulasch)	Rind Rind/Schwein gemischt	60 15
<u>Zubereitet</u> (Mett, Hackepeter)	Schwein Schwein/Rind	21 4
<u>Halbfabrikate</u> (Bratwurst) (Nürnberger Bratwurst, Thüringer Bratwurst, grobe Bratwurst, „Cevapcici“)	Rind Schwein Rind/Schwein	5 25 4
Gesamt		134
Fleisch, Teilstücke		
Keule, Schulter, Beinscheibe, Steaks, Filets, Roulade, Schnitzel, Kotelett	Rind Lamm Kalb	8 178 4
Gesamt		190
Insgesamt		392

¹Einteilung nach Hackfleisch-Verordnung

Die Rind- und Schweinefleischproben stammten aus Deutschland. Es wurden 77 Proben aus Rind- und Kalbfleisch, 23 aus gemischtem Rind- und Schweinefleisch und 46 aus reinem Schweinefleisch untersucht.

Die Lammfleischproben (n=178) stammten aus verschiedenen Herkunftsländern. Es wurden 63 Proben aus dem Inland (frisch und nicht verpackt), 48 aus Irland (frisch, vakuumverpackt), 53 aus Neuseeland (gefroren, vakuumverpackt) und 14 aus Australien (frisch, vakuumverpackt) berücksichtigt. Dabei handelte es sich um Keule, Schulter- und Halsstücke, sowie Hüftsteaks. Die australischen Proben wurden über die Grenzkontrollstelle am Frankfurter Flughafen direkt importiert und wurden im Rahmen eines Lebensmittelüberwachungsprogramm auf ihre Verzehrtauglichkeit untersucht.

3.1.3 Labormaterial

Für die Untersuchung der Proben und die Isolierung der *E.coli*-Stämme wurden folgende Nährmedien, Diagnostika und Geräte benutzt:

3.1.3.1 Nährmedien

- **BRILA** (Brillantgrün-Galle-Laktose-Bouillon) (Fa. MERCK, Nr. M.1.05454.0500) als Anreicherungsmedium für das Probenmaterial
- **CT-SMAC-Medium** (Cefixime-Tellurite-Sorbitol MacConkey) (Fa. SIFIN, Nr. TN 1220) mit Cefixime und Potassium Tellurite Supplement (Fa. DYNAL, Nr. 740.01)
- **Enterohämolyisin-Agar** mit Fertigplatten (Fa. UNIPATH, Nr. RPP 105B)
- **Fluorocult-ECD-Agar** (Fa. MERCK, Nr. M.1.05454.0500)
- **HC-Agar** Platten (Hemorrhagic Colitis-Agar) (Fa. SIFIN, Nr. TN1223) mit Pepton aus Casein (Fa. OXOID, Nr. L42)
- **HGB** (Hefeextrakt-Glucose-Bouillon) bestehend aus Pepton aus Casein (Fa. OXOID, Nr. L42)
Hefeextrakt (Fa. OXOID, Nr. L21)
Natriumchlorid (Fa. MERCK, Nr. 1.06404)
D(+)-Glucose Monohydrat (Fa. MERCK, Nr. 8342)
HGB: 10,0 g Pepton + 5,0 g Hefe + 5,0 g NaCl +5,0 g D-Glucose auf 1000 ml Aqua dest. mit 20 % Glycerin (Fa. MERCK, Nr. 4039) als

alternative Möglichkeit für die Lagerung und Konservierung der verschiedenen Stämme

- **Lactosebouillon** (Fa. DIFCO, Nr. 0004-01-5) mit 20 % Glycerin (Fa. MERCK, Nr. 4039) für die Lagerung und Konservierung der verschiedenen Stämme
- **LST + N** (Laurylsulfat-Tryptose-Bouillon) (Fa. SIFIN, Nr. TN 1152), plus Novobiocin Sodium Crystalline (Fa. SIGMA-ALDRICH Chemie, Nr. SI N1628)
- **PC-Agar** (Plate Count Agar) (Fa. MERCK, Nr. M.1.04038.0500)
- **Ringer-Tabletten** (Fa. KMF, Nr. M.1.15525.0011)
- **TSB** (Caso-Bouillon oder Trypton-Soja-Bouillon) (Fa. BIOTEST, Nr. 95 301 8005)

3.1.3.2 Diagnostika

- **Api 10s** (Fa. BIO-MERIEUX, Nr. 10100 und 20120) zur Identifizierung von *E. coli* als standardisiertes System zur Identifizierung von Enterobacteriaceae.

- **Diagnostic Reagents *E. coli* O157 Test Kit** (Fa. OXOID, Nr. DR 620). Dieser Latexagglutinationstest beinhaltet zwei Latex-Reagenzien. Das Testreagenz besteht aus Latex-Partikelchen, die mit Kaninchen-Antikörpern spezifisch gegen das O157-Antigen von *E. coli* beschichtet sind. Der Kontroll-Test besteht aus Latex-Partikelchen, die mit Kaninchen Globulin beschichtet sind.

- **Dynabeads Anti-*E. coli* O157** (Fa. DYNAL, Nr. 710.04) für die IMS
- **Gram-negativ Färbeset**, Heipha GmbH (Fa. BIOTEST, Nr. 0001 64000)
- **H7-Antiserum** (Fa. DIFCO, Nr. 2159.47.0)
- **Kovacs-Indolreagenz** (Fa. MERCK, Nr. M.1.09293.0100)
- **Premier[™] EHEC**, Testkit (Fa. MERIDIAN BIOSCIENCE EUROPE, Nr. 608096) für die Enzyme-Immuno-Assay-Tests
- **Oxidase-Reagenz** (Fa. BIOTEST, Nr. 934240)

3.1.3.3 Laborgeräte und Material

- **Schüttelinkubator** (Fa. GFL, Nr. 3033) zur Inkubation der Fleischproben in ihrer Anreicherungsbouillon
- **Gerät Sample Mixer** (Fa. DYNAL, MX1 VF2)
- **Magnetstreifen** (Fa. DYNAL, MPC-M)
- **Einwegfilter**, Celluloseacetate Membrane, 0,2 μ (Fa. RENNER, Nr. 06001)

3.1.3.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Gelelektrophorese:

- **Agarose** (Seakem ME) (Fa. BIOZYM Hameln, Nr. 840014)
- **Bromphenolblau-Lösung** bestehend aus
Ficoll (Fa. BIOCHEMICA, Nr. 46326)
Bromphenolblau (Fa. MERCK, Nr. 1.08122.0005)
10 ml von [1,5 g Ficoll + 10 ml Aqua bidest] mit 0,25 ml von [50 mg BPB + 1 ml Aqua bidest]
- **DNA molecular-weight marker VI** (Fa. BOEHRINGER, Nr. 1062)
- **TBE = Tris-Borat-EDTA**, bestehend aus
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Fa. ROTH, Nr. 4855.3)
Borsäure (Fa. MERCK, Nr. 1.12015.0500)
EDTA (Fa. MERCK, Nr. 1.08417.0250)
10 X TBE: 60,60 g Tris + 30,90 g Borsäure + 2,92 g EDTA ad 1000 ml Aqua bidest.
- **Ethidiumbromid** (Fa. MERCK, Nr. 1.11615.0001)
50 μ l [0,1 g Ethidiumbromid + 10 ml Aqua bidest] mit 1,5 l Aqua bidest.

Zur Amplifikation

- **Polymerase-Puffer** 10 X und die Ampli Taq GoldTM Polymerase (Fa. PERKIN ELMER, Nr. 808-0245)
- PCR-Wasser (Fa. INVITROGEN, 46-0360)

- **Nukleotide** (Fa. BOEHRINGER) Herstellung von 10 mM dNTP (dCTP Li-salt 1051 458, dGTP Li-salt 1051 466, dATP Li-salt 1051 440 und dTTP Li-salt 1051 482
- **Primer** (Fa. TIB MOLBIOL, Berlin) (weitere Beschreibungen in Tab. 14):
 - Verotoxin 1/2, Primer MK1, MK2 , Fragmentgröße 230 bp.
 - Verotoxin 1, Primer KS7, KS8, Fragmentgröße 282 bp.
 - Verotoxin 2 und 2c, Primer GK3, GK4, Fragmentgröße 260 bp., 128+142 bp.
 - Verotoxin 2 d, Primer VT2d-AM-I, VT2d-AM-II, Fragmentgröße 242 bp.
 - Verotoxin 2e, Primer FK1, FK2, Fragmentgröße 280 bp.
 - ile X tRNA, Primer 356, 595, Fragmentgröße 640 bp.
 - eae, Primer SK1, SK2, Fragmentgröße 863 bp.
 - Ehly, Primer *hlyA1*, *hlyA4*, Fragmentgröße 1551 bp.

Tabelle 14 Primer zum Nachweis von Virulenzgenen bei *E. coli*-Stämmen

Primer-Akronym	Ziel-Gen	Primer Sequenzen (5'-3')	Referenzen
MK1 MK2	<i>stx</i> general A ¹	TTT ACG ATA GAC TTC TCG AC CAC ATA TAA ATT ATT TCG CTC	KARCH and MEYER, 1989b
SK1 SK2	<i>eae</i> A ²	CCC GAA TTC GGC ACA AGC ATA AGC CCC GGA TCC GTC TCG CCA GTA TTC G	SCHMIDT et al., 1993
KS7 KS8	<i>stx1</i> A ¹	CCC GGA TCC ATG AAA AAA ACA TTA TTA ATA GC CCC GAA TTC AGC TAT TCT GAG TCA ACG	RÜSSMANN et al., 1995
GK3 GK4	<i>stx2</i> B ¹ <i>stx2c</i> B ³	ATG AAG AAG ATG TTT ATG TCA GTC ATT ATT AAA CTG	RÜSSMANN et al., 1995
VT2d-AM-I VT2d-AM-II	<i>stx2d</i> B ¹	AGG GCC CAC TCT TTA AAT ACA TCC CGT CAT TCC TGT TAA CTG TGC G	BÜLTE, 2001
FK 1 FK 2	<i>stx2e</i> B ¹	CCC GGA TCC AAG AAG ATG TTT ATA G CCC GAA TTC TCA GTT AAA CTT CAC C	RÜSSMANN et al., 1995
Hly A1 Hly A4	EHEC <i>hly</i> A ⁴	GGT GCA GCA GAA AAA GTT GTA G TCT CGC CTG ATA GTG TTT GGT A	SCHMIDT et al., 1995
356 595	<i>lle X</i> tRNA	GCA GGA TGA CCC TGT AAC GAA G CCG AAG AAA AAC CCA GTA ACA G	SCHMIDT et al., 1997

¹ Shiga Toxin, Abschnitt A oder B; ² *E. coli* attaching and effacing

³ Zur Differenzierung der *stx2c*-Variante von der klassischen *stx2* über HaellI-Verdau

⁴ EHEC-Hämolyisin

3.2 Methoden

3.2.1 Aufarbeitung des Probenmaterials

Frische Lebensmittel wurden bei nicht sofortiger Aufarbeitung im Kühlraum (<8 °C) gelagert. Für die Verarbeitung der Käseproben wurde als Voranreicherungsmedium eine vorgewärmte (37 °C) ¼ Ringer-Lösung gemäß ASU L 03.00-1 (p. 141) verwendet, die zusammen mit 10 g Käse mit einem Stomacher homogenisiert wurde. 25 g der Fleischprobe bzw. 10 ml der aufbereiteten Käseprobe wurden in 225 ml bzw. 90 ml Anreicherungsbouillon im Luftschüttelinkubator bei 37 °C und 100 U/m für 20-24 h bebrütet.

Die Anreicherung erfolgte in zwei unterschiedlichen Medien: BRILA (Brillantgrün-Galle-Laktose-Bouillon) und LST+N (Laurylsulfat-Tryptose-Bouillon mit Zusatz von 20 mg/ml Novobiocin). Das Novobiocin wurde grundsätzlich frisch in Aqua dest. angesetzt. Die Lösung wurde steril filtriert (0,22 µm) und anschließend dem autoklavierten Grundnährmedium in der erforderlichen Konzentration, unmittelbar vor Verwendung, zugesetzt. Die gebrauchsfertigen Nährmedien wurden in Portionen zu 225 bzw. 90 ml abgefüllt. Nach 24 h Inkubation bei 37 °C im Schüttelinkubator (100 U/m) erfolgte die IMS (Immunomagnetische Separation) für *E. coli* O157 und parallel dazu, die Erfassung von VTEC mit einem EIA (Enzyme immunoassay).

Der Untersuchungsverlauf ist in der Abbildung 1 zusammengestellt.

Abbildung 1 Nachweis von VTEC-Stämmen in Lebensmitteln bei gleichzeitiger Berücksichtigung des Serovars O157

<u>Rohmilchkäse</u>	<u>Fleischprodukte</u>
Probenvorbereitung 10 g Käse + 90 ml Ringer-Lösung ↓	
Homogenisieren (3 min) ↓	
Anreicherung in BRILA ¹ und LST+N ² (10 ml Homogenat + 90 ml Bouillon) 20-24 h, 37 °C, 100 U/min ↓	Anreicherung in BRILA und LST+N (25 g Probe + 225 ml Bouillon) 20-24 h, 37 °C, 100 U/min ↓
Alle Übernachtskulturen ↓	
IMS ³ 50 µl auf CT-SMAC-Agar ⁵ (37 °C, 16-18 h) Verdächtige Kolonien, O157 Antiserum ↓ HC-Agar-Platten ⁶ (41 °C, 16-18 h)	ELISA ⁴ 100 µl in ELISA Kavitäten Extinktionswert > 0,100 ↓ 70 µl des Übernachtsbouillons auf HC-Agar-Platten ⁶ (41 °C, 16-18 h)
Verdächtige Kolonien gepoolt ↓	
Subkultur auf PC-Platten ↓	PCR ⁷ (mit Primer MK1-MK2) ↓
Positives PCR- Ergebnis ↓	
Identifizierung Überprüfen der Zugehörigkeit zu der Spezies <i>E.coli</i> (Indolbildung, Cytochrom-Oxidase, API 10-Test und Fluoreszenz) ↓	
PCR : Bestimmung des Serovars	

¹BRILA : Brillantgrün-Galle-Lactose-Bouillon; ²LST+ N : Laurylsulfat-Tryptose-Bouillon mit Novobiocinzusatz; ³IMS : Immunomagnetische Separation; ⁴ELISA : Enzyme linked immunosorbant assay; ⁵CT-SMAC-Agar Cefixim-Tellurit-Sorbit-MacConkey-Agar; ⁶HC-Agar :Hemorrhagische Colitis-Agar; ⁷PCR: Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)

3.2.2 Immunomagnetische Separation und Subkultivierung von präsumtiven *E. coli* O157

Diese setzte sich aus **vier Arbeitsschritten** (I. – IV.) zusammen:

I. Vorbereitung der Versuchsansätze, Inkubation: Eppendorfgefäße wurden mit je 20 µl Dynabeads® anti-*E. coli* O157 sowie anschließend mit 1 ml angereicherter Probe beschickt. Die Mischung wurde 30 min im Dynal Sample-Mixer geschüttelt.

II. Magnetische Separation: Nach der Inkubationszeit wurde eine Magnetleiste in die Halterung der Probengefäße eingeschoben, um die Magnetkugel-Bakterien-Komplexe zu isolieren. Die Suspension wurde 3 min stehen gelassen.

III. Isolierung und Reinigung: Der Überstand wurde mit einer Pasteurpipette abgesaugt. Die Dynabeads-Bakterien-Komplexe waren als rot-braune Pellets sichtbar. Danach wurde der Magnetstreifen entfernt und mit einer Eppendorf-Pipette 1 ml Waschpuffer in jedes Gefäß pipettiert. Das Beadsediment wurde resuspendiert und erneut für 3 min mit Magnetstreifen stehen gelassen. Nach zwei weiteren identischen Waschvorgängen wurden die Dynabeads in 100 µl Waschpuffer resuspendiert.

IV. Subkultivierung: Von dem mit der IMS erhaltenen Beadsediment wurden jeweils 50 µl auf das Subkultivierungsmedium CT-SMAC (Cefixim-Tellurit-Sorbitol MacConkey) aufgetragen. Das Medium wurde mit einem Wattetupfer und darauffolgend einem Zweiösenausstrich derart beimpft, dass gut voneinander abgesetzte Einzelkolonien wachsen konnten.

Die Bebrütung des **CT-SMAC-Mediums** erfolgte bei 37 °C für 16-18 h. Danach wurden die Nährmedien auf Anwesenheit typischer *E. coli* O157-Kolonien untersucht. Diese Kolonien waren nährmediumfarbig bis braun, besaßen einen Koloniedurchmesser von 1-3 mm und eine glatte, glänzende Oberfläche. Die

verdächtig erscheinenden Kolonien wurden mit O157-Antiserum agglutiniert. Nach Ausschluss von Autoagglutination wurden diese Kolonien weiterhin mit einem H7-Antiserum geprüft und die einzelnen Kolonien auf HC- und PC-Agar subkultiviert. Präsumtive *E. coli* O157 wurden mit Hilfe der PCR auf verschiedene Virulenzfaktoren untersucht (s. 3.2.4)

3.2.3 Enzyme immunoassay und Subkultivierung von präsumtiven VTEC und *E. coli* O157

Für die präsumtive Erfassung von VTEC-Stämmen wurde ein Enzyme immunoassay (Fa. MERIDIAN BIOSCIENCE EUROPE) nach Anweisung des Herstellers mit folgenden Arbeitsschritten eingesetzt:

I. Verdünnung, Inkubation: In Eppendorfgefäßen wurden 100 µl der Übernachtskulturen mit 200 µl des vorgegebenen Probenverdünners versetzt. Die mit monoklonalen Antikörpern gegen *E. coli* SLTI und SLTII beschichteten Mikrotiterkavitäten wurden mit 100 µl der verdünnten Kultur aufgefüllt. Sie wurden 30 sec geschüttelt, mit einer Folie zugeklebt und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

II. Isolierung, Reinigung: Anschließend wurden die Mikrotiterkavitäten mit 200 µl Waschpuffer fünfmal gewaschen und mit zwei Tropfen einer „Detector Antibody“ Lösung (polyklonale Antikörper spezifisch für SLT) gefüllt. Die Platte wurde zugeklebt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Waschgang wurde wiederholt und zwei Tropfen einer Enzym-Konjugat Lösung (polyklonale Antikörper, konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase) dazugegeben. Nach 30 min wurden die Kavitäten fünfmal erneut gewaschen.

III. Visualisierung: Zwei Tropfen einer Wasserstoff-Peroxid-Lösung wurden hinzugefügt und für 10 min inkubiert. Der Waschvorgang wurde wiederholt. Die Reaktion wurde mit einer Stopp-Lösung (Schwefelsäure) beendet und innerhalb von 30 min bewertet.

Obwohl der firmenseitig vorgegebene Extinktions-Grenzwert bei 0,180 lag, wurde der Wert auf 0,100 gesenkt (erste visuelle Anfärbung der Lösung), um die Erfassungsrate zu erhöhen. Bei einem Extinktionswert von $> 0,100$ wurden 70 μl der Übernachtskultur jeweils auf einer PC-Agar Platte (Plate Count Agar) und auf einer HC-Agar-Platte (Hemorrhagic Colitis Agar) mit einem sterilen Glasspatel ausgespatelt. Mit dem jeweiligen gleichen Glasspatel wurden, ohne weitere dekontamination, sukzessive drei PC-Agar Platten und vier HC-Agar Platten beimpft.

Nach 16-18 h Bebrütung bei 41 °C wurde eine **HC-Platte** ausgewählt, auf der ca. 100 gut voneinander abgesetzte Kolonien gewachsen waren. Bis zu fünf phänotypisch differente Kolonien der jeweils verdächtigen Probe wurden in einem Eppendorf-Gefäß gepoolt. Eine Hälfte des Pools wurde auf PC-Platten subkultiviert, die andere Hälfte wurde mit der PCR (Polymerase-Kettenreaktion) unter Einsatz der degenerierten Primer MK1/MK2 untersucht. War das PCR-Resultat positiv, erfolgte eine Nachuntersuchung der Einzelkolonien des betreffenden Pools.

3.2.4 Erregernachweis

3.2.4.1 Nachweis der Spezies *E. coli*

Bei der Bewertung der **HC- und CT-SMAC-Platten** wurde eine Platte, wie oben beschrieben, ausgesucht. Zur deren Untersuchung wurden die Kriterien der Tabelle 15 herangezogen. Anschliessend wurden die Kolonien auf ein PC-Medium überimpft und bei 37 °C für 24 h subkultiviert, um sie anschließend weitergehend zu charakterisieren. Die Zellen wurden nach Gram gefärbt und auf Cytochrom-Oxidase geprüft. Die Indol-Reaktion wurde auf ECD-Agar überprüft. Das Indol-Reagenz wurde direkt mit einer Glaspipette auf die zu prüfenden Kolonien pipettiert. Die subkultivierten Kolonien wurden in einen API 10-Test auf die Zugehörigkeit der Spezies *E. coli* geprüft. Der Test wurde nach 24 h Inkubation kontrolliert.

Tabelle 15 Biochemische Eigenschaften der *E.coli* O157-Stämme

Biochemische Eigenschaft	Nährmedium	Kolonie-durchmesser	Aussehen
Sorbitfermentierung negativ	CT-SMAC (S-)	1-3 mm	- Nährbodenfarben (braun-rosa, braun) - glatte Oberfläche
β -D-Glucuronidase negativ	HC (F-)	1-3 mm	- Nährbodenfarbig (blau) - keine Fluoreszenz
Enterohämolyse	<i>Ehly</i> -Agar	1-3 mm	verblassender Hof um die Kolonien

S-: Sorbitnegativ, F-: Fluoreszenz negativ

3.2.4.2 Multiplex Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Arbeitsschritte des PCR-Ansatzes waren wie folgt:

I. DNS-Aufbereitung: Von den vom HC-Agar für weitere Untersuchungen ausgewählten Kolonien wurde nach Subkultivierung (18 h, 37 °C) eine Abschwemmung mit 1 ml physiologischer Kochsalzlösung (0,9 %) vorgenommen. Die Kolonien wurden mit einem Glasspatel in der Flüssigkeit verrieben, 1,5 ml der Resuspension anschließend mit einer Mikropipette in ein Eppendorf-Gefäß überführt und bei 10.000 U/m fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet dann in 1 ml Aqua bidest resuspendiert, wiederum 5 min bei 10.000 U/min. zentrifugiert und das Pellet in 0,5 ml Aqua bidest aufgenommen. Nach zehnminütigem Kochen der Suspension bei 100 °C im Wasserbad wurde die Aufbereitungslösung sofort auf Eis gelagert.

II. Multiplex PCR-Ansatz: Die in Tabelle 14 (s. 3.1.3.4) aufgeführten Primer wurden in folgendem PCR-Ansatz auf 50 μ l eingesetzt: 2,5 μ l aufbereitete DNS, 5,0 μ l Polymerase-Puffer 10 X, 0,1 μ l Taq GoldTM Polymerase, 5,0 μ l dNTP, 37,4 μ l H₂O.

Zur Vermeidung von DNS-Kontamination anderer Aufbereitungen wurde das Reaktionsgemisch mit 50 µl Mineralöl überschichtet. Bei den meisten Versuchsansätzen wurde ein sog. Mastermix, bestehend aus Aqua bidest, Puffer, dNTPs, Primer und Taq-Polymerase, hergestellt. Nach Durchmischung wurde der „Mastermix“ entsprechend der Anzahl zu untersuchender Ansätze aliquotiert.

III. Gelelektrophorese: Das Gel wurde aus 2 % Agarose in TBE-Puffer, der auch als Laufpuffer diente, hergestellt. Jeweils 10 µl der Amplifikate wurden mit 2 µl Bromphenolblau gemischt und in die Geltaschen gegeben. Die Elektrophorese wurde bei 100 °C für 90 min durchgeführt. Die DNS-Amplifikate wurden für 20 min in Ethidiumbromidlösung (ca. 20 µl Ethidiumbromid in 1 l Wasser) gefärbt. Nicht gebundenes Ethidiumbromid wurde 10 min in Leitungswasser ausgewaschen. Die Darstellung der DNS-Amplifikate erfolgte bei einer Wellenlänge von 302 nm. Der Marker VI wurde bei jeder Gelelektrophorese als Standard für die Molekulargewichtsermittlung amplifizierter DNS-Banden eingesetzt.

Bei jedem PCR-Ansatz dienten der *E. coli* O157-Stamm NCTC 12079 als Positivkontrolle und der ATCC 25922 als Negativkontrolle. Zum generell Nachweis von Toxinen wurden die Primer MK1 und MK2 ausgewählt. Zum Nachweis des *vtx1*-Gens wurden die Primer KS7 und KS8 und zum Nachweis der verschiedenen *vtx2*-Gene die Primer GK3 und GK4 (*vtx2* und *vt2c*) eingesetzt. Weitere Primer waren: VT2d-AM-I, VT2d-AM-II (*vtx2d*), FK1 und FK2 (*vtx 2e*). Das Primer-Paar SK1/SK2 (SCHMIDT et al., 1994) wurde für den Nachweis des *eae*-Gens eingesetzt. Für den Nachweis des EHEC-Enterohämolysin-Gens wurden die Primer *hlyA1* und *hlyA4* eingesetzt (SCHMIDT et al., 1995). Das *ile-X* tRNA-Gen wurde mit den Primern 356/595 nachgewiesen. Die Auftrennung der Amplifikate wurde in 2 % Agarosegel durchgeführt. Die Primer, sowie die jeweiligen Thermoprofile, sind in Tabelle 16 aufgeführt.

Tabelle 16 PCR-Programme zum Nachweis von Virulenzgenen bei *E. coli*-Stämmen

Primer-Akronym	Zielgen	PCR-Programm			Amplifikat (Bp)	Referenzen
		Denaturing	Annealing	Extension		
MK1 MK2	<i>stx</i> general A ¹	94 °C, 60 sec	43 °C, 60 sec	72 °C, 90 sec	~230 bp	KARCH und MEYER, 1989b
SK1 SK2	<i>eae</i> A ²	95 °C, 30 sec	52 °C, 60 sec	72 °C, 60 sec	800 bp	SCHMIDT et al., 1993
KS7 KS8	<i>stx1</i> A ¹	94 °C, 30 sec	52 °C, 60 sec	72 °C, 40 sec	285 bp	RÜSSMANN et al., 1995
GK3 GK4	<i>stx2</i> B ¹ <i>stx2c</i> B ³	94 °C, 60 sec	52 °C, 60 sec	72 °C, 40 sec	260 bp 128+142 bp	RÜSSMANN et al., 1995
VT2d-AM-I VT2d-AM-II	<i>stx2d</i> B ¹	94 °C, 30 sec	54 °C, 40 sec	72 °C, 35 sec	242 bp	BÜLTE, 2001
FK1 FK 2	<i>stx2e</i> B ¹	94 °C, 30 sec	53 °C, 60 sec	72 °C, 40 sec	280 bp	RÜSSMANN et al., 1995
Hly A1 Hly A4	EHEC <i>hly</i> A ⁴	94 °C, 30 sec	57 °C, 60 sec	72 °C, 90 sec	1551 bp	SCHMIDT et al., 1995
356 595	<i>lfe</i> X tRNA	94 °C, 30 sec	52 °C, 60 sec	72 °C, 60 sec	640 bp	SCHMIDT et al., 1997

¹Shiga Toxin, Abschnitt A oder B; ²*E. coli* attaching and effacing

³Zur Differenzierung der *stx2c* Variante von der klassischen *stx2*, *HaeIII*-Verdau

⁴EHEC-Hämolyisin

3.2.4.3 Bestimmung des Serovars

Sämtliche VTEC-Isolate wurden zur Bestimmung der Serovartzugehörigkeit an das Nationale Referenzzentrum für Enteritiserreger (Fr. Prof. Dr. Dr. Aleksic) im Hygiene-Institut der Hansestadt Hamburg gesandt.

3.2.4.4 Zusätzliche Untersuchungen

Um die Isolierungsfrequenz zu erhöhen, wurden von denjenigen Lebensmittelproben, in denen verdächtige bzw. positive Ergebnisse im EIA-Verfahren, jedoch nicht bei der PCR-Untersuchung auftraten, Proben für eine zweite Untersuchungsserie eingefroren. Auch diejenigen Proben, in denen VTEC beim ersten Untersuchungsgang nachgewiesen wurden, wurden erneut analysiert. Die Zeitdifferenz zwischen den beiden Untersuchungsgängen ist in Tabelle 17 aufgelistet.

Tabelle 17 Zeitdifferenz zwischen 1. und 2. Untersuchungsgang

Probenart	1. Untersuchung	2. Untersuchung	Zeitraum
Bratwurst ¹ (D1-D8)	1. ² pos. Probe (frisch)	frisch	8 Tage
Hackfleisch (D13-14)	2. pos. Probe (frisch)	gefroren	1 Jahr
Kotelett (D18)	3. pos. Probe (Vakuum)	gefroren	7 Tage
Rippchen (D19)	4. pos. Probe (frisch)	gefroren	2 Mon., 1 Wo.
Kotelett (D20)	5. pos. Probe (frisch)	gefroren	2 Mon.
Kotelett (D26-28)	6. pos. Probe (frisch)	gefroren	1 Mon., 2 Wo.
Kotelett (D29-32)	7. pos. Probe ³ (gefr.)	gefroren	1 Mon., 3 Wo.
Kotelett (D33)	8. pos. Probe (frisch)	gefroren	3 Mon., 1 Wo.
Keule (D34-40)	9. pos. Probe (frisch)	gefroren	2 Mon., 2 Wo.
Rippchen (D43-47)	10. pos. Probe (frisch)	gefroren	1 Mon.
Keule (D48)	11. pos. Probe (frisch)	gefroren	1 Mon.
Kotelett (D49-54)	12. pos. Probe (frisch)	gefroren	6 Mon.
Keule (D55-58)	13. pos. Probe (frisch)	gefroren	6 Mon., 2 Wo.
Hüfte (D59-62)	14. pos. Probe (frisch)	gefroren	6 Mon., 2 Wo.

¹Interne, fortlaufende Kennzeichnung der einzelnen Isolate; ²pos: positiv; ³gefr: gefroren

3.3 Ergebnisse

3.3.1 Nachweis von *E. coli* O157- und verotoxinogenen *E. coli* (VTEC)-Stämmen in Lebensmitteln tierischen Ursprungs

Es wurden 392 Lebensmittel tierischen Ursprungs untersucht, von denen 14 (3,6 %) mit VTEC-Stämmen kontaminiert waren (Tabelle 18). Unter den dabei isolierten Stämmen konnten sieben verschiedene Virulenzmuster gefunden werden. Weiterhin konnten 14 unterschiedliche Serovare nachgewiesen werden (Tabelle 19). Es wurden auch Stämme isoliert (drei Stämme, drei verschiedene Proben), die das *eae*-Gen, nicht aber das *vtx*-Gen, besaßen. Bei allen Stämmen handelte es sich um Cytochrom-Oxidase-negative, Indol-positive, Gram-negative Stäbchen, die sich im API10-Test als *E. coli* erwiesen.

Tabelle 18 Anzahl der untersuchten Lebensmittel tierischen Ursprungs, sowie Anzahl der Verotoxin-positiven Isolate

Probenart	Tierart	Anzahl der Proben (n)	VT-positive Proben (%)	Anzahl der Isolate (n)
Rohmilchkäse	Kuh	56	0	0
	Ziege	7	0	0
	Schaf	5	0	0
Fleisch/-produkte	Rind, Kalb	77	1 (1,3)	2
Fleisch/-produkte	Schwein	46	1 (2,2)	8
Fleisch/-produkte	gemischt	23	0	0
Fleisch/-produkte	Lamm u. Schaf	178	12 (6,7)	39
	Total	392	14 (3,6)	49

Tabelle 19 Charakterisierung der isolierten verotoxinogenen *E.coli* aus Lebensmitteln tierischen Ursprungs

Lebensmittel	n Isolate (Bezeichnung) ¹	Serovar	Virulenzfaktoren						
			VT1/2	VT1	VT2	VT2 c/d/e	ILE t-RNA	eaеA	EhlyA
Bratwurst (Schwein)	8 (D1-8)	O157:H ⁻	+	-	+	VT2c	-	+	+
Hackfl. (Rind)	2 (D13-14)	O22:H5	+	+	+	VT2c	-	-	+
Kotelett (Lamm)	1 (D18)	O8,60:H ⁻	+	-	+	VT2c	-	-	-
Rippchen (Lamm)	1 (D19)	O8:H ⁻	+	+	-	-	x	-	-
Kotelett (Lamm)	1 (D20)	O8:H ⁻	+	+	-	-	x	-	-
Kotelett (Lamm)	3 (D26-28)	O6:H10	+	+	-	x	x	-	-
Kotelett (Lamm)	4 (D29-32)	O6:H ⁻	+	+	+	VT2d	-	-	+
Kotelett (Lamm)	1 (D33)	O84:H21	+	+	-	x	x	+	+
Keule (Lamm)	2 (D34-35)	O7:H ⁻	+	+	+	VT2d	-	-	+
„	2 (D36-37)	O112a,c:H	+	+	+	VT2d	-	-	+
„	3 (D38-40)	O75:H5	+	+	-	x	-	-	+
Rippchen (Lamm)	5 (D43-47)	O96:H ⁻	+	+	+	VT2d	-	-	-
Keule (Lamm)	1 (D48)	O8,60:H51	+	+	+	VT2d	-	-	+
Kotelett (Lamm)	6 (D49-54)	O65:H ⁻	+	+	+	VT2d	-	-	+
Keule (Lamm)	4 (D55-58)	ONT:H ⁻	+	+	+	VT2d	-	-	-
Hüfte (Lamm)	5 (D59-62)	ONT:H ⁻	+	+	+	VT2d	-	-	+

¹Interne, fortlaufende Kennzeichnung der einzelnen Isolate; über PCR als VTEC bestätigt
x nicht untersucht

In 68 **Rohmilchkäseproben** waren keine VTEC nachweisbar. Nur ein **Rindfleischerzeugnis** von 77 erwies sich als VTEC-positiv (1,3 %). Aus dieser Rinderhackfleischprobe wurden zwei Isolate (Kennzeichnung: D13 und D14) des Serovars O22:H5 kultiviert. Sie konnten Sorbit fermentieren (S+) und erwiesen sich als β -D-Glucuronidase-positiv. Das phänotypische Merkmal Enterohämolyse war ausgeprägt. Mit der PCR waren das *vtx1*-, *vtx2*- und *vt2c*-Gen, ebenso wie das *Ehly*-Gen, nachzuweisen (Tabelle 19). Zusätzlich konnte ein Verotoxin-negativer Stamm isoliert und als dem Serovar O70:H⁻ zugehörig eingestuft werden, der sich als *eae*- sowie als *Ehly*-Gen positiv erwies. Biochemisch fielen die Sorbit- und die β -D-Glucuronidase-Reaktion negativ aus.

Von den 46 **Lebensmittelproben der Tierart Schwein** erwies sich eine Probe als positiv (2,2 %). Ein *E. coli* O157:H⁻-Stamm (acht Isolate mit der Kennzeichnung D1-D8) wurde in einer frischen Bratwurst „Nürnberger Art“ gefunden. Sowohl die Sorbitfermentierung als auch die β -D-Glucuronidase-Aktivität fielen negativ aus. Das phänotypische Merkmal Enterohämolyse war ausgeprägt. Als Virulenzgene konnten *vtx2*, *vtx2c*, *eae* und *Ehly* nachgewiesen werden.

Von den 178 **Lebensmittelproben der Tierart Schaf und Lamm** (Tabelle 18) waren 12 Proben (6,74 %) mit VTEC-Bildnern kontaminiert (zwölf verschiedene Serovare), wobei mehrere Virulenzkombinationen gefunden wurden (Tabelle 19). Zwei unterschiedliche Proben enthielten einen identischen Stamm (O8:H⁻), zwei weitere Proben einen ONT:H⁻-Stamm. Aus einer weiteren Probe konnten drei verschiedene Stämme (O7:H⁻, O112a,c:H⁻ und O75:H5) isoliert werden. Diese VTEC zeigten ein sehr heterogenes Virulenzmuster und konnten folgendermaßen charakterisiert werden:

- Serovar O8,60:H⁻: ***vtx2*, *vtx2c***
- Serovar O6:H10, O8:H⁻, O75:H5, O84:H21: ***vtx1***
- Serovar O6:H⁻, O7:H⁻, O8,60:H51, O65:H⁻, O96:H⁻, O112a,c:H⁻, ONT: H⁻: ***vtx1*, *vtx2***
und ***vtx2 d***
- Serovar O6:H⁻, O7:H⁻, O8,60:H51, O65:H⁻, O75:H5, O112a,c:H⁻, ONT:H⁻: ***Ehly A***
- Serovar O84:H21: ***eaeA***

Sowohl die Sorbitfermentierung als auch die β -D-Glucuronidase-Aktivität fielen mit Ausnahme der Isolate mit der Kennzeichnung D29-D32 und D38-40 positiv aus. Die als D29-32 bezeichneten Isolate, die dem Serovar O6:H⁻ zugeordnet werden konnten, zeigten phänotypisch keine Enterohämolyse, obwohl sie das *Ehly*-Gen besaßen. Weiterhin konnte aus zwei verschiedenen Lammfleischproben jeweils ein *E.coli*-Stamm des Serovars O26:H⁻ isoliert werden, der nur das *eae*-Gen enthielt. Diese Stämme erwiesen sich als Sorbit- und MUG-negativ.

3.3.2 Abhängigkeit des Nachweises vom Anreicherungsverfahren

Aus Tabelle 20 wird ersichtlich, dass der Nachweis von VTEC in den eigenen Untersuchungen von der Anreicherungsbouillon abhängig war. In insgesamt **14 Lebensmittelproben** konnten VTEC-Stämme nachgewiesen werden. Alle Proben wurden einer Wiederholungsuntersuchung unterzogen. Bei **einer Probe** wurden sowohl bei der ersten (Isolate mit der Kennzeichnung D1-3) als auch bei der zweiten Untersuchung Isolate (Kennzeichnung: D4-8) gefunden. 18 Isolate (Kennzeichnung: D13-14, D18-20, D33-40, D43-47) wurden bei **sieben Erstuntersuchungen** isoliert; in sechs Fällen gelang die Isolierung über die Anreicherung in BRILA-Bouillon und nur einmal über LST+N-Bouillon. Bei den **Nachuntersuchungen** wurden **fünf** positive Proben (Isolate mit der Kennzeichnung D29-32, D48, D49-54, D55-58 und D59-62) durch Anreicherung in BRILA und **eine** in LST+N (Isolate Nr. D26-28) ermittelt (insgesamt 6 Proben). Über die BRILA-Anreicherungsbouillon waren somit insgesamt erheblich mehr Stämme zu isolieren. In immerhin **sechs Fällen** (Isolate mit der Kennzeichnung D26-28, D29-32, D48, D49-54, D55-58 und D59-62) gelang die Isolierung eines VTEC-Stammes erst bei der **Wiederholungsuntersuchung**. Die Detektion im Erstansatz war, trotz positiver EIA-Werte, nicht möglich. In vier Wiederholungsuntersuchungen gelang die Isolierung nicht, obgleich der immunochemische Test positiv ausgefallen war.

Tabelle 20 Nachweis von VTEC in Abhängigkeit vom Anreicherungsverfahren (BRILA [Brillantgrün-Lactose-Bouillon] oder LST+N [Laurylsulfat-Tryptose-Bouillon mit Novobiocinzusatz]) und EIA-Ergebnisse in Verbindung mit den Anreicherungsbouillons

Probenart (Herkunftsland)	Isolate ¹	Serovar	Durchgang ²	EIA-Resultate ³ in	
				BRILA	LST+N
Bratwurst (Deutschland)	D1-3	O157:H ⁻	<u>1. U.</u> ⁴	+/-	<u>+</u> ⁴
	D4-8	„	<u>2. U.</u>	<u>++</u>	+/-
Rinderhackfl. (Deutschland)	D13-14	O22:H5	<u>1. U.</u>	<u>+/-</u>	<u>++</u>
	-	-	2. U.	+/-	+/-
Lammschulter (Deutschland)	-	-	1. U.	<u>++</u>	-
	-	-	2. U.	-	-
Lammkotelett (Irland)	D18	O8,60:H ⁻	<u>1. U.</u>	<u>+</u>	-
	-	-	2. U.	<u>+</u>	-
Lammrippchen (Deutschland)	-	-	1. U.	<u>+</u>	-
	-	-	2. U.	-	-
Lammrippchen (Deutschland)	D19	O8:H ⁻	<u>1. U.</u>	<u>+/-</u>	-
	-	-	2. U.	-	-
Lammkotelett (Irland)	D20	O8:H ⁻	<u>1. U.</u>	<u>+/-</u>	-
	-	-	2. U.	-	-
Lammkotelett (Neuseeland)	-	-	1. U.	-	<u>++</u>
	D29-32	O6:H ⁻	<u>2. U.</u>	<u>++</u>	-
Lammkotelett (Deutschland)	-	-	1. U.	+/-	-
	D49-54	O65:H ⁻	<u>2. U.</u>	<u>++</u>	+/-
Lammkotelett (Deutschland)	-	-	1. U.	+/-	-
	D26-28	O6:H10	<u>2. U.</u>	-	<u>+/-</u>
Hals v. Lamm (Deutschland)	-	-	1. U.	<u>++</u>	-
	-	-	2. U.	-	-

¹Interne, fortlaufende Kennzeichnung der einzelnen Isolate; über PCR als VTEC bestätigt.

²erster bzw. zweiter Untersuchungsgang

³++ : positive EIA-Werte (> 0,300): starke visuelle Anfärbung

+ : positive EIA-Werte (0,300 ≥ Wert ≥ 0,180): visuelle Anfärbung

+/-: grenzwertige EIA-Werte (0,180 > Wert ≥ 0,100): leichte visuelle Anfärbung

-: negative EIA-Werte (Wert < 0,100); Isolierung nicht möglich

⁴U. (Untersuchungsgang) oder ± : Isolate gefunden

Tabelle 20 (Fortsetzung) Nachweis von VTEC in Abhängigkeit vom Anreicherungsverfahren BRILA [Brillantgrün-Lactose-Bouillon] oder LST+N [Laurylsulfat-Tryptose-Bouillon mit Novobiocinzusatz] und EIA-Ergebnisse in Verbindung mit den Anreicherungsbouillons

Probenart (Herkunftsland)	Isolate ¹	Serovar	Durchgang ²	EIA-Resultate ³ in	
				BRILA	LST+N
Lammkotelett (Deutschland)	- -	- -	1. U. 2. U.	+ -	- -
Lammbrust (Deutschland)	D33 -	O84:H21 -	<u>1. U.</u> ⁴ 2. U.	<u>+/-</u> ⁴ -	- -
Lammkeule (Australien)	D34-35 36-37 D38-40 -	O7:H ⁻ O112ac:H O75:H5 -	<u>1. U.</u> 2. U.	<u>++</u> -	<u>++</u> -
Lammbrust (Australien)	- -	- -	1. U. 2. U.	+/- +/-	+/- -
Lammbrust (Australien)	- -	- -	1. U. 2. U.	++ ++	- -
Lammkeule (Australien)	- D48	- O8,60:H51	1. U. <u>2. U.</u>	+ <u>++</u>	- -
Lammrippchen (Australien)	D43-47 -	O96:H ⁻ -	<u>1. U.</u> 2. U.	<u>++</u> -	+/- -
Lammkeule (Australien)	- D55-58	- ONT:H ⁻	1. U. <u>2. U.</u>	+/- <u>+/-</u>	- -
Lammhüfte (Australien)	- D59-62	- ONT:H ⁻	1. U. <u>2. U.</u>	+/- <u>+/-</u>	- -

¹Interne, fortlaufende Kennzeichnung der einzelnen Isolate; über PCR als VTEC bestätigt

²erster bzw. zweiter Untersuchungsgang

³ ++ : positive EIA-Werte (> 0,300): starke visuelle Anfärbung

+ : positive EIA-Werte (0,300 ≥ Wert ≥ 0,180): visuelle Anfärbung

+/-: grenzwertige EIA-Werte (0,180 > Wert ≥ 0,100): leichte visuelle Anfärbung

-: negative EIA-Werte (Wert < 0,100)

⁴U. (Untersuchsgang) oder ± : Isolate gefunden

In **Tabelle 20** sind die Ergebnisse derjenigen **20 Proben** zusammengefasst, bei welchen positive oder grenzwertige **EIA-Werte** bei der **Erstuntersuchung** feststellbar waren. **Acht Proben** waren mit VTEC kontaminiert. Vier davon (Isolate

D1-3, D18, D34-40, D43-47) hatten Extinktionswerte, die größer als 0,180 waren, weitere vier Proben (Isolate D13-14, D19, D20, D33) hatten grenzwertige Extinktionen zwischen 0,100 und 0,180. In den **Nachuntersuchungen** ergaben **10** der **20** mit dem EIA selektierten Proben positive oder verdächtige Werte. Aus sieben Proben gelang der Nachweis von VTEC. Ein Isolat (D1-3) wurde bereits bei den ersten Untersuchungen detektiert. Vier Proben (Isolate D4-8, D29-32, D49-54, D48) hatten Extinktionswerte, die größer als 0,180 waren, drei weitere (Isolate D26-28, D55-58, D59-62) hatten Werte zwischen 0,100 und 0,180.

In einer einzigen Probe („Nürnberger Bratwurst“) wurden bei der ersten Untersuchung *E. coli* O157-Isolate (D1-3) nach Anreicherung in LST+N, Anwendung der IMS und Subkultivierung auf CT-SMAC gefunden. In einem zweiten Untersuchungsdurchgang wurden aus diesem Lebensmittel fünf weitere *E. coli* O157-Isolate (Kennzeichnung: D4-D8) nach Anreicherung in BRILA, Anwendung der IMS und Subkultivierung auf CT-SMAC isoliert. Es handelte sich um das Serovar O157:H⁻. Als Virulenzfaktoren konnten VT2, *eae* und *Ehly* nachgewiesen werden. Alle anderen Proben waren *E. coli* O157-negativ. Es war auch die einzige Probe, bei der Isolate mit der IMS-Methode gewonnen wurden.

3.3.3 Biochemische Eigenschaften der isolierten Stämme

Da die Kolonien der großen Gruppe der VTEC sich wie saprophytäre *E. coli* phänotypisch auf den Nährmedien darstellen konnten, wurden viele typisch und untypisch aussehende Kolonien in Betracht gezogen (Tabelle 21). Die Kolonien wurden nach ihrer Größe, Oberfläche (rau oder glatt) und Farbe (gelb oder weiß) beurteilt. Verschiedene Varianten waren möglich, wie z.B. gelbe Kolonien, die Fluoreszenz-negativ (F-) waren oder Nährbodenfarbige Kolonien, die Fluoreszenz-positiv (F+) waren.

Tabelle 21 Biochemische Eigenschaften der verschiedenen Stämme

Probenart (Herkunftsland)	Serovare	Biochemie ¹			
		HC	CT-SMAC	ECD	Ehly
Bratwurst (D) ²	O157:H ⁻	S-F ⁻³	S-	F-I ⁺⁴	+
Rinderhackfl. (D)	O22:H5	S+F ⁺⁴	S+	F+I+	+
Lammkotelett (IRL) ⁵	O8,60:H ⁻	S+F+	S+	F+I+	-
Lammrippchen (D)	O8:H ⁻	S+F+	S+	F+I+	-
Lammkotelett (IRL)	O8:H ⁻	S+F+	S+	F+I+	-
Lammkotelett (NZ) ⁶	O6:H ⁻	S-F+	S-	F+I+	-
Lammkotelett (D)	O6:H10	S+F+	S+	F+I+	-
Lammkotelett (D)	O65:H ⁻	S+F+	S+	F+I+	+
Lammkotelett (D)	O84:H21	S+F+	S+	F+I+	+
Lammkeule (D)	O7:H ⁻	S+F+	S+	F+I+	+
	O112ac:H	S+F+	S+	F+I+	+
	O75:H5	S-F+	S-	F+I+	+
Lammkeule (D)	O8,60:H51	S+F+	S-	F+I+	+
Lammrippchen (AUS) ⁷	O96:H ⁻	S+F+	S-	F+I+	+
Lammkeule (AUS)	ONT:H ⁻	S+F+	S+	F+I+	+
Lammhüfte (AUS)	ONT:H ⁻	S+F+	S+	F+I+	+

¹ HC: Hämorrhagische Colitis; CT-SMAC: Cefixim-Tellurit-Sorbit-MacConkey-Agar; ECD: *Escherichia coli*-Direkt-Agar; Ehly: Enterohämolysin-Agar

² D: Deutschland; ³ Sorbit- und Fluoreszenz-negativ; ⁴ Fluoreszenz-negativ und Indol-positiv

⁵ IRL: Irland; ⁶ Neuseeland; ⁷ AUS: Australien

4 DISKUSSION

Seit 1982 sind Verotoxin-bildende *E. coli* (VTEC) und dabei insbesondere die Untergruppe der enterohämorrhagischen Stämme (EHEC) als Verursacher lebensmittelbedingter Infektionen des Menschen bekannt. Die Besonderheit dieses Keimes ist, dass alle Lebensmittel potentiell kontaminiert werden können. Dazu zählen auch solche, die nicht tierischer Herkunft sind, wie zum Beispiel Apfelsaft (BESSER et al., 1993) oder grüner Salat (WELINDER-OLSSON et al. 2004). Eine weitere besondere Eigenschaft liegt in der Virulenz der EHEC-Stämme. Für die Serovare O157 und O111 ist nachgewiesen, dass ein sehr kleines Inokulum von ca. 10-100 Keimen pro Gramm ausreicht, um eine Erkrankung hervorzurufen (GRIFFIN und TAUXE, 1991; WILKS et al., 2007).

In der vorliegenden Arbeit wurden Lebensmittel verschiedenen Ursprungs, wie Rohmilchkäse und Fleisch verschiedener Tierarten, auf VTEC, unter besonderer Berücksichtigung des *E. coli*-Serovars O157, untersucht. Non-O157-Serogruppen dominierten deutlich. Die Ergebnisse bestätigen die Resultate vorangegangener Studien. RICHTER et al. (1998) konnten ebenso in keiner der 138 Rinderhackfleischproben *E. coli* O157 nachweisen, jedoch in 17 Proben (12,3 %) non-O157 VTEC-Stämme. Die in dieser Arbeit isolierten Stämme gehören 14 verschiedenen Serogruppen an. Die Vielfalt der VTEC bei Menschen oder bei Tieren ist sehr hoch. In einer dreijährigen Studie aus Deutschland konnten BEUTIN et al. (2004) neben elf menschenpathogenen VTEC weitere 31 Serotypen isolieren. Diese waren bis dahin noch nicht als Krankheitserreger beim Menschen in Erscheinung getreten. In einer umfangreichen Darstellung hatte BETTELHEIM (2005) alle weltweit bekannten VTEC im Internet aufgelistet. Für das Jahr 2005 wurde geschätzt, dass *E. coli* O157-Stämme ca. 73.000 Erkrankungen sowie 60 Tote in den USA verursacht hatten, während es durch non-O157 *E. coli* zu 37.000 Erkrankungsfällen gekommen war (MEAD et al., 1999; RANGEL et al., 2005).

4.1 Zum Nachweis von VTEC in verschiedenen Lebensmitteln

Es wurden 68 **Rohmilchkäsesorten** (Hart- und Weichkäse) von Schafen, Ziegen und Kühen untersucht, alle mit negativem Resultat. Aufgrund des hohen Wassergehaltes und des im Verlauf der Reifung steigenden pH-Wertes bieten Rohmilchkäse und vor allem Weichkäse ein günstiges Milieu für das Wachstum von *E. coli*. Bei diesen Käsesorten werden sie regelmäßig isoliert. Darunter befinden sich vereinzelt VTEC (KNAPPSTEIN et al., 1996; TEUFEL et al., 1998). Eine italienische Untersuchung über *E. coli* O157 in Milchprodukten stellte auch sehr niedrige Nachweisraten fest. Aus 2948 Milchprodukten enthielt nur ein Rohmilchkäse *E. coli* O157 (CONEDERA et al., 2004). Auf non-O157-VTEC wurde nicht untersucht. Zum Jahreswechsel 2002/2003 wurden 13 hämorrhagische Colitis-Fälle nach Verzehr von Rohmilch-Hartkäse (Gouda) in Kanada gemeldet (HONISH et al., 2005). Zwei Kleinkinder (22 Monate und vier Jahre alt) entwickelten ein HUS. *E. coli* O157:H7 wurde isoliert. Bei Lagerungstemperaturen von ≥ 10 °C können sich EHEC ohne weiteres in Weichkäse vermehren. Konservierungsmittel, wie NaCl und Kalium-Benzoat, können das Erregerwachstum einschränken (KASRAZADEH und GENIGEORGIS, 1995) und damit bedingt zur Sicherheit des Lebensmittels beitragen.

Neben Milchprodukten wurden auch **Fleischerzeugnisse** verschiedener Herkunft untersucht. Aus **Schweinefleisch** wurde lediglich ein EHEC-Stamm isoliert. Die Isolierung von O157:H⁻ (D1-D8) in frischer Bratwurst „Nürnberger Art“ ist nicht typisch. Schweine sind bisher nicht als O157:H⁻-Ausscheider in Erscheinung getreten. Es handelt sich in diesem Fall wahrscheinlich um eine sekundäre Kontamination. Von Schweineprodukten als Erkrankungsursache ist zwar gelegentlich berichtet worden, aber die eigentliche Kontaminationsquelle der Lebensmittel konnte nicht ermittelt werden. In Australien wurde ein EHEC-Stamm (O111:H) in einer Mettwurst gefunden, die aus Rind-, Schweine- und Lammfleisch hergestellt wurde (PATON et al., 1996a). Dabei erkrankten 20 Kinder an HUS, ein Kind verstarb. In Washington und Kalifornien (USA) wurde 1994 O157:H7 in einer

Salami (CDC, 1995) gefunden. Bei ungewöhnlichen Infektionsquellen müssten dann verschiedene Faktoren, wie Produktherkunft und -zusammenstellung analysiert werden. Bei einer griechischen Studie wurde *E. coli* O157:H7 in einer von 75 traditionellen frischen griechischen Schweinewürsten und in einer von 50 Schweinedarmzubereitungen isoliert (DONTOROU et al., 2003).

Bei der Untersuchung von 77 **Rindfleischproben** wurden zwei verschiedene Stämme (O22:H5 und O70:H⁻) im Hackfleisch dieser Tierart gefunden, wobei der O70:H⁻-Stamm ein Zufallsbefund war, da er keine Toxine besaß, sondern nur *eae* und *hlyA*. Aus diesem Grund konnte er im EIA nicht detektiert werden. In Belgien konnten PIERARD et al. (1997) von 1532 Rindfleischproben 25 VTEC-positive Proben (1,6 %) entdecken. In Deutschland wurden 1835 Rinderhackfleischproben untersucht, davon 454 nur auf O157:H7. 95 Proben waren mit VTEC und fünf mit O157:H7-Stämmen infiziert (BÜLTE, 2001). In Deutschland wurden außer *E. coli* O157 auch folgende Serogruppen im Stuhl von HUS-Patienten gefunden: O26, O145, O111, O103 (KARCH et al, 2005). Diese Serogruppen sind ursprünglich Rinder-VTEC (GEUE et al. 2002; JORES et al., 2005). Nach dem letzten großen EHEC-Ausbruch in Schottland 1996 wurden regelmäßig Kot-, Schlachtkörper- und Fleischproben von Rindern und Schafen in Großbritannien entnommen. In ihrer letzten Untersuchung in Yorkshire fanden CHAPMAN et al. (2001) heraus, dass von 3112 Rinderfleischproben zwölf (0,39 %) *E. coli* O157-positiv waren. In Italien lagen die in Zusammenarbeit mehrerer Laboratorien ermittelten Prävalenzen ebenfalls niedrig. Es wurden 931 Rinderhackfleischproben untersucht, dabei entdeckte man vier VTEC des Serovars O157 (0,43 %) (CONEDERA et al., 2004). Auf Non-O157-VTEC wurde nicht untersucht.

In der vorliegenden Arbeit wurden die meisten VTEC in **Lammfleisch** gefunden. Von 178 Proben waren zwölf VTEC-positiv, darunter befanden sich jedoch keine O157:H7-Stämme. Die niedrige Isolierungsrate von O157:H7 aus Lammprodukten wurde auch bei CHAPMAN et al. (2001) festgestellt. In einer groß angelegten Untersuchung konnte das britische Team unter 1144 Lammfleischproben neun *E. coli*

O157-positive Proben (0,79 %) nachweisen.

Bei den eigenen Untersuchungen sind fünf Proben aus Australien, vier Proben aus Deutschland, zwei aus Irland und eine aus Neuseeland VTEC-positiv. Bei Untersuchungen in Neuseeland wurden 37 Lamm- und Schaffleischproben in Supermärkten oder bei Metzgern gekauft und untersucht, wovon sechs Proben VTEC-positiv (17,1 %) waren. Auch hier konnten keine *E. coli* O157-Stämme nachgewiesen werden (BROOKS et al., 2001). Untersuchungen in Australien haben gezeigt, dass aus 467 gefrorenen Lammfleischproben sechs (1,3 %) O157:H7-positiv waren (PHILLIPS et al., 2001). Im Vergleich dazu liegen die VTEC-Nachweisraten bei Schlachttierkörpern oft höher, z.B. in Deutschland waren von 87 Proben 67 VTEC-positiv (BÜLTE, 2001). Untersuchungen in Yorkshire hingegen ergaben 10 VTEC-positiv Befunde bei 1500 Proben (CHAPMAN et al., 2001). In einer australischen Untersuchung fanden PHILLIPS et al. (2001) unter 917 Proben sechs *E. coli* O157-positive Proben. Es fiel auf, dass unter dem im Handel befindlichen Schaffleisch wenig VTEC-positiv Proben vorzufinden waren. Große und kleine Wiederkäuer sind das eigentliche Reservoir für VTEC-Stämme, worunter sich EHEC befinden. Die hohen Kontaminationsraten bei Schafkörpern sind durch teilweise hygienewidrige Prozessabläufe bei der Schlachtung bedingt. Eine Erklärung für das Verschwinden dieser Erreger wäre die verminderte Konkurrenzfähigkeit der mesophilen VTEC gegenüber der psychophilen Begleitflora im Laufe des Kühlungsprozesses (BÜLTE et al., 1997).

Die Bedeutung der Hygiene in der Schlachttier-Technologie ist offensichtlich. Das Waschen der Schlachttiere führt zu einer Reduzierung des Schmutzes und somit zu einer Verminderung der mikrobiellen Belastung. Dennoch wird eine Kontamination mit pathogenen Mikroorganismen nicht vollständig verhindert. Hierzu kamen BOSILEVAC et al. (2005) zu dem Schluss, dass das Waschen mit ozoniertem oder elektrolysiertem Wasser die Keimbelastung reduzieren würde.

Eine Kontamination kann weiterhin beim Verschließen des Ösophagus („rodding“), bei Umhüllung und Verschließen der Analregion, der Enthäutung und bei der Eröffnung der Bauchhöhle mit anschließendem Ausweiden des Magen-Darm-Traktes auftreten. Die Oberflächenbehandlung der Tierkörper könnte auch eine Rolle spielen. Eine weitere wichtige Maßnahme in der Fleischverarbeitungskette ist die Kühllagerung der Tierkörper. Dabei setzen sich psychrotrophe Mikrofloraanteile durch und drängen die mesophilen Infektions- und Intoxikationserreger zurück. Bei einer Untersuchung stellten BARKOCY et al. (2003) fest, dass vor der Eviszeration von 1232 Tierkörpern bei 329 *E. coli* O157:H7 (26,7 %) zu isolieren und nach Kühlung nur noch 15 (1,2 %) positiv waren. Werden die mikrobiologischen Prozesse und die kompetitive Hemmung der um mehrere Zehnerpotenzen höher angesiedelten psychrotrophen Mikroflora unterbunden, besteht die Gefahr, dass sich die in geringer Konzentration vorzufindenden gesundheitlich bedenklichen Mikroorganismen vermehren. Untersuchungen über den Einfluss der Begleitflora auf *E.coli*-O157 in Rinderhackfleischproben belegen die Bedeutung der saprophytären Mikroorganismen (VOLD et al., 2000). Eine Fleischbehandlung mit antimikrobiellen Chemikalien, wie organischer Säure oder Trisodium Phosphate (TSP), reduziert die Keimbelastung. TSP hat eine dreifache Wirkung durch einen hohen pH-Wert (12), ionische Stärke und einen Detergentien-Effekt. Es wurden jedoch auch TSP-tolerante O157:H7 gefunden (YUK und MARSCHALL, 2006).

Nach dem ersten Untersuchungsgang wurden positive oder verdächtige Proben für Wiederholungsuntersuchungen eingefroren. Bei den Folgeuntersuchungen konnten zusätzlich Stämme nachgewiesen werden, die in den Erstuntersuchungen nicht isoliert wurden. Im Jahre 2003 wurden in Minnesota gefrorene eingelegte Rindersteaks aus dem Handel zurück gezogen, nachdem 16 (eine davon mit HUS) Personen in fünf Staaten durch *E. coli* O157 erkrankten (LAINE et al., 2005). In ihrer Arbeit konnte HECKÖTTER (1999) *E. coli* O157:H7-Stämme reisolieren, die einer achttägigen Lagerung bei -25 °C unterzogen worden waren. Die Reisolierungsrate war fast identisch mit den Ergebnissen der Versuche mit den frischen Hackfleischproben. DOYLE und SCHOENI (1984) war es möglich, ein Überleben von

E. coli O157:H7 in tiefgefrorenen Lebensmitteln bis zu neun Monaten zu beobachten. SEMANCHEK und GOLDEN (1998) konnten belegen, dass bei einer Lagerung von *E. coli* O157:H7-Stämmen bei -20 °C über einen Zeitraum von bis zu sieben Monaten ein Großteil (vier bis sechs log-Stufen) der Population abstirbt, aber dennoch eine nachweisbare Anzahl an Keimen überlebt. Demzufolge ist das Einfrieren eine nicht ausreichende Lösung für die Keimfreiheit des Fleisches (BOLTON et al., 2002). Die Überlebensfähigkeit von *E. coli* O157:H7 nach einer Kälteschockbehandlung war bei Milch, Eiern und Wurst sogar gestiegen (BOLLMAN et al., 2001).

Im Bereich der Weiterverarbeitung von Lebensmitteln tierischen Ursprungs sind die üblichen Hitzebehandlungsverfahren, wie sie z.B. bei der Brüh- und Kochwurstherstellung Anwendung finden, zuverlässige Methoden zur Abtötung von VTEC-Stämmen. Ebenso ist die Pasteurisierung der Milch als sichere Maßnahme einzustufen. Bei der Rohwurstherstellung sind die Reifungsprozesse nicht ausreichend (MÜLLER et al., 1998). Eine Gamma-Bestrahlung dieses Produktes könnte helfen, *E. coli* O157:H7, sowie den *Listeria monocytogenes*-Gehalt, zu reduzieren (BADR, 2005). Als Risikolebensmittel bleiben somit diejenigen, die dem Rohverzehr dienen, wie Rohmilch, Rohmilchkäse und rohe Rinderhackfleischerzeugnisse. Von zunehmender, häufig auch unterschätzter Bedeutung sind Lebensmittel pflanzlichen Ursprungs, die mit O157-haltigen Rinderfäzes verschmutzt wurden. O157:H7 persistieren ca. 154 bis zu 217 Tagen in Böden, die durch Düngung infiziert worden sind. Grünsalate, die mit infiziertem Wasser gegossen wurden, bleiben etwa 77 bis 177 Tage infektiös (ISLAM et al., 2004). KWON et al. (2003) schlugen vor, Gemüse mit einer alkalischen ionischen Flüssigkeit zu waschen, um bakterizide Wirkung zu erzielen. Bei der Joghurt-Herstellung wurde untersucht, ob probiotische Kulturen (*Lactobacillus casei*) den *E. coli* O157:H7-Gehalt reduzieren würden. BARRANTES et al. (2004) konnten eine Senkung des Keimgehaltes registrieren.

4.2 Serovare und Virulenzspektrum

Unter den VTEC-Stämmen aus den verschiedenen Lebensmitteln befanden sich außer einem hoch virulenten O157:H⁻-Stamm weitere Stämme, die teilweise bereits in Verbindung mit Erkrankungen des Menschen aufgeführt wurden. Es sind 14 verschiedene Serovare: O6:H⁻, O6:H10, O7:H⁻, O8:H⁻, O8,60:H51, O8,60:H⁻, O22:H5, O65:H⁻, O75:H5, O84:H21, O96:H⁻, O112a,c:H, O157:H⁻ und ONT:H⁻. BETTELHEIM (2005) listet in VTEC-Tabellen einige der nachgewiesenen Serotypen auf:

- **O6:H⁻** bei Schafen bzw. Rindern in Australien, den USA, Neuseeland und Spanien und bei Menschen (Durchfall) in Belgien, Deutschland und zuletzt (HUS) in Spanien (BLANCO et al., 2003a und b).
- **O6:H10** bei Schafen und Rindern in Deutschland, England, den USA, Frankreich, Norwegen und Spanien (BLANCO et al., 2003a und b).
- **O8:H⁻** bei Menschen (asymptomatisch und Durchfälle) [FRIEDRICH et al., 2002] und Lebensmitteln (BLANCO et al., 2003b) in Deutschland
- **O22:H25** bei Menschen (HUS) in USA (STROCKBINE et al., 1997)
- **O65:H⁻** bei Schweinen in Kanada (Des ROSIERS et al., 2001)
- **O75:H5** bei Menschen (HUS) in Deutschland (BOCKEMÜHL et al., 1992)
- **O84:H21** ist nicht direkt aufgelistet, sondern O84:?, der bei Rindern in Kanada und Deutschland gefunden wurde.
- **O96:H⁻** bei Menschen (asymptomatisch und Durchfälle) in Deutschland (FRIEDRICH et al., 2002) und bei Hirschen in Japan (ASAKURA et al., 1998).

Die Stämme aus den Serovargruppen O7:H⁻, O8,60:H51, O8,60:H⁻, O112a,c:H und ONT:H⁻ sind nicht in den Tabellen aufgenommen. ONT:H25 (nicht typisierbar) wurde bei Untersuchungen von Rinderfäzes häufig gefunden (SHENG et al., 2005). Er ist phänotypisch identisch mit *E. coli* O157:H7, d.h. Sorbit- und β -D-Glucuronidase-negativ und besitzt die Virulenzgene *eae- β* , *tir*, *stx(2vh-a)* und *Ehly*. Der in dieser Studie untersuchte ONT:H⁻ wurde bei Lammfleisch gefunden und besitzt *vtx1*, *vtx2d* und *Ehly*.

Inzwischen sind mehr als 200 *E. coli*-Serotypen bekannt, die Verotoxine produzieren (BEUTIN et al., 2004) und hoch virulent sind. In Deutschland wurden außer *E. coli* O157 die Serogruppen O26, O145, O111 und O103 im Stuhl von HC/HUS-Patienten gefunden (KARCH et al., 2005). In diesem Fall sind sie als EHEC zu betrachten. In Europa sind folgende VTEC als hoch pathogen aufgelistet worden: O26:H11 oder O26:H⁻, O91:H⁻, O103:H2, O111:H⁻, O113:H21, O117:H7, O118:H16, O121:H19, O128:H2 oder H⁻, O145:H⁻ und O146:H21 (ZWEIFEL et al., 2004).

Bei den VTEC-Stämmen aus den eigenen Untersuchungen wurden sowohl **vtx1-** als auch **vtx2-Gene** gefunden. Bei der weiteren Differenzierung der *vtx2*-Gruppe wurden drei Stämme mit *vtx2c* und acht mit *vtx2d* festgestellt. In einer Stuhluntersuchung bei erkrankten Menschen wurde *vtx2c* bei Patienten mit HUS und Enteritis und *vtx2d/e* bei Patienten, die nur an Enteritis litten, entdeckt. Bei asymptomatischen Trägern wurden auch *vtx2c/d/e* gefunden. Demzufolge wäre *vtx2c* potentiell virulenter als *vtx2d/e*, welches bei leichten Erkrankungen nachzuweisen ist (FRIEDRICH et al., 2002). Andererseits fanden BEUTIN et al. (2004) das *vtx2d*-Gen in Stämmen, die blutige Durchfälle verursacht hatten. Das **ileXtRNA-Gen**, welches zum Teil bei Isolaten von HUS- und HC-Patienten nachgewiesen werden konnte, wurde nicht gefunden (BÜLTE, 2001). Das **eaeA-Gen**, dessen Genprodukt „Intimin“ die Anheftung an die Darmmukosa des Menschen auslöst, wurde zweimal gefunden (O157:H⁻ und O84:H21) (FITZHENRY et al., 2002). Die Adhärenz der EHEC an die Darmepithelien führt zur Zerstörung des Bürstensaums. Blutige Durchfälle und HUS treten gehäuft bei *eae*-positiven VTEC auf, sind aber auch bei den *eae*-negativen Stämmen der Serogruppen O91, O128 und O146 nachgewiesen worden (BEUTIN et al., 2004). Der Pathomechanismus der negativen Stämme ist noch nicht endgültig geklärt. In einer Untersuchungsreihe stellten BEUTIN et al. (2004) fest, dass *eae*-positive Stämme mehr bei Kindern unter sechs Jahren und die negativen eher bei Erwachsenen nachzuweisen sind. Das **EhlyA-Gen** konnte in den eigenen Erhebungen bei zehn Stämmen nachgewiesen werden. Da dieses Gen in sehr virulenten *eae*-positiven VTEC-Stämmen nachgewiesen wurde, könnte es als Virulenzindikator eines Stammes betrachtet werden (GYLES et al., 1998; BEUTIN et

al., 2004; ALDICK et al., 2007). PRAGER et al. (2005) kamen zu keinen eindeutigen Ergebnissen. Sie fanden keine Zusammenhänge zwischen den Virulenzmustern und den klinischen Erkrankungen.

Eine abschließende Bewertung der Virulenz dieser VTEC-Stämme ist schwer möglich, da die Vulnerabilität von mehreren Kriterien abhängig ist. CHAHED et al. (2005) haben in diesem Zusammenhang unterschiedliche Risikofaktoren wie Alter, Immunkompetenz, proteinarme Ernährung und aufgenommene Dosis angeführt. Eine vorherige Antibiotika-Therapie kann das HUS-Syndrom verschlimmern. Die VTEC-Stämme, welche *stx2*- und *eae*-Gene besitzen, sind virulenter als diejenigen ohne. Durch solche Stämme verursachte akute, blutige und schmerzhafte Durchfälle, die mit niedrigem Fieber einhergehen, sind bei Kleinkindern Prädispositionsfaktoren für die Entwicklung eines HUS (ETHELBERG et al., 2004; TARR et al., 2005)

4.3 Nachweismethoden

Seit zwanzig Jahren sind die Untersuchungsmethoden in der klinischen Diagnostik dem Nachweis der EHEC O157:H7 gewidmet. Bei verdächtigen Fällen werden Stuhlproben mittels immunochemischen Verfahren auf Verotoxine untersucht. Im positiven Fall werden verschiedene PCR-Methoden angewandt, um die *vtx*-Gene zu determinieren (GRIF et al., 2005; BISCHOFF et al., 2005). Die parallele Anzüchtung des Erregers erfolgt auf elektiv-selektiven Nährmedien wie z.B. SMAC.

Mittlerweile wird routinemäßig auf andere VTEC bzw. EHEC untersucht. Mehrere Arbeitsschritte sind notwendig, um die Gruppe der VTEC zuverlässig nachzuweisen. Nach dem Verotoxinnachweis erfolgt eine Erregerisolierung und Erregercharakterisierung. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass der VTEC-Anteil in der Gesamtkeimflora von Lebensmitteln sehr klein ist und die EHEC-Infektionsdosis mit weniger als 100 Lebendkeimen gering ist, muss eine **Anreicherung** erfolgen. Zwei Medien (LST+N und BRILA) wurden in der eigenen Arbeit vergleichend getestet. Obwohl LST-Bouillon zum Nachweis von Coliformen sowohl in der ASU gemäß § 64

LFGB (p. 141) als auch für die MPN-Methode („Most Probable Number“) gemäß ISO 11866 (International Standard Organisation, p. 141) empfohlen wird, konnten mit BRILA-Bouillon hinsichtlich der Selektivität bessere Ergebnisse erzielt werden (Tabelle 20). Hinzu kommt, dass die Handhabung einfach ist (MÜLLER und BÜLTE, 1997; HECKÖTTER, 1999). Die Wahl eines geeigneten Anreicherungsmediums muss auch von der zu untersuchenden Lebensmittelmatrix abhängig gemacht werden. Die BRILA-Bouillon wird aufgrund des hemmenden Effekts von Gallensalzen bzw. Brillantgrün auf die gram-positive Mikroflora überwiegend bei Fleisch und Fleischerzeugnissen eingesetzt. Andere Autoren geben Anreicherungsmedien, wie der Trypton-Soja-Bouillon (TSB) für den Nachweis von *E. coli* O26, O111 und O157 oder der modifizierten Trypton-Soja-Bouillon mit Novobiocinzusatz (mTSB+N) für den Nachweis von *E. coli* O157 den Vorzug (De BOER und HEUVELINK, 2000; FUKUSHIMA und GOMYODA, 1999b). Der Zusatz von Antibiotika hemmt nicht nur das Wachstum der gram-positiven Begleitflora, sondern kann auch das Wachstum der Zielkeime beeinträchtigen. OKREND et al. (1990a) konnten beobachten, dass sich beim Zusatz von Novobiocin zur modifizierten *Escherichia coli*-Bouillon (mEC+N) im Vergleich zur mEC die Keimzahl von *E. coli* O157:H7 bei einer Inkubationstemperatur von 42 °C auf 95 % und bei 35 °C sogar auf 69 % reduzierte.

Nach dem Anreicherungs-schritt erfolgt die **immunomagnetische Separation (IMS)** für O157 als Aufkonzentrierungsschritt. Das dabei erhaltene Beadsediment wird auf das Subkultivierungsmedium Cefixim-Tellurit-Sorbitol-MacConkey (**CT-SMAC**) aufgetragen. Der CT-SMAC-Agar ist ebenso selektiv wie elektiv, so dass O157:H7-Stämme häufig sogar als Reinkulturen zu isolieren sind (HECKÖTTER, 1999). Die IMS-Methode ist für den Nachweis von O157:H7 nach bisherigem wissenschaftlichen Kenntnisstand am Besten geeignet. Sie ist schnell und ermöglicht eine Nachweisgrenze von ein bis sechs Bakterienzellen pro Gramm Fleisch (HECKÖTTER et al., 1997; RADU et al., 2001). Parallel wurden in den eigenen Untersuchungen die inkubierten Flüssigansätze auch auf den hämorrhagischen Colitis-Agar (**HC-Agar**) aufgetragen. In diesem Fall sollten die *E. coli* O157 durch ihre negative β -D-Glucuronidase- und Sorbit-Aktivität erfasst werden. Von saprophytären

E. coli-Stämmen wird das 4-methyl-umbelliferyl- β -D-glucuronid (MUG) in ein fluorogenes Spaltprodukt, welches unter langwelligem, ultravioletten (UV) Licht fluoresziert, verstoffwechselt.

Mit dieser Methodenkaskade sind nur typische, d.h. Sorbit- und MUG-negative *E. coli* O157-Stämme nachzuweisen. Sorbit- und MUG-positive Stämme des Serovars O157:H⁻ (ca. 40 %), die bereits bei EHEC-Infektionen in der Bundesrepublik Deutschland, in anderen europäischen Ländern und in Australien nachgewiesen worden sind (RKI, 1996a; KARCH et al., 2005), werden damit nicht erfasst. 2004 wurden sie ebenfalls in einer Umweltuntersuchung von sechs Bauernhöfen in den USA nachgewiesen (MURINDA et al., 2004a). Stämme des Serovars O157:H⁻ sind Tellurit-empfindlich und wachsen auf dem CT-SMAC-Medium nicht an. In den eigenen Untersuchungen gelang mit der IMS-Methode die Isolierung lediglich eines Stammes, da die anderen Stämme zur non-O157-Gruppe gehörten. Bei der Untersuchung von 2429 Lebensmittelproben mit der IMS-Methode konnten COIA et al. (2001) nur in zwei Proben O157-Stämme isolieren. Aufgrund der phänotypischen Variabilität der EHEC bzw. VTEC ist die Methodik begrenzt. MURINDA et al. (2004b) verglichen Agarmedien, welche mit verschiedenen Zusätzen supplementiert waren. Alle VTEC O26 waren MUG-fluoreszent, die VTEC O157 jedoch nicht. Bei diesen Untersuchungen wurde die fehlende Karbohydrat-Fermentierung (besonders Rhamnose) der VTEC ausgenutzt. *E. coli* O26 und zum Teil *E. coli* O157 konnten gut auf X-GlcA-Medien (5-bromo-4-chloro-3-indol-beta-D-glucuronide) wachsen und isoliert werden.

Die Durchführung eines **Enzyme immunoassays** (EIA) parallel zum Verotoxin-nachweis gewährleistet, dass zusätzlich zu den nicht typisch reagierenden O157-Stämmen auch weitere potentielle EHEC (siehe Tabelle 20), d.h. solche auf Basis der Verotoxinbildung, detektiert werden können (HECKÖTTER et al., 1996; KEHL et al., 1997). Der „Premier EHEC Assay“ (ACHESON et al., 1996b) kann als „Screening-Verfahren“ eingesetzt werden. In der eigenen Arbeit wurden keine Enhancer-Substanzen, wie Mitomycin C oder Carbadox, zur Sensitivitätssteigerung

des Verotoxin-Nachweissystems benutzt. Über Phageninduktion hätte Mitomycin C die Toxinproduktion gesteigert. In der ersten Untersuchungsreihe wurden 20 EIA-Tests von leicht positiv bis zu stark positiv registriert. Dabei wurden acht Proben mit verschiedenen Serogruppen gefunden. In der zweiten Serie wurden sieben Proben mit VTEC gefunden. Aus den 20 EIA-positiven Proben wurde insgesamt in 14 Proben (70 %) mit VTEC gefunden. Warum aus einigen im EIA positiven Proben keine Stämme isoliert werden konnten, bleibt unklar. Die EIA-Ergebnisse wurden sowohl photometrisch gemessen als auch visuell bewertet. Bei einer leicht gelben Färbung in den Mikrotiter-Kavitäten oder einem Extinktionswert zwischen 0,180 und 0,100 wurden aus der Übernachtbouillon Subkulturen angelegt. Eine Probe konnte nur positiv oder negativ sein. Für die Grauzonen könnte eine zu niedrige VTEC-Konzentration die Ursache sein.

Die Sensitivität des EIA ist bei Einsatz von Kulturüberständen vergleichbar mit der eines Zytotoxizitätstests (KEHL et al., 1997). BEUTIN et al. (1996a) haben falsch-positive VT-Reaktionen mit *Pseudomonas aeruginosa* beschrieben, die sich in einer anderen Untersuchung jedoch nicht reproduzieren ließen (TIMM et al., 1998). In Rinderfäzes entdeckten HYATT et al. (2001), dass die Empfindlichkeit des Tests für den Nachweis von non-*E.coli* O157 gut war, aber dass er für *E. coli* O157 zu viele falsch-positive Resultate ergab. Andere immunologische Nachweisverfahren werden weiter entwickelt. ALDUS et al. (2003) benutzten Antikörper-beschichtete Tauchstäbchen („dipsticks“), die sie direkt in die Anreicherungsbouillon tauchten. Sie dienten dem Nachweis von VTEC in verschiedenen Lebensmitteln. In den USA erkennt die AOAC (Association of Analytical Chemists) zwei Tests für den Nachweis von EHEC in Rindfleisch an: die VIP-Methode („visual immunoprecipitate“) und den Assurance-EIA (AOAC 996.09 und AOAC 996.10) [FELDSINE et al., 2005].

Im Allgemeinen lassen sich die immunologischen Tests gut für Routineuntersuchungen einsetzen. Es werden aber meistens zusätzliche Nachweisverfahren, wie die **Polymerase-Kettenreaktion** (PCR), notwendig. Dieses Verfahren ist gleichermaßen für die gesamte Gruppe der VTEC, EHEC und für

bestimmte Serogruppen einsetzbar. Während genotypische Methoden früher nur zur weiteren Charakterisierung von bereits isolierten Stämmen eingesetzt wurden, treten diese Methoden heute als Schnellverfahren zum Nachweis von pathogenen Mikroorganismen aus verschiedenen Lebensmitteln in Erscheinung (BÜLTE, 1994; ALEXANDRE et al., 2001; KAWASAKI et al., 2005). Grundsätzlich läuft der Nachweis nach einem Anreicherungs- bzw. Kultivierungsschritt ab, um eine ausreichende Sensitivität zu gewährleisten. Mit einer Multiplex-PCR können neben VT-Genen weitere Gensequenzen nachgewiesen werden (PATON et al., 2004). Dies ermöglicht zusätzlich den Nachweis anderer VTEC-Serogruppen als *E. coli* O 157 (WANG et al., 2001; LEOTTA et al., 2005). Die Bestimmung einzelner Virulenzfaktoren kann einer Einschätzung der potentiellen Virulenz der jeweiligen Lebensmittelisolate dienen. Ein Nachteil der PCR liegt darin, dass DNA nicht mehr vermehrungsfähiger bzw. nicht mehr lebensfähiger Zellen amplifiziert wird (CANDRIAN, 1994). Ein positives PCR-Resultat bedarf daher grundsätzlich einer Bestätigung, d.h. der Isolierung des Erregers mit weitergehender Differenzierung und Charakterisierung.

4.4 Überwachung und Prophylaxe

Hinsichtlich der EHEC- bzw. VTEC-Problematik sind mehrere Faktoren zu berücksichtigen. Eine Infektion wird durch eine niedrige Keimzahl verursacht. Die Serogruppen sind heterogen und die Pathogenitätsmuster sind wechselhaft. Es ist keine 100 % eindeutige phänotypische Erkennung möglich (z.B. Sorbit-positiver O157:H7). Die Übertragungswege (Lebensmittel, Umwelt, Personen, u.s.w.) sind vielfältig und die Therapien unzuverlässig. In einem Versuch, diese Faktoren zu erfassen und vorzubeugen, werden Risikoanalysen durchgeführt. Sie bestehen aus den drei Komponenten Risikobewertung („risk assessment“), Risikoverwaltung („risk management“) und Risikovermittlung („risk communication“). Vollständige Risikoanalysen im Sinne des Codex alimentarius (p. 141) sind ein umfangreiches und langwieriges Verfahren, welches eine sehr große Datensammlung und eine entsprechende statistische Aufarbeitung, sowie eine interdisziplinäre Bewertung erfordert. 2005 erarbeiteten STRACHAN et al. ein „von der Dosis abhängiges

Wirkungs“-Modell, um eine quantitative mikrobiologische Risikobewertung (QMRAS) aufzubauen. Sie verwendeten Daten aus mehreren Ausbrüchen in verschiedenen Ländern. Es wird angestrebt, Ausbrüche über die Überwachungsdatenbank (RKI, ENTER-Net, PulseNet) zu erkennen und frühzeitig einen unerwarteten und signifikanten Anstieg im Erkrankungsgeschehen festzustellen. In Deutschland werden seit 1999 Laboratorien in verschiedenen Bundesländern beauftragt, Stuhlproben auf VTEC-Toxine zu untersuchen und die positiven Proben dem Nationalen Referenzzentrum (NRZ) zukommenzulassen. So bekam das NRZ im Jahr 2000 beispielsweise mehrere O26:H11-Stämme aus verschiedenen Bundesländern und beauftragte das RKI (Robert Koch Institut) eine epidemiologische Untersuchung durchzuführen. Basierend auf PFGE-Untersuchungen und weiteren Ergebnissen wurde vermutet, dass sich elf Kinder in fünf Kindertagesstätten durch den Verzehr von Meeresprodukten infiziert hatten (WERBER et al., 2002). Ein ähnlicher Fall wurde 2003 in Minnesota (USA) beschrieben. Das Gesundheitsamt von Minnesota registrierte vier durch *E. coli* O157:H7 hervorgerufene Krankheitsfälle nach Verzehr von gefrorenen Steaks. Die Stämme wurden mit PGFE identifiziert. Nach einer Suche in PulseNet wurden einzelne Fälle in Kansas und Michigan gefunden. Das Amt organisierte einen öffentlichen Rückruf der verdächtigen Lebensmittel (335.506 kg) [LAINE et al., 2005].

Da die meisten *E. coli* apathogene Keime sind, werden sie in Lebensmitteln bis zu bestimmten Konzentrationen toleriert (VO 2073/2005, p. 141). Dennoch sind sie ein Indikator für eine Verschmutzung der Umgebung oder der Lebensmittel (BURGESS et al., 2005). Hygienische Maßnahmen bei der Lebensmittelgewinnung (Milch, Fleisch, Gemüse) sind im Rahmen von Eigenkontrollsystemen vorgeschrieben und werden regelmäßig überprüft (HUSSEIN und SAKUMA, 2005). Durch die Etablierung von Qualitätssicherungskonzepten unter Berücksichtigung der HACCP-Prinzipien (Hazard analysis critical control point), einschließlich der Anwendung zielgerichteter Hygienemaßnahmen, können bakteriologische Verunreinigungen minimiert werden. Trotz solcher Maßnahmen ist eine Kontamination von Schlachttierkörpern und daraus hergestellter Erzeugnisse nicht vollständig auszuschließen. JUDGE et al.

(2004) versuchten über orale Intimin-Impfstoffe für Kälber eine Keimreduktion bei der Urproduktion zu erzielen. BETTELHEIM et al. (2005) untersuchten den Einfluss des Fütterungsmanagements auf die *E. coli*- bzw. VETC-Ausscheidung. YOUNTS-DAHL et al. (2005) fütterten Rinder mit *Lactobacillus acidophilus* und erforschten die Wirkung auf die Verdauung der Tiere. Bis heute sind noch keine routinetauglichen Konzepte zur Minimierung der VTEC-Kontamination im Bereich der Urproduktion gefunden worden.

5 SCHLUSSFOLGERUNGEN

- . Unter 392 untersuchten Lebensmittel waren 14 (3,6 %) mit VTEC kontaminiert. Im Gegensatz zu Fleischerzeugnissen konnten aus den Käseprodukten keine VTEC isoliert werden. Zwölf (3,06 %) der Proben waren allein der Tierart Schaf entnommen und wiesen dabei die höchste Kontaminationsrate auf. VTEC-Stämme wurden in Produkten aus Deutschland, Irland, Neuseeland und Australien nachgewiesen.
- . Die Brillantgrün-Galle-Lactose-Bouillon (BRILA) erwies sich als Anreicherungsverfahren der Laurylsulfat-Tryptose Bouillon mit Zusatz von Novobiocin (LST+N) als deutlich überlegen.
- . Der Enzyme immunoassay-Test (EIA) zum Verotoxin-Screening mit anschließender Untersuchung mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) sind zuverlässige Nachweismethoden.
- . In den eigenen Untersuchungen wurden 14 verschiedene VTEC-Serovare mit unterschiedlichen Virulenzmustern gefunden, was die Heterogenität der VTEC-Gruppe belegt. Darunter befand sich lediglich ein O157:H⁻-Stamm. Stämme der zumeist hochpathogenen O157-Serogruppe scheinen in Lebensmitteln tierischen Ursprungs in der Bundesrepublik nur sehr selten vorzukommen.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Untersuchungen zum Nachweis von verotoxinogenen *E. coli* (VTEC) speziell Serovar O157, in Lebensmitteln tierischen Ursprungs mit verschiedenen Anreicherungsverfahren

Seit 1982 sind die Verotoxin-bildenden *E. coli* (VTEC) und dabei insbesondere die Untergruppe der enterohämorrhagischen Stämme (EHEC) als Verursacher lebensmittelbedingter Infektionen des Menschen, mit teilweise schwerwiegenden Komplikationen, bekannt. Große und kleine Wiederkäuer gelten weltweit als Reservoir dieser Erreger, so dass rohe oder nicht ausreichend erhitzte Lebensmittel, vor allem der Tierart Rind, eine Hauptinfektionsquelle darstellen.

Bekanntermaßen sind in kontaminierten Lebensmitteln nur wenige Zellen vorhanden. Für den Nachweis innerhalb einer heterogenen und um mehrere Zehnerpotenzen höheren Mikroflora der rohen Lebensmittel tierischen Ursprungs ist daher vor dem Subkultivierungsschritt ein Anreicherungsschritt notwendig.

Von Januar 1996 bis April 1997 war das Ziel der eigenen Untersuchungen, Daten zur Prävalenz von VTEC-Stämmen unter besonderer Berücksichtigung der *E. coli* Serogruppe O157 in Lebensmitteln tierischen Ursprungs, insbesondere aus dem Einzel- und Großhandel im Gießener Raum (Deutschland), zu ermitteln. Des Weiteren sollte Lammfleisch aus Australien, das über die Grenzkontrollstelle am Frankfurter Flughafen importiert worden war, auf das Vorkommen von VTEC untersucht werden. Dabei wurden parallel zwei verschiedene Anreicherungsmedien (Brillantgrün-Galle-Lactose [BRILA] und Laurylsulfat-Tryptose plus Novobiocin [LST+N]) mit zwei sich anschließenden Nachweisverfahren: der Enzyme immunoassay-Test (EIA) für Verotoxine und die immunomagnetische Separation (IMS) für die Serogruppe O157 eingesetzt.

Im EIA positiv oder verdächtig reagierende Anreicherungen (Extinktionswert > 0,100) wurden 70 µl der Übernachtskultur jeweils auf 5 Hemorrhagic Colitis-Agar-Platten (HC) ausgespatelt. Nach 16-18 h Bebrütung bei 41 °C wurde eine HC-Platte ausgesucht, auf der verdächtigen Kolonien gewachsen waren. Bis zu fünf phänotypisch differente Kolonien wurden in einem Eppendorf-Gefäß gepoolt. Eine Hälfte des Pools wurde auf Plate count-Agar-Platten (PC) subkultiviert, die andere Hälfte wurde mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unter Einsatz der degenerierten Primer MK1/MK2 untersucht. Im Falle eines positiven PCR-Resultates erfolgte anschließend eine Nachuntersuchung der Einzelkolonien des betreffenden Pools.

Nach der IMS-Probenbearbeitung wurden jeweils 50 µl des Sediments auf dem Cefixim-Tellurit-Sorbit-MacConkey-Agar (CT-SMAC) subkultiviert. Die verdächtig erscheinenden Kolonien wurden mit O157-Antiserum agglutiniert. Nach Ausschluss einer Autoagglutination wurden diese Kolonien weiterhin mit einem H7-Antiserum geprüft. Die einzelnen Kolonien wurden auf HC- und PC-Agar subkultiviert. Präsumtive *E. coli* O157 wurden mit Hilfe der PCR auf verschiedene Virulenzfaktoren untersucht.

Die besten Ergebnisse wurden mit einer Anreicherung in BRILA, gefolgt von einer Untersuchung mit einem Verotoxin-EIA, erzielt. Proben mit positiven oder verdächtigen Ergebnissen wurden eingefroren und erneut untersucht. Dabei wurden weitere VTEC gefunden. Kälte bewirkte keine vollständige Inaktivierung von VTEC-Stämmen.

392 Lebensmittel wurden untersucht, von denen 14 (3,6 %) mit VTEC kontaminiert waren. Davon waren 12 Lammprodukte, ein Rindfleischprodukt und ein Schweinefleischprodukt. Im Gegensatz zu den Fleischprodukten ergaben die Käseproben negative Ergebnisse. Es wurden 14 VTEC-Serogruppen O6:H⁻, O6:H10, O7:H⁻, O8:H⁻, O8,60:H51, O8,60:H⁻, O22:H5, O65:H⁻, O75:H5, O84:H21, O96:H⁻, O112a,c:H, O157:H⁻ und ONT:H⁻ nachgewiesen. Die Virulenzmuster waren dabei

sehr heterogen. Bei einer Probe aus Schweinefleisch wurde ein O157:H7-Stamm isoliert. Mit Ausnahme der O157:H⁻ waren die biochemischen Eigenschaften der isolierten VTEC, die von saprophytären *E. coli*.

Im Allgemeinen gelten als Risikonahrungsmittel diejenigen, die roh verzehrt werden, wie Rohmilch, Rohmilchkäse und rohe Rinderhackfleischerzeugnisse. Von zunehmender und unterschätzter Bedeutung sind Lebensmittel pflanzlichen Ursprungs, die mit O157-haltigen Rinderfäzes verschmutzt wurden. Eine weitere Kontaminationsquelle ist symptomlos ausscheidendes Personal, welches im Lebensmittelgewinnungssektor arbeitet und dabei Lebensmittel kontaminieren kann.

7 SUMMARY

Study about the isolation of Verotoxinogenic *E. coli* (VTEC), especially of serovar O157, in food of animal origin after incubation in different enrichment media

Since 1982, Verotoxin-producing *E. coli* (VTEC), and particularly their enterohemorrhagic strains subgroup (EHEC), have been known as causative agents of foodborne infections with partially severe complications in humans. Globally, large and small ruminants are the main reservoir of these pathogens. Thus raw or insufficiently heated food, particularly that of beef origin, represents a major source of infection.

It is common knowledge that only few cells of VTEC are present in contaminated food. Due to the heterogenous microflora of raw foods of animal origin, it is necessary to perform an enrichment step before subcultivation.

From January 1996 until April 1997, the aim of this study was to establish data on the prevalence of VTEC-strains, especially serovar O157, in food of animal origin coming from small grocery stores and supermarkets in the region of Giessen, Germany. Additionally, lamb meat freshly imported from Australia came directly to Giessen via the border check point at Frankfurt Airport and was examined for the presence of VTEC. After the use of two enrichment media (Brilliant Green Bile Lactose [BRILA] and Lauryl Sulphate Tryptose with Novobiocin [LST+N]), the samples were screened with two different detection methods: Enzyme immunoassay-Test (EIA) for verotoxins and Immunomagnetic separation (IMS) for O157:H7.

If samples were EIA-positive or suspicious (extinction value $>0,100$), 70 μ l of the overnight broth were spread onto five Hemorrhagic Colitis (HC)-Agar-plates. After 16-18 h incubation at 41 °C a plate with suspicious colonies was chosen and 5 colonies were pooled in an Eppendorf container. Half of the pool was spread on Plate Count

(PC)-Plates and the other half was screened in the Polymerase Chain Reaction (PCR) with the primers MK1/MK2. In case of a PCR positive result, colonies of the PC-Plate would be rechecked for their belonging to the *E. coli* group and their VT-toxins.

After IMS, 50 µl of the sediment was spread onto Cefixim-Tellurit-Sorbit-MacConkey (CT-SMAC)-Agar. Presumptive colonies were agglutinated with O157-Antiserum. If no autoagglutination occurred, these colonies were checked with H7-Antiserum. Each colony was then subcultivated onto HC- and PC-Agars. The virulence factors of the presumptive *E.coli* O157:H7 were determined by a PCR technique.

In this study, most of the VTECs were isolated after incubation in BRILA enrichment and an EIA-test detection. The samples with positive or suspicious results were frozen and re-tested. VTECs were found again during the second detection, which indicates that the cold did not affect them.

Of 392 food samples (meat and cheese products), 14 (3,6 %) meat products were contaminated with VTEC (12 lamb products, 1 beef and 1 pork). None of the cheese products were VTEC-positive. The isolated VTEC showed as many as 14 different serotypes: O6:H⁻, O6:H10, O7:H⁻, O8:H⁻, O8,60:H51, O8,60:H⁻, O22:H5, O65:H⁻, O75:H5, O84:H21, O96:H⁻, O112a,c:H, O157:H⁻ und ONT:H⁻. The virulence pattern was also very variable. One sample of pork carried a O157:H⁻. With the exception of the O157:H⁻, their biochemical characteristics were similar to saprophytes *E. coli*.

In general the risky food products remain raw milk, raw milk cheese and raw ground beef. Attention should also be paid to the vegetable products contaminated with cattle feces. Lastly another source of contamination is the symptom-free carrier working in the food industry.

8 LITERATURVERZEICHNIS

ACHESON, D.W.K., KEUSCH, G.T., BARRETT, T.J., GRIFFIN, P.M., STROCKBINE, N.A., SWAMINATHAN, B., CALDERWOOD, C., KAPER, J.B., LEVINE, M.M., KAPLAN, B.S., KARCH, H., O'BRIEN, A.D., OBRIG, T.G., TAKEDA, Y., TARR, P.I., WACHSMUTH, I.K. (1996a)

Proposed new nomenclature for SLT (VT) family
Am. Soc. Microbiol. Lett. 62, 118-119

ACHESON, D.W.K., LINCICOME, L.L., DE BREUCKER, S., KEUSCH, G.T. (1996b)

Detection of Shiga-Like Toxin-Producing *Escherichia coli* in Ground Beef and Milk by Commercial Enzyme Immunoassay
J. Food Prot. 59, 344-349

AFZA, M., HAWKER, J., THURSTON, H., GUNN, K., ORENDI, J. (2006)

An outbreak of *Escherichia coli* O157 gastroenteritis in a care home for the elderly
Epidem. Infect. 134, 1276-81

AHMED, N.M. und CONNER, D.E. (1995)

Evaluation of various media for recovery of thermally-injured *Escherichia coli* O157:H7
J. Food Prot. 58, 357-360

AHMED, S. und COWDEN, J. (1997)

An outbreak of *E. coli* O157 in central Scotland
2. Internationales Symposium der Europäischen Studiengruppe zu enterohämorrhagischen *E. coli*, Innsbruck (Österreich) 12.04.1997

ALBERT, M.J., FARUQUE, S.M., ANSARUZZAMAN, M., ISLAM, M.M., HAIDER, K., ALAM, K., KABIR, I., ROBINS-BROWNE, R. (1992)

Sharing of virulence-associated properties at the phenotypic and genetic levels between enteropathogenic *Escherichia coli* and *Hafnia alvei*
J. Med. Microbiol. 37, 310-314

ALDICK, T., BIELASZEWSKA, M., ZHANG, W., BROCKMEYER, J., SCHMIDT, H., FRIEDRICH, A.W., KIM, K.S., SCHMIDT, M.A., KARCH, H. (2007)

Hemolysin from Shiga toxin-negative *Escherichia coli* O26 strains injures microvascular endothelium
Microbes Infect. 9, 282-90

ALDUS, C.F., van AMERONGEN, A., ARIENS, R.M.C., PECK, M.W., WICHERS, J.H., WYATT, G.M. (2003)

Principles of some novel rapid dipstick methods for detection and characterization of verotoxigenic *Escherichia coli*
J. App. Microbiol. 95, 380-389

ALEKSIC, S., KARCH, H., BOCKEMÜHL, J. (1992)

A biotyping scheme for shiga-like (vero) toxin-producing *Escherichia coli* O157 and a list of serological cross-reactions between O157 and other Gram-negatives bacteria
Zbl. Bakt. 276, 221-230

- ALEXANDRE, M., PRADO, V., ULLOA, M.T., ARELLANO, C., RIOS, M. (2001)
Detection of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in meat foods using DNA probes, enzyme-linked immunosorbent assay and polymerase chain reaction
J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health 48, 321-330
- ALLERBERGER, F., DIERICH, M.P., GRUBER-MOESENBACHER, U., LIESEGANG, A., PRAGER, R., HARTMANN, G., RABSCH, W., TSCHAPE, H., KARCH, H. (2000)
Nontoxicogenic sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157:H⁻ associated with a family outbreak of diarrhoea
Wien klin. Wochenschr. 112, 846-850
- AL-SAIGH, H., ZWEIFEL, C., BLANCO, J., BLANCO, J.E., BLANCO, M., USERA, M.A., STEPHAN, R. (2004)
Fecal shedding of *Escherichia coli* O157, *Salmonella* and *Campylobacter* in Swiss cattle at slaughter
J. Food Prot. 67, 679-684
- AMOROSI, E.L. und ULTMANN, J.E. (1966)
Thrombotic thrombocytopenic purpura: report of 16 cases and review of the literature
Medicine (Baltimore) 45, 139-159
- ANDRAL, B., ASPAN, A., PERELLE, S., FACH, P. (2004)
PCR detection of virulence genes and molecular epidemiology of STEC O157 isolates from french abattoirs
Vet. Rec. 155, 365-368
- ANONYMUS (1994)
Two clusters of hemolytic ureamic syndrome in France
Commun. Dis. Rep. CDR Wkly. 4, 1
- ANONYMUS (1997a)
E. coli O157: lessons of the Scottish outbreak
Vet. Rec. 140, 382
- ANONYMUS (1997b)
Food safety Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) infections
Wkly. Epidemiol. Rec. 25, 185
- ANONYMUS (1997c)
Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (enterohemorrhagic *E. coli*) infections, Japan, 1996-June 1997
Inf. Agents Surv. Rep.
- ANONYMUS (2000)
Escherichia coli O111:H8, outbreak among teenage campers-Texas
Morb. Mortal Wkly Rep. 49, 321-324
- ANONYMUS (2002)
Increase in cases of sorbitol-fermenting *E. coli* O157:H⁻ in several German states
Eurosurv. Weekly Rel. 6, 020426

ANONYMUS (2004)

Outbreak of Verotoxin-producing *E. coli* O157 linked to milk in Denmark
Eurosurv. Weekly Rel. 8, 040513

ANONYMUS (2005a)

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

ANONYMUS (2005b)

Large *E. coli* O157 outbreak in Ireland, October-November 2005
Eurosurv. Weekly Rel. 10, 051222

ANONYMUS (2005c)

Ecllosion d'infection à *Escherichia coli* O157:H7 associée à un parc d'amusement à jets d'eau et détectée par deux séries de tests électrophorétiques
Rel. Mal. Transm. Can. 31-12

ANONYMUS (2005d)

Outbreak of *E. coli* O157:H7 infections associated with a brand of beefburgers in France
Eurosurv. Weekly Rel. 10, 051103

ANONYMUS (2005e)

Outbreak of verotoxin producing *E. coli* O157 infections involving over forty schools in South Wales, September 2005
Eurosurv. Weekly Rel. 10, 051006

ANONYMUS (2007)

Meldepflichtige Krankheiten
§6, Infektionsschutzgesetz

ARMSTRONG, G. und ROWE, P. (1997)

Clinical studies for HUS-therapy
3. Internationales Symposium und Workshop über Shiga Toxin (Verozytotoxin)-produzierende *Escherichia coli*-Infektionen (VTEC), Baltimore (USA) 22.-26.6.1997

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

Detection and genetical characterization of shiga toxin-producing *Escherichia coli* from wild deer
Microbiol. Immun. 42, 815-22

AULD, H., MACIVER, D., KLAASSEN, J. (2004)

Heavy rainfall and waterborne disease outbreaks: the Walkerton example
J. Tox. Envir. Health A. 67, 1879-87

BADR, H.M. (2005)

Elimination of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* from raw beef sausage by gamma-irradiation
Mol. Nutr. Food Res. 49, 343-9

BAKER, M., EYLES, R., BENNETT, J., NICOL, C., WONG, W., GARRETT, N. (1999)

Emergence of verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) in New Zealand
New Zealand Public Health Report 6, 9-12

- BALJER, G., WIELER, L., BAUERFEIND, R., LUDWIG, S.B., MAYR, A. (1990)
Nachweis von Vero-(Shiga.Like-)toxinbildenden *E. coli*-Keimen (VTEC) mittels Zellkulturtest und DNA-Hybridisierung bei durchfallkranken Kälbern
Tierärztl.Umschau 45, 71-78
- BARKOCY-GALLAGHER, G.A., ARTHUR, T.M., RIVERA-BETANCOURT, M., NOU, X., SHACKELFORD, S.D., WHEELER, T.L., KOOHMARAIE, M. (2003)
Seasonal prevalence of shiga toxin-producing *Escherichia coli*, including O157:H7 and non-O157 serotypes, and Salmonella in commercial beef processing plants
J. Food Prot. 66, 1978-86
- BARKOCY-GALLAGHER, G.A., EDWARDS, K.K., NOU, X., BOSILEVAC, J.M., ARTHUR, T.M., SHACKELFORD, S.D., KOOHMARAIE, M. (2005)
Methods for recovering *Escherichia coli* O157:H7 from cattle fecal, hide and carcass samples: sensitivity and improvements
J. Food Prot. 68, 2264-8
- BARRANTES, X., RAILEY, D., ARIAS, M.L., CHAVES, C. (2004)
Evaluation of the effect of probiotic culture added to commercial yogurt over a known population of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7
Arch. Latinoam. Nutr. 54, 293-7
- BELONGIA, E.A., MacDONALD, K.L., PARHAM, G.L., WHITE, K.E., KORLATH, J.A., LOBATO, M., STRAND, S., CASALE, K., OSTERHOLM, M. (1991)
An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 colitis associated with consumption of precooked meat patties
J. Infect. Dis. 164, 338-343
- BENNETT, A.R., MacPHEE, S., BETTS, R.P. (1995)
Evaluation of methods for the isolation and detection of *Escherichia coli* O157 in minced meat
Lett. Appl. Microbiol. 20, 375-379
- BERGEY, D.H. (1994)
Manual of systemic bacteriology- Volume 1
Williams and Wilkins
Baltimore London Los Angeles Sydney, 9th edition
- BESSER, R.E., LETT S.M., WEBER J.T., DOYLE M.P., BARRETT T.J., WELLS J.G., GRIFFIN, P. (1993)
An outbreak of diarrhea and hemolytic uremic syndrome from *Escherichia coli* O157:H7 in fresh-pressed apple cider
JAMA 269, 2217-2220
- BESSER, R.E., GRIFFIN, P.M., SLUTSKER, L. (1999)
Escherichia coli O157.H7 gastroenteritis and the hemolytic uremic syndrome: an emerging infectious disease
Annu. Rev. Med. 50, 355-67
- BETTELHEIM, K.A. (1995)
Identification of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* by means of their production of enterohaemolysin
J. App. Bact. 79, 178-180

- BETTELHEIM, K.A. (1996)
Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: a new problem, an old group of organisms
Austr. Vet. J. 73, 20-26
- BETTELHEIM, K.A. (2000a)
Role of non-O157 VTEC
Symp. Ser. Soc. Appl. Microbiol. 29, 38S-50S
- BETTELHEIM, K.A., BENSINK, J.C., TAMBUNAN, H.S. (2000b)
Serotypes of verotoxin-producing (shiga toxin-producing) *Escherichia coli* isolated from healthy sheep
Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis 23, 1-7
- BETTELHEIM, K.A., KUZEVSKI, A., GILBERT, R.A., KRAUSE, D.O., McSWEENEY, C.S. (2005)
The diversity of *Escherichia coli* serotypes and biotypes in cattle faeces
J. Appl. Microbiol. 98, 699-709
- BETTELHEIM, K.A. (2005)
The VTECtable
www.microbionet.com.au/vtetable.htm
- BEUTIN, L., PRADA, J., ZIMMERMANN, S., STEPHAN, R., ÖRSKOV, I., ÖRSKOV, F. (1988)
Enterohämolysin, a new type of hemolysin produced by some strains of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC)
Zbl. Bakt. Hyg. A 261, 266-279
- BEUTIN, L., MONTENEGRO, M.A., ÖRSKOV, I., ÖRSKOV, F., PRADA, J., ZIMMERMANN, S., STEPHAN, S.R. (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., GEIER, D., STEUNRÜCK, H., ZIMMERMANN, S., SCHEUTZ, F. (1993)
Prevalence and Some Properties of Verotoxin (Siga-Like Toxin)-Producing *Escherichia coli* in Seven Different Species of Healthy Domestic Animals
J. Clin. Microbiol. 31, 2483-2488
- BEUTIN, L., GLEIER, K., ZIMMERMANN, S., GEIER, D. (1994)
Zur Identifizierung von Verotoxin-bildenden (VTEC) und enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC) auf Indikator Nährböden
Klin. Lab. 40, 193-201
- BEUTIN, L., ZIMMERMANN, S., GEIER, K. (1996a)
Pseudomonas aeruginosa can cause false-positive identification of verotoxin (Shiga-like toxin) production by a commercial enzyme assay system for the detection of Shiga-like toxins (SLTs)
Infection 24, 267-268

- BEUTIN, L., ZIMMERMANN, S., GEIER, K. (1996b)
Rapid detection and isolation of shiga-like toxin (verocytotoxin)-producing *Escherichia coli* by direct testing of individual enterohemolytic colonies from washed sheep blood agar plates in the VTEC-RPLA assay
J. Clin. Microbiol. 34, 2812-2814
- BEUTIN, L., KRAUSE, G., ZIMMERMANN, S., KAULFUSS, S., GLEIER, K. (2004)
Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from human patients in Germany over a 3-year period
J. Clin. Microbiol. 42, 1099-108
- BHAN, M.K., RAJ, P., LEVINE, M.M., KAPER, J.B., BHANDARI, N., SRIVASTAVA, R., KUMAR, R., SAZAWAL, S. (1989)
Enteroaggregative *Escherichia coli* associated with persistent diarrhea in a cohort of rural children in India
J. Infect. Dis. 159, 1061-1064
- BIELASZEWSKA, M., JANDA, J., BLAHOVA, K., MINARIKOVA, H., JIKOVA, E., KARMALI, M.A., LAUBOVA, J., SIKULOVA, J., PRESTON, M.A., KHAKHRIA, R., KARCH, H., KLAZAROVA, H., NYC, O. (1997)
Human *Escherichia coli* O157:H infection associated with the consumption of unpasteurized goat's milk
Epidemiol. Infect. 119, 299-305
- BIELASZEWSKA, M., SCHMIDT, H., LIESEGANG, A., PRAGER, R., RABSCH, TSCHÄPE, W., H., CIZEK, A., JANDA, J., BLAHOVA, K., KARCH, H. (2000)
Cattle can be a reservoir of sorbitol-fermenting Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H⁻ strains and a source of human diseases
J. clin. Microbiol. 38, 3470-3473
- BISCHOFF, C., LÜTHY, J., ALTWEGG, M., BAGGI, F. (2005)
Rapid detection of diarrheagenic of *E. coli* by real-time PCR
J. Microbiol. Meth. 61, 335-341
- BLAIS, B.W., BOOTH, R.A., PHILIPPE, L.M., YAMAZAKI, H. (1997a)
Effect of temperature and agitation on enrichment of *Escherichia coli* O157:H in ground beef using modified EC broth with novobiocin
Int. J. Food Microbiol. 36, 221-225
- BLAIS, B.W., BOOTH, R.A., PHILIPPE, L., PANDIAN, S., YAMAZAKI, H. (1997b)
Polymacron™ enzyme immunoassay system for detection of *Escherichia coli* O157 inoculated into foods
J. Food Prot. 60, 98-101
- BLANCO, M., BLANCO, J.E., BLANCO, J., MORA, A., PRADO, C., ALONSO, M.P., MOURINO, M., MADRID, C., BALSALOBRE, C., JUAREZ, A. (1997)
Distribution and characterization of faecal verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) isolated from healthy cattle
Vet. Microbiol. 54, 309-319

- BLANCO, M., BLANCO, J.E., MORA, A., REY, J., ALONSO, J.M., HERMOSO, M., HERMOSO, J., ALONSO, M.P., DAHBI, G., GONZALEZ, E.A., BERNARDEZ, M.I., BLANCO, J., (2003a)
Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* (VTEC) isolated from healthy sheep in Spain
J. Clin. Microbiol. 41, 1351-6
- BLANCO, J., BLANCO, M., BLANCO, J.E., MORA, A., GONZALEZ, E.A., BERNARDEZ, M.I., ALONSO, M.P., COIRA, A., RODRIGUEZ, A., REY, J., ALONSO, J.M., USERAS, M. A.(2003b)
Verotoxin-producing *Escherichia coli* in Spain: prevalence, serotypes and virulence genes of O157:H7 and non-O157 VTEC in ruminants, raw beef products and humans
Exp. Biol. Med. 228, 345-351
- BLANCO, M., BLANCO, J.E., MORA, A., DAHBI, G., ALONSO, M.P., GONZALEZ, E.A., BERNARDEZ, M.I., BLANCO, J. (2004a)
Serotypes, virulence genes, and intimin types of shiga toxin (Verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from cattle in Spain and identification of a new intimin variant gene (*eae-ξ*)
J. Clin. Microbiol. 42, 645-651
- BLANCO, M., PADOLA, N.L., KRUGER, A., SANZ, M.E., BLANCO, J.E., GONZALEZ, E.A., DAHBI, G., MORA, A., BERNARDEZ, M.I., ETCHEVERRIA, A.I., ARROYO, G.H., LUCCHESI, P.M., PARMA, A.E., BLANCO, J. (2004b)
Virulence genes and intimin types of shiga-toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle and beef products in Argentina
Int. Microbiol. 7, 269-76
- BLANCO, M., SCHUMACHER, S., TASARA, T., ZWEIFEL, C., BLANCO, J.E., DAHBI, G., BLANCO, J., STEPHAN, R. (2005)
Serotypes, intimin variants and other virulence factors of *eae* positive *Escherichia coli* strains isolated from healthy cattle in Switzerland. Identification of a new intimin variant gene (*eae-η2*)-www.biomedcentral.com/1471-2180/5/23
BMC Microbiology 5, 23
- BOCKEMÜHL, J., KARCH, H., RÜSSMANN, H., ALEKSIC, S., WISS, R., EMMRICH, P. (1990)
Shiga-like Toxin (Verotoxin)-produzierende *Escherichia coli* O22:H8. Übertragung durch unpasteurisierte Milch mit nachfolgender Erkrankung an hämolytisch-urämischem Syndrom
Bundesgesundhbl. 33, 3-6
- BOCKEMÜHL, J., ALEKSIC, S., KARCH, H. (1992)
Serological and biochemical properties of Shiga-like Toxin (Verocytotoxin)-producing strains of *Escherichia coli*, other than O-group 157, from patients in Germany
Zbl. Bakt. 276, 189-195
- BOCKEMÜHL, J. und KARCH, H. (1996)
Zur aktuellen Bedeutung der enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC) in Deutschland (1994-1995)
Bundesgesundhbl. 8, 290-296

- BOCKEMÜHL, J., KARCH, H., TSCHÄPE, H. (1997)
Infektionen des Menschen durch enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC) in Deutschland 1996
Bundesgesundhbl. 6, 194-197
- BOCKEMÜHL, J., KARCH, H., TSCHÄPE, H. (1998)
Zur Situation der Infektionen des Menschen durch enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC) in Deutschland 1997
Bundesgesundhbl. 41, 2-5
- BOLDUC, D., SROUR, L.F., SWEET, L., NEATBY, A., GALANIS, E., ISAACS, S., LIM, G. (2004)
Severe outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 in health care institutions in Charletown, Prince Edward Island, fall, 2002
Can. Commun. Dis. Report 30, 81-88
- BOLLMAN, J., ISMOND, A., BLANK, G. (2001)
Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in frozen foods: impact of the cold shock response
Int. J. Food Microbiol. 28, 127-38
- BOLTON, D.J., CATARAME, T., BYRNE, C., SHERIDAN, J.J., McDOWELL, D.A., BLAIR, I.S. (2002)
The ineffectiveness of organic acids, freezing and pulsed electric fields to control *Escherichia coli* O157:H7 in beef burgers
Lett. Appl. Microbiol. 34, 139-43
- BONARDI, S., FONI, E., BRINDANI, F., BACCI, C., CHIAPPONI, C., CAVALLINI, P. (2004)
Detection and characterization of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (vtec) O157 and non-O157 in cattle at slaughter
New Microbiol. 27, 255-61
- BONNET, R., SOUWEINE, B., GAUTHIER, G., RICH, C., LIVRELLI, V., SIROT, J., JOLY, B., FORESTIER, C. (1998)
Non-O157:H7 Stx2-producing *Escherichia coli* strains associated with sporadic cases of hemolytic-uremic syndrome in adults
J. Clin. Microbiol. 36, 1777-1780
- BORCZYK, A.A., KARMALI, M.A., LIOR, H., DUNCAN, L.M. (1987)
Bovine reservoir for verotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7
Lancet 1, 98
- BOSILEVAC, J.M., SHACKELFORD, S.D., BRICHTA, D.M., KOOHMARAIE, M. (2005)
Efficacy of ozonated and electrolyzed oxidative waters to decontaminate hides of cattle before slaughter
J. Food Prot. 68, 1393-8
- BOYD, B. und LINGWOOD, A. (1989)
Verotoxin receptor glycolipid in human renal tissue
Nephron 51, 207-210

- BRETT, K.N., RAMACHANDRAN, V., HORNITZKY, M.A., BETTELHEIM, K.A., WALKER, M.J., DJORDJEVIC, S.P. (2003)
Stx1c is the most common Shiga toxin 1 subtype among Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from sheep but not among isolates from cattle
J. Clin. Microbiol. 41, 926-926
- BROOKS, H.J.L., MOLLISON, B.D., BETTELHEIM, K.A., MATEJKA, K., PATERSON, K.A., WARD, V.K. (2001)
Occurrence and virulence factors of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in retail meat in Dunedin, New Zealand
Letters Appl. Microbiol. 32, 118-122
- BROOKS, J.T., SOWERS, E.G., WELLS, J.G., GREENE, K.D., GRIFFIN, P.M., HOEKSTRA, R.M., STROCKBINE, N.A. (2005)
Non-O157 shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in the United States, 1983-2002
J. Infect. Dis. 192, 1422-9
- BROWN, J.E., USSERY, M.A., LEPPLA, S.H., ROTHMAN, S.W. (1980)
Inhibition of protein synthesis by Shiga toxin. Activation of the toxin and inhibition of peptide elongation
FEBS Lett. 117, 84-88
- BRUNDER, W., SCHMIDT, H., KARCH, H. (1997)
EspP, a novel extracellular serine protease of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 cleaves human coagulation factor V
Mol. Microbiol. 24, 767-778
- BÜLTE, M. und REUTER, G. (1989)
Glucuronidase-Nachweis und Indol-Kapillartest als zuverlässige Schnelldifferenzierungsverfahren zur Erfassung von *E. coli* in Lebensmitteln – toxinogene Stämme eingeschlossen
Zbl. Hyg. 188, 284-293
- BÜLTE, M., MONTENEGRO, M.A., HELMUTH, R., TRUMPF, T., REUTER, G. (1990)
Nachweis von Verotoxin-bildenden *E. coli* (VTEC) bei gesunden Rindern und Schweinen mit dem DNS-DNS-Koloniehybridisierungsverfahren
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 103, 380-384
- BÜLTE, M. (1994)
Eignung molekularbiologischer Verfahren für die Lebensmittelmikrobiologie- Status quo und Perspektiven.
Archiv für Lebensmittelhygiene 45, 97-120
- BÜLTE, M., HECKÖTTER, S., SCHWENK, P. (1996)
Enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC)- aktuelle Lebensmittelinfektionserreger auch in der Bundesrepublik Deutschland ? Nachweis von VTEC-Stämmen in Lebensmitteln tierischen Ursprungs
Fleischwirtschaft 76, 88-91

- BÜLTE, M., HECKÖTTER, S., DELORME, S., PIEHL, I., KEIL, P., SCHWENK, P., ALEKSIC, S. (1997)
Virulence factors of different *E. coli* serotypes originating from food of animal origin
Abstract zum 3rd Int. Symposium and Workshop on Shiga Toxin (Verocytotoxin)-producing *Escherichia coli* infections, Baltimore, USA (22.6.-26.6.1997)
- BÜLTE, M., HECKÖTTER, S., KEIL, P., SCHUY, C., MÜLLER, A., ALEKSIC, S. (1998)
Enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC) - aktuelle Lebensmittelinfektionserreger auch in der Bundesrepublik Deutschland ? 3. Nachweismöglichkeiten für VTEC und EHEC
Fleischwirtschaft 78, 146-151
- BÜLTE, M. (2001)
Nachweis und Charakterisierung von Verotoxin-bildenden *Escherichia coli*-Stämmen (VTEC) aus unterschiedlichen Habitaten
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 114, 473-477
- BÜLTE, M. (2002)
Veterinärmedizinische Aspekte der Infektionen durch enterohämorrhagische *E. coli*-Stämme (EHEC)
Bundesgesundhbl., 45, 484-490
- BÜRK, C., DIETRICH, R., ACAR, G., MORAVEK, M., BÜLTE, MARTLBAUER, E. (2003)
Identification and characterization of a new variant of Shiga toxin 1 in *Escherichia coli* ONT:H19 of bovine origin
J. Clin. Microbiol. 41, 2106-2112
- BURGESS, F., LITTLE, C.L., ALLEN, G., WILLIAMSON, K., MITCHELLI, R.T. (2005)
Prevalence of Campylobacter, Salmonella and Escherichia coli on the external packaging of raw meat
J. Food Prot. 68, 469-75
- CAGNEY, C., CROWLEY, H., DUFFY, G., SHERIDAN, J.J., O'BRIEN, S., CARNEY, E., ANDERSON, W., McDOWELL, D.A., BLAIR, I.S., BISHOP, R.H. (2004)
Prevalence and numbers of *Escherichia coli* O157:H7 in minced beef burgers from butcher shops and supermarkets in the Republic of Ireland
Food Microbiol. 21, 203-212
- CANDRIAN, U. (1994)
Die Polymerase-Kettenreaktion in der Lebensmittelanalytik
Mitt. Gebiete. Lebensm. Hyg. 85, 704-718
- CANTEY, J.R. und BLAKE, R.K. (1977)
Diarrhea due to *Escherichia coli* in the rabbit: a novel mechanism.
J. Infect. Dis. 135, 454-462
- CAPRIOLI, A., LUZZI, I., ROSMINI, F., RESTI, C., EDEFONTI, A., PERFUMO, F., FARINA, C., GOGLIO, A., GIANVITI, A., RIZZONI, G. (1994)
Community-wide outbreak of hemolytic-uremic syndrome associated with non-O157 verocytotoxin-producing *Escherichia coli*
J. Infect. Dis. 169, 208-211

- CAPRIOLI, A., TOZZI, A.E., GOGGIO, A. (1997)
Epidemiology of *Shiga*-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) infection in continental Europe
2. Internationales Symposium der Europäischen Studiengruppe zu enterohämorrhagischen *E. coli* in Innsbruck (Österreich) (12.04.1997)
- CARROLL, A.M., GIBSON, A., McNAMARA, E.B (2005)
Laboratory-based surveillance of human verocytotoxigenic *Escherichia coli* infection in the Republic of Ireland, 2002-2004
J. Med. Microbiol. 54, 1163-9
- CARTER, A.O., BORCZYK, A.A., CARLSON, A.K., HARVAY, B., HOCKIN, J.C., KARMALI, M.A., KRISHNAN, C., LIOR, H. (1987)
A severe outbreak of *Escherichia coli* O157:H7-associated hemorrhagic colitis in a nursing home
N. Engl. J. Med. 317, 1496-1500
- CDC (Centre for Disease Control and Prevention) (1993)
Update : Multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections from Hamburgers - Western United States, 1992-1993
Morbidity and Mortality Weekly Report 42, 258-263
- CDC (Centre for Disease Control and Prevention) (1995)
Escherichia coli O157:H7 outbreak linked to commercially distributed dry-cured salami-Washington and California, 1994
Morbidity and Mortality Weekly Report 44, 157-160
- CERQUEIRA, A.M, TIBANA, A., GUTH, B.E. (1997)
High occurrence of shiga-like toxin-producing strains among diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from raw beef products in Rio de Janeiro city, Brazil
J. Food Prot. 60, 177-180
- CERQUEIRA, A.M, GUTH, B.E., JOAQUIM, R.M., ANDRADE, J.R. (1999)
High occurrence of shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in healthy cattle in Rio de Janeiro State, Brazil
Vet. Microbiol. 70, 111-121
- CHAHED, A., GHAFIR, Y., CHINA, B., DIERICK, K., DE ZUTTER, L., PIERARD, D., DAUBE, G. (2005)
Survey of the contamination of foodstuffs of animal origin by Shiga toxin producing *Escherichia coli* Serotype O157:H7 in Belgium from 1999 to 2003
Eurosurveillance 10, 33-35
- CHANDLER, D.P., BROWN, J., CALL, D.R., WUNSCH, S., GRATE, J.W., HOLMAN, D.A., OLSON, L., STOTTLEMYRE, M.S., BRUCKNER-LEA, C.J. (2001)
Automated immunomagnetic separation and microarray detection of *E. coli* O157:H7 from poultry carcass rinse
Int. J. Food Microbiol. 70, 143-154
- CHAPMAN, P.A., WRIGHT, D.J., NORMAN, P. (1989)
Verotoxin-producing *Escherichia coli* infections in Sheffield: cattle as a possible source
Epidemiol. Infect. 102, 439-445

- CHAPMAN, P.A., SIDMONS, C.A., ZADIK, P.M., JEWES, L. (1991)
An improved selective medium for the isolation of *E. coli* O157
J. Med. Microbiol. 135, 107-110
- CHAPMAN, P.A., SIDMONS, C.A., WRIGHT, D.J., NORMAN, P., FOX, J., CRICK, E., (1993)
Cattle as a possible source of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 infections in man
Epidemiol. Infect. 111, 439-447
- CHAPMAN, P.A., CERDAN MALO, A.T., ELLIN, M., ASHTON, R., HARKIN, M.A. (2001)
E. coli O157 in cattle and sheep at slaughter, on beef and lamb carcasses and in raw beef and lamb products in South Yorkshire, UK
Int. J. Food Microbiol. 64, 139-150
- CHART, H., JENKINS, C., SMITH, H.R., HEDGES, D., ROWE, B (1998)
Haemolysin production by strains of verocytotoxin-producing *Escherichia coli*
Microbiol. 144, 103-107
- CHAUDHURI, R.R, KHAN, A.M, PALLEEN, J.M. (2004)
*Coli*BASE: an online database for *Escherichia coli*, *Shigella* and *Salmonella* comparative genomics - <http://colibase.bham.ac.uk>
Nuc. Acids Res. 32, D296-D299
- CHEN, J., JOHNSON, R., GRIFFITHS, M. (1998)
Detection of verotoxigenic *Escherichia coli* by magnetic capture-hybridization PCR
Appl. Environ. Microbiol. 64, 147-152
- CLARKE, R.C., MacEWEN, S.A., GANNON, V.P., LIOR, H., GYLES, C.L. (1989)
Isolation of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* from milk filters in south-western Ontario
Epidemiol. Inf. 102, 253-260
- CLAVERO, M.R.S. und BEUCHAT, L.R. (1995)
Suitability of selective plating media for recovering heat- or freeze-stressed *Escherichia coli* O157:H7 from tryptic soy broth and ground beef
Appl. Environ. Microbiol. 61, 3268-3273
- COBELJIC, M., DIMIC, B., OPACIC, D., LEPSANOVIC, Z., STOJANOVIC, V., LAZIC, S. (2005)
The prevalence of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in domestic animals and food in Serbia
Epidemiol. Infect. 133, 359-66
- COBBOLD, R. und DESMARCHELIER, P. (2000)
A longitudinal study of shiga-toxigenic *Escherichia coli* (STEC) prevalence in three Australian dairy herds
Vet. Microbiol. 71, 125-137
- COIA, J.E., JOHNSTON, Y., STEERS, N.J., HANSON, M.F. (2001)
A survey of the prevalence of *Escherichia coli* O157 in raw meats, raw cow's milk and raw-milk cheeses in south-east Scotland
Int. J. Food Microbiol. 66, 63-69

- CONEDERA, G., DALVIT, P., MARTINI, M., GALIERO, G., GRAMAGLIA, M., GOFFREDO, E., LOFFREDO, G., MORABITO, S., OTTAVIANI, D., PATERLINI, F., PEZZOTTI, G., PISANU, M., SEMPRINI, P., CAPRIOLI, A. (2004)
Verocytotoxin –producing *Escherichia coli* O157 in minced beef and dairy products in Italy
Int. J. Food Microbiol. 96, 67-73
- CORNICK, N.A., HELGERSON, A.F. (2004)
Transmission and infectious dose of *Escherichia coli* O157:H7 in swine
Appl. Environ. Microbiol. 70, 5331-5
- CORTES, C., De LA FUENTE, R., BLANCO, J., BLANCO, M., BLANCO, J.E., DHABI, G., MORA, A., JUSTEL, P., CONTRERAS, A., SANCHEZ, A., CORRALES, J.C., ORDEN, J.A. (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
- COWDEN, J.M. (1997)
Scottish outbreak of *Escherichia coli* O157 – November-December 1996
Euro Surv. 2, 1-2
- CRAMPIN, M., WILLSHAW, G., HANCOCK, R., DJURETIC, T., ELSTOB, C., ROUSE, A., CHEASTY, T., STUART, J. (1999)
Outbreak of *Escherichia coli* O157 associated with a music festival
Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 18, 286-288
- DATZ, M., JANETZKI-MITTMANN, C., FRANKE, S., GUNZER, F., SCHMIDT, H., KARCH, H. (1996)
Analysis of the enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 DNA region containing lambdoid phage gene p and shiga-like toxin structural genes
Appl. Environ. Microbiol. 62, 791-797
- DEAN-NYSTROM, E.A., GANSHEROFF, L.J., MILLS, M., MOON, H.W., O'BRIEN, A.D. (2002)
Vaccination of pregnant dams with Intimin (O157) protects suckling piglets from *Escherichia coli* O157:H7 infection
Infect. Immun. 70, 2414-2418
- De AZAVEDO, J., McWHIRTER, E., LOUIE, M., BRUNTON, J. (1994)
EAE-negative verotoxin-producing *Escherichia coli* associated with hemolytic uremic syndrome and hemorrhagic colitis
M.A. Karmali and A.G. Goglio (ed.), Recent advances in verocytotoxin-producing *Escherichia coli* infections, Elsevier Science, B.V., Amsterdam, 265-268
- De BOER, E. und HEUVELINK, A.E. (2000)
Methods for the detection and isolation of Shiga Toxin-producing *Escherichia coli*
Symp. Ser. Soc. Appl. Microbiol. 29, 133-143
- De RYCKE, J., PHAN-THANH, L., BERNARD, S. (1989)
Immunochemical identification and biological characterization of cytotoxic necrotizing factor from *Escherichia coli*
J. Clin. Microbiol. 27, 983-8

- DECLUDT, B., BOUVET, P., MARIANI-KURKDJIAN, P., GRIMONT, F., GRIMONT, P.A., HUBERT, B. LOIRAT, C. (2000)
Haemolytic ureamic syndrome and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection in children in France
Epidemiol. Infect. 124, 215-20
- DESCHENES, G., CASENAVE, C., GRIMONT, F., DESENCLOS, J.C., BENOIT, S., COLLIN, M., BARON, S., MARIANI, P. (1996)
Cluster of cases of haemolytic ureamic syndrome due to unpasteurised cheese
Pediatr. Nephrol. 10, 203-205
- Des ROSIERS, A., FAIRBROTHER, J.M., JOHNSON, R.P., DESAUTELS, C., LETELLIER, A., QUESSY, S. (2001)
Phenotypic and genotypic characterization of *Escherichia coli* verotoxin-producing isolates from humans and pigs
J. Food Prot. 64, 1904-1911
- DEWELL, G.A., RANSOM, J.R., DEWELL, R.D., McCURDY, K., GARDNER, I.A., HILL, A.E., SOFOS, J.N., BELK, K.E., SMITH, G.C., SALMAN, M.D (2005)
Prevalence of and risk factors for *Escherichia coli* O157 in market-ready beef cattle from 12 U.S. feedlots
Foodb. Pathog. Dis. 2, 70-6
- DJORDJEVIC, S.P., RAMACHANDRAN, V., BETTELHEIM, K. A., VANSELOW, B.A., HOLST, P., BAILEY, G., HORNITZKY, M.A. (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, 3910-7
- DODSON, K und LE JEUNE, J. (2005)
Escherichia coli O157:H7, *Campylobacter jejuni* and *Salmonella* prevalence in cull dairy cows marketed in norhteastern Ohio
J. Food Prot. 68, 927-31
- DOLL, F., WEBER, H., WEBER, W., BRÄUNIG, J., KOLB, H. (2001)
Eignung des RIDASCREEN® Enzymimmunoassay zum Nachweis von Verotoxinen in Lebensmitteln
Fleischwirtsch. 81, 97-99
- DONOHUE-ROLFE, A., KEUSCH, G.T., EDSON, C., THORLEY-LAWSON, D., JACEWITZ, M. (1984)
Pathogenesis of *Shigella* diarrhea. IX. Simplified high yield purification of *Shigella* toxin and characterization of subunit composition and function by use of subunit-specific monoclonal and polyclonal antibodies
J. Exp. Med. 160, 1767-1781
- DONTOROU, C., PAPADOPOULOU, C., FILIOUSSIS, G., ECONOMU, V., APOSTOULOU, I., ZAKKAS, G., SALAMOURA, A., KANSOUZIDOU, A., LEVIDIOTU, S. (2003)
Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from foods in Greece
Int. J. Food Microbio. 82, 273-9

- DONTOROU, A., PAPADOPOULOU, C., FILIOUSSIS, G., APOSTOLOU, I., ECONOMU, V., KANSOUZIDOU, A., LEVIDIOTU, S. (2004)
Isolation of a rare *Escherichia coli* O157:H7 strain from farm animals in Greece
Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 27, 201-7
- DOYLE, M.P. und SCHOENI, J.L. (1984)
Survival and growth characteristics of *Escherichia coli* associated with hemorrhagic colitis
Appl. Environ. Microbiol. 48, 855-856
- DOYLE, M.P. und SCHOENI, J.L. (1986)
Selective enrichment procedure for isolation of *Listeria monocytogenes* from fecal and biologic specimens
Appl. Environ. Microbiol. 51, 1127-1129
- DOYLE, M.P. und SCHOENI, J.L. (1987)
Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from retail fresh meats and poultry
Appl. Environ. Microbiol. 53, 2394-2396
- DREHER, R.M. und MÄRTLBAUER, E. (1995)
Moderne Methoden in der Lebensmittelanalytik - Enzymimmunoassays und DNS-Hybridisierungstests
Lebensmittelchemie 49, 1-6
- DUFFY, G., RIORDAN, D.C., SHERIDAN, J.J., CALL, J.E., WHITING, R.C., BLAIR, I.S. McDOWELL, D.A. (2000)
Effect of pH on survival, thermotolerance, and verotoxin production of *Escherichia coli* O157:H7 during simulated fermentation and storage
J. Food Prot. 63, 12-18
- DUNN, J.R., KEEN, J.E., MORELAND, D., ALEX. T. (2004)
Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 in white-tailed deer from Louisiana
J. Wildl. Dis. 40, 361-5
- DuPONT, H.L., FORMAL, S.B., HORNICK, R.B., SNYDER, M.J., LIBONATI, J.P., SHEEHAN, D.G., LABREC, E.H., KALAS, J.P. (1971)
Pathogenesis of *Escherichia coli* diarrhea
New Engl. J. Med. 285, 1-9
- EDRINGTON, T.S., HUME, M.E., LOOPER, M.L., SCHULTZ, C.L., FITZGERALD, A.C., CALLAWAY, T.R., GENOVESE, K.J., BISCHOFF, K.M., McREYNOLDS, J.L., ANDERSON, R.C., NISBET, D.J. (2004)
Variation in the fecal shedding of *Salmonella* and *E. coli* O157:H7 in lactating dairy cattle and examination of *Salmonella* genotypes using pulsed-field gel electrophoresis
Lett. Appl. Microbiol. 38, 366-372
- EKHOLM, D.F. und HIRSHFIELD, I.N. (2001)
Rapid methods to enumerate *Escherichia coli* in foods using 4-methylumbelliferyl-beta-D-glucuronide
J. AOAC Int. 84, 407-415
- EKLUND, M., SCHEUTZ, F., SIITONEN, A. (2001)
Clinical isolates of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: Serotypes, virulence characteristics, and molecular profiles of strains of the same serotypes
J. Clin. Microbiol. 39, 2829-34

- ELDER, R.O., KEEN, J.E., SIRAGUSA, G.R., BARKOCY-GALLAGHER, G.A., KOOHMARAIE, M., LAEGREID, W. (2000)
Correlation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 prevalence in feces, hides and carcasses of beef cattle during processing
PNAS 97, 2999-3003
- ERIKSSON, E., ASPAN, A., GUNNARSSON, A., VAGSHOLM, I. (2005)
Prevalence of verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) O157 in Swedish dairy herds
Epidemiol. Infect. 133, 349-58
- ESCHERICH, T. (1885)
Die Darmbakterien des Neugeborenen und Säuglings
Fortsch. Med. 3, 514-557
- ETHELBERG, S., OLSEN, K.E., SCHEUTZ, F., JENSEN, C., SCHIELLERUP, P., ENBERG, J., PETERSEN, A.M., OLESEN, B., GERNER-SCHMIDT, P., MOLBAK, K. (2004)
Virulence factors for hemolytic uremic syndrome, Denmark
Emerg. Infect. Dis. 10, 842-7
- FABIO, G., CERMELLI, C., NANNI, H., QUAGLIO, P. (2004)
Comparison of culture and immunoassay for detection of *Escherichia coli* O157 in raw meat and hamburger
New Microbiol. 27, 191-192
- FARMER, J.J. und DAVIS, B.R. (1985)
H7 antiserum-sorbitol fermentation medium: a single tube screening medium for detecting *Escherichia coli* O157:H7 associated with hemorrhagic colitis
J. Clin. Microbiol. 22, 620-625
- FEGAN, N., HIGGS, G., VANDERLINDE, P., DESMARCHELIER, P (2005)
An investigation of *Escherichia coli* O157 contamination of cattle during slaughter at an abattoir
J. Food Prot. 68, 451-7
- FELDSINE, P.T., GREEN, S.T., LIENAU, A. H, KERR, D. E. (2005)
Comparative validation study to demonstrate the equivalence of a minor modification to AOAC methods 996.09, VIP for EHEC and 996.10, Assurance EIA EHEC with the reference culture method for the detection of *Escherichia coli* O157:H7 in beef
J. AOAC 88, 1193-6
- FENG, P., WEAGENT, S.D., MONDAY, S.R. (2001)
Genetic analysis for virulence factors in *Escherichia coli* O104:H21 that was implicated in an outbreak of hemorrhagic colitis
J. Clin. Microbiol. 39 (1), 24-28
- FERGUSON, D.D., SCHEFTEL, J., CRONQUIST, A., SMITH, K., WOO-MING, A., ANDERSON, E., KNUTSEN, J., De AK, GERSHMAN, K. (2005)
Temporally distinct Escherichia coli O157 outbreaks associated with alfalfa sprouts linked to a common seed source- Colorado and Minnesota, 2003
Epidemiol. Infect. 133, 439-447

- FEY, P.D., WICKERT, R.S., RUPP, M.E., SAFRANEK, T.J., HINRICHS, S.H. (2000)
Prevalence of Non-O157:H7 shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Diarrheal Stool samples from Nebraska
Emerg. Infect. Dis. 6, 530-533
- FITZHENRY, R. J., PICKARD, D.J., HARTLAND, E.L., REECE, S., DOUGAN, G., PHILLIPS, A.D., FRANKEL, G. (2002)
Intimin type influences the site of human intestinal mucosal colonisation by enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7
Gut 50, 180-185
- FORESTIER, C., MEYER, M., FAVRE-BONTE, S., RICH, C., MALPUECH, G., LE BOUGUENEC, C., SIROT, J., JOLY, B., De CHAMPS, C. (1996)
Enteroadherent *Escherichia coli* and diarrhea in children: a prospective case-control study
J. Clin. Microbiol. 34, 2897-2903
- FRANCO, B.D., GOMES, T.A., JAKABI, M., MARQUES, L.R. (1991)
Use of probes to detect virulence factor DNA sequences in *Escherichia coli* strains isolated from foods
Int. J. Food Microbiol. 12, 333-338
- FRIEDRICH, A.W., BIELASZEWSKA, M., ZHANG W.L., PULZ, M., KUCZIUS, T., AMMON, A., KARCH, H. (2002)
Escherichia coli harboring Shiga toxin 2 gene variants: frequency and association with clinical symptoms
J. Infect. Dis. 185, 74-84
- FRUTH, A., PRAGER, R., FRIEDRICH, A., KUCZIUS, T., ROGGENTIN, P., KARCH, H., AMMON, A., BOCKEMÜHL, J., TSCHÄPE, H. (2002)
Infektionen des Menschen durch enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC) in der Bundesrepublik Deutschland von 1998 bis 2001
Bundesgesundhbl. 45, 715-721
- FU, Z., ROGELJ, S., KIEFT, T.L. (2005)
Rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7 by immunomagnetic separation and real-time PCR
Int. J. Food Microbiol. 99, 47-57
- FUKUSHIMA, H., HASHIZUME, T., MORITA, Y., TANAKA, J., AZUMA, K., MIZUMOTO, Y., KANENO, M., MATSUURA, M., KONMA, K., KITANI, T. (1999a)
Clinical experiences in Sakai City hospital during the massive outbreak of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 infections in Sakai City, 1996
Pediatr. Int. 41, 213-217
- FUKUSHIMA, H. und GOMYODA, M. (1999b)
An effective, rapid and simple method for isolation of shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26, O111 and O157 from faeces and food samples
Zentrabl. Bakteriol. 289, 415-28
- FURST, S., SCHEEF, J., BIELASZEWSKA, M., RUSSMANN, H., SCHMIDT, H., KARCH, H. (2000)
Identification and characterisation of *Escherichia coli* strains O157 and non-O157 serogroups containing three distinct Shiga toxin genes
J. Med. Microbiol. 49, 383-386

- GALIERO, G., CONEDERA, G., ALFANO, D., CAPRIOLI, A. (2005)
Isolation of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 from water buffaloes (*Bubalus bubalis*) in southern Italy
Vet. Rec. 156, 382-383
- GALLIEN, P., RICHTER, H., KLIE, H., TIMM, M., KARCH, H., PERLBERG, K.-W., STEINRÜCK, H., RIEMER, S., DJUREN, M., PROTZ, D. (1997)
Detection of STEC and epidemiological investigations in surrounding of a HUS patient
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 110, 342-346
- GALLIEN, P., RICHTER, H., KLIE, H., TIMM, M., KARCH, H., LEHMANN, S., PERLBERG, K.-W., TEUFEL, P., PROTZ, D. (1998)
Nachweis von Shigatoxin-produzierenden *Escherichia coli* (STEC) in Lebensmitteln und Charakterisierung der Isolate
Bundesgesundhbl. Sonderheft 10, 26-30
- GANNON, V.P., TEERLING, C., MASRI, S.A., GYLES, C.L. (1990)
Molecular cloning and nucleotide sequence of another variant of the *Escherichia coli* Shiga-like toxin II family
J.Gen. Microbiol. 136, 1125-1135
- GANNON, V.P., RASHED, M., KING, R.K., GOLSTEYN THOMAS, E.J. (1993)
Detection and characterization of the eae Gene of Shiga-Like Toxin-Producing *Escherichia coli* using Polymerase Chain Reaction
J. Clin. Microbiol. 31, 1268-1274
- GANNON, V.P., GRAHAM, T.A., READ, S., ZIEBELL, K., MUCKLE, A., MORI, J., THOMAS, J., SELINGER, B., TOWNSHEND, I., BYRNE, J (2004)
Bacterial pathogens in rural water supplies in Southern Alberta, Canada
J. Toxicol. Environ. Health 67, 1643-1653
- GARCIA, A., FOX, J.G. (2003)
The rabbit as a new reservoir host of enterohemorrhagic *Escherichia coli*
Emerg. Infect. Dis. 9, 1592-7
- GARBER, L., WELLS, S., SCHROEDER-TUCKER, L., FERRIS, K. (1999)
Factors associated with fecal shedding of verotoxin-producing *Escherichia coli* O157 on dairy farms
J. Food Protect. 62 , 307-312
- GAREIS, M., PICHNER, R., BREY, N., STEINRÜCK, H. (2000)
Nachweis Verotoxin-bildender *E-coli* (VTEC) bei gesunden Mitarbeitern eines Fleisch verarbeitenden Betriebes
Bundesgesundheitsbl. 43, 781-787
- GASSER, C., GAUTIER, E., SIEBENMANN, R.E., OECHSLIN, R. (1955)
Hämolytisch-urämisches Syndrom: bilaterale Nierenrindennekrose bei akuten erworbenen hämolytischen Anämien
Schweiz. Med. Wochenschrft. 85, 905-909

- GEUE, L., SEGURA-ALVAREZ, M., CONRATHS, F.J., KUCZIUS, T., BOCKEMUHL, J., KARCH, H., GALLIEN, P. (2002)
A long-term study on the prevalence of shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) on four German cattle farms
Epidemiol. Infect. 129, 173-185
- GEUE, L., NAUMANN, J., SCHRÖDEL, W., KRÜGER, M. (2005)
Einfluss von unterschiedlichen Fütterungsstrategien auf die Häufigkeit des Auftretens von STEC/EHEC in Rindern
F.L.I.-www.bfav.de/STEC_EHEC.167.0.html
- GIRON, J.A., JONES, T., MILLAN-VELASCO, F., CASTRO-MUNOZ, E., ZARATE, L., FRY, J., FRANKEL, G., MOSELEY, S.L., BAUDRY, B., KAPER, J.B. (1991)
Diffuse-adhering *Escherichia coli* (DAEC) as a putative cause of diarrhea in Mayan children in Mexico
J. Infect. Dis. 163, 507-513
- GLYNN, K., CODY, S., CAIRNS, L., ALEXANDER, R., FYFE, M., SAMADPOUR, M., LEWIS, J., SWAMINATHAN, B., ABBOTT, S., HOFFMAN, R., KOBAYASHI, J., VUGIA, D., GRIFFIN, P. (1997)
International outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with unpasteurized commercial apple juice
3. Internationales Symposium und Workshop über Shiga Toxin (Verotoxigen)-produzierende *Escherichia coli*-Infektionen (VTEC) in Baltimore (Maryland, USA) (22.-26.6.1997)
- GOLDWATER, P.N. und BETTELHEIM, K.A. (1995)
Outbreak of HUS in Adelaide associated with dry fermented sausage contaminated with VTEC O111:H-
Notiziario dell' Instituto Superiore di Sanita 8, 1-2
- GOLL, M. (2005)
Nachweis und DNA-Fingerprinting von *Escherichia coli* O157-Stämmen bei Pferden
Vet. Med. Diss., Julius Liebig Universität Gießen
- GOW, S., WALDNER, C., NGELEKA, M. (2003)
Prevalence and risk factors of pathogenic *E. coli* including O157:H7, in western Canadian Cow/Calf herds
Canadian Symposium "From the farm gate to the dinner plate", The Westin Edmonton, Edmonton, Alberta-Agricultural Institute of Canada foundation
- GREENQUIST, M.A., DROUILLARD, J.S., SARGEANT, J.M., DEPENBUSH, B.E., SHI, X., LECHTENBERG, K.F., NAGARAJA, T.G (2005)
Comparison of rectoanal mucosal swab cultures and fecal cultures for determining prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 in feedlot cattle
Appl. Env. Microbiol. 71, 6431-3
- GRIF, K., ORTH, D., LEDERER, I. BERGHOLD, C., ROEDL. S., MACHE, C.J., DIERICH, M.P., WÜRZNER (2005)
Importance of environmental transmission in cases of EHEC O157 causing hemolytic uremic syndrome
Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 24, 268-271

- GRIFFIN, P.M., OSTROFF, S.M., TAUXE, R.V., GREEN, K.D., WELLS, J.G., LEWIS, J.H., BLAKE, P.A. (1988)
Illness associated with *Escherichia coli* O157:H7 infections : a broad clinical spectrum
Ann.Intern.Med. 109, 705-712
- GRIFFIN, P.M. und TAUXE, R.V. (1991)
The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated haemolytic uremic syndrome
Epidemiol. Rev. 13, 60-97
- GRIFFIN, P.M. (1997)
Vortrag über die Epidemiologie von EHEC-Infektion in den USA (1982-1996)
3. Internationales Symposium und Workshop über Shiga Toxin (Verozytotoxin)-produzierende *Escherichia coli*-Infektionen (VTEC) in Baltimore (Maryland, USA) (22.-26.6.1997)
- GULIETTA, M.P., KARAOLIS, D.K.R., LAN, R., REEVES, P.R. (1997)
Evolutionary relationships among pathogenic and nonpathogenic *Escherichia coli* strains inferred from multilocus enzyme electrophoresis and mdh sequence studies
Inf. Imm. 65 , 2685-2692
- GYLES, C.L., de GRANDIS, S.A., MacKENZIE, C., BRUNTON, J.L. (1988)
Cloning and nucleotide sequence analysis of the genes determining Verocytotoxin production in a porcine edema disease isolate of *Escherichia coli*
Microbiol. Pathog. 5, 419-426
- GYLES, C., JOHNSON, R., GAO, A., ZIEBELL, K., PIERARD, D., ALEKSIC, S., BOERLIN, P. (1998)
Association of enterohemorrhagic *Escherichia coli* hemolysin with serotypes of shiga-like-toxin-producing *Escherichia coli* of human and bovine origins
Appl. Environ. Microbiol. 64, 4134-4141
- HARA-KUDO, Y., WATANABE, H., KONUMA, H. (2005)
Differences in survival of *Escherichia coli* O157:H7 under various conditions that re-enact the cooking lunches implicated in an outbreak of haemorrhagic diarrhoea
Epidemiol. Infect. 133, 1043-8
- HARTUNG, M. (2001)
Mitteilungen der Länder über VTEC/STEC-Nachweise in Deutschland in: in Bundesinstitut für Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV; Hrsg.): Deutscher Trendbericht über den Verlauf und die Quellen von Zoonosen-Infektionen nach der Zoonosen-RL (92/117EWG) für das Jahr 2000, 75-79
<http://www.bgvv.de>
- HAVELAAR, A.H., Van DUYNHOVEN, Y.T., NAUTA, M.J., BOUWKNEGT, M., HEUVELINK, A.E., De WIT, G.A., NIEUWENHUIZEN, M.G., Van de KAR, N.C. (2004)
Disease burden in The Netherlands due to infections with Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157
Epidemiol. Infect. 132, 467-84
- HEAD, S.C., PETRIC, M., RICHARDSON, S., ROSCOE, M., KARMALI, M.A. (1988)
Purification and characterization of Verotoxin 2
FEMS Microbiol. Lett. 51, 211-216

- HECKÖTTER, S., SCHUY, C., BÜLTE, M. (1996)
Immunomagnetische Separation von *E. coli* O157-Stämmen aus Lebensmitteln
48. Jahrestagung der Dtsch Ges. für Hygiene und Mikrobiologie, Bonn
- HECKÖTTER, S., DELORME, S., ALEKSIC, S., BÜLTE, M. (1997)
Phänotypische und genotypische Variabilität Verotoxin-bildender *E. coli* (VTEC) in
Lebensmitteln tierischen Ursprungs
Proc. 38. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Dtsch.Vet. Med
Ges. (DVG), Eigenverlag der DVG, Gießen, 146-151
- HECKÖTTER, S. (1999)
Vergleichende Untersuchungen zum Nachweis von *E. coli* O157:H7-Stämmen aus
künstlich kontaminiertem Rinderhackfleisch unter besonderer Berücksichtigung der
immunomagnetischen Separation (IMS).
Vet. Med. Diss., Justus Liebig Universität Giessen
- HEUVELINK, A.E., Van den BIGGELAAR, F.L.A.M., ZWARTKRUIS-NAHUIS, J.T.M.,
HERBES, R.G., HUYBEN, R., NAGELKERKE, N., MELCHERS, W.J.G., MONNENS
L.A.H., de BOER, E. (1998)
Occurrence of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 on dutch dairy farms
J. Clin. Microbiol. 36, 3480-3487
- HEUVELINK, A.E., ZWARTKRUIS-NAHUIS, J.T.M., Van den BIGGELAAR, F.L.A.M.,
Van LEUWEN, W.J., de BOER, E. (1999a)
Isolation and characterization of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 from
slaughter pigs and poultry
Int. J. Food Microbiol. 52, 67-75
- HEUVELINK, A.E., ZWARTKRUIS-NAHUIS, J.T.M., BEUMER, R.R., de BOER, E.
(1999b)
Occurrence and survival of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in meats
obtained from retail outlets in the Netherlands
J. Food Prot. 62, 1115-22
- HILL, W.E. und KEASLER, S.P. (1991)
Identification of foodborne pathogens by nucleic acid hybridization.
Int. J. Food Microbiol. 12, 67-76
- HOCKIN, J., MARCH, S., RATMAN, S. (1983)
Hemorrhagic colitis associated with *Escherichia coli* O157:H7 - Newfoundland and
Labrador
Can. Dis. Week. Rep. 9, 182-184
- HOCKIN, J. und LIOR, H. (1987)
Hemorrhagic colitis and haemolytic uremic syndrome caused by *Escherichia coli* O157:H7
in Canada
Can. Dis. Week. Rep. 13, 203-204
- HONISH, L., PREDY, G., HISLOP, N., CHUI, L., KOWALEWSKA-GROCHOWSKA,
K., TROTTIER, L., KREPLIN, C., ZAZULAK, I. (2005)
An outbreak of *E. coli* O157:H7 hemorrhagic colitis associated with unpasteurized gouda
cheese
Can. J. Public Health 96, 182-4

- HOPKINS, K.L. und HILTON, A.C. (2001)
Optimization of random amplification of polymorphic DNA analysis for molecular subtyping of *Escherichia coli* O157
Lett. Appl. Microbiol. 32, 126-130
- HUBER, H.C., KUGLER, R., LIEBL, B. (1998)
Infektionen mit enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC) – Ergebnisse einer epidemiologischen Erhebung in Bayern für den Zeitraum April 1996 bis März 1997
Gesundheitswesen 60, 159-165
- HULL, A.E., ACHESON, D.W.K., ECHEVERRIA, P., DONOHUE-ROLFE, A., KEUTSCH, G.T. (1993)
Mitomycin immunoblot colony assay for detection of shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* in fecal samples: comparison with DNA probes
J. Clin. Microbiol. 31, 1167-1172
- HUSSEIN, H.S. und BOLLINGER, L.M (2005)
Prevalence of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef cattle
J. Food Prot. 68, 2224-41
- HUSSEIN, H.S. und SAKUMA, T. (2005)
Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: pre- and postharvest control measures to ensure safety of dairy cattle products
J. Food Protect. 68, 199-207
- HYATT, D.R., GALLAND, J.C., GILLESPIE, J.R. (2001)
Usefulness of a commercially available enzyme immunoassay for Shiga-like toxins I and II as a presumptive test for the detection of *Escherichia coli* O157:H7 in cattle feces
J. Vet. Diagn. Invest. 13, 71-73
- IIZUKA, S., TSUNOMORI, Y., TABARA, K., TSUDA, K., FUKUMA, T. (2005)
An outbreak of mixed infection of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26:H11 and *Norovirus* Genogroup II at a Kindergarten in Shimane, Japan
Jpn. J. Infect. Dis. 58, 329-330
- IRINO, K., KATO, M.A., VAZ, T.M., RAMOS, I.I., SOUZA, M.A., CRUZ, A.S., GOMES, T.A., VIEIRA, M.A., GUTH, B.E. (2005)
Serotypes and virulence markers of shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolated from dairy cattle in Sao Paulo State, Brazil
Vet. Microbiol. 105, 29-36
- ISLAM, M., DOYLE, M.P., PHATAK, S.C., MILLNER, P., JIANG, X. (2004)
Persistence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in soil and on leaf lettuce and parsley grown in fields treated with contaminated manure composts or irrigation water
J. Food Prot. 67, 1365-70
- ITO, H., TERAJ, A., KURAZANO, H., TAKEDA, Y., NISHIBUCHI, M. (1990)
Cloning and nucleotide sequencing of verotoxin 2 variant genes from *Escherichia coli* O91:H21 isolated from a patient with the hemolytic uremic syndrome
Microbiol. Pathog. 8, 47-60

- JACKSON, M.P., NEILL, R.J., O'BRIEN, A. D., NEWLAND, J. (1987)
Nucleotide sequence analysis and comparison of the structural gene for Shiga-like toxin I and Shiga-like toxin II encoded by bacteriophages from *Escherichia coli*
933 J
FEMS Microbiol. Lett. 44, 109-114
- JO, M.Y., KIM, J.H., LIM, J.H., KANG, M.Y., KOH, H.B., PARK, Y.H., YOON, D.Y., CHAE, J.S., EO, S.K., LEE, J.K (2004)
Prevalence and characteristics of *Escherichia coli* O157 from major food animals in Korea
Int. J. Food Microbiol. 95, 41-9
- JÖCKEL, J. (1997)
Andere Infektionserreger: Kontaminationsgrad in Lebensmittel und Risikoeinschätzung für den Verbraucher
Japanischdeutsches Zentrum Berlin 32, 34-47
- JOHNSON, W.M. und LIOR, H. (1988)
A new heat-labile cytolethal distending toxin (CLDT) produced by *Escherichia coli* isolates from clinical material
Microbiol. Pathog. 4, 103-113
- JOHNSON, W.M., POLLARD, D.R., LIOR, H., TYLER, S.D., ROZEE, K.R. (1990)
Differentiation of genes coding for *Escherichia coli* verotoxin 2 and the verotoxin associated with porcine edema disease (Vte) by the polymerase chain reaction
J. Clin. Microbiol. 28, 2351-2353
- JOHNSON, R.P., DURHAM, R.J., JOHNSON, S.T., MacDONALD, L.A., JEFFREY, S.R., BUTMAN, B.T. (1995)
Detection of *Escherichia coli* O157:H7 in meat by an enzyme-linked immunosorbent assay, EHEC-Tek
Appl. Envir. Microbiol. 61, 386-388
- JOHNSON, P., MAHDI, A., BAKER, T. (2003)
Overview of microbiological baseline Studies of raw pork, beef and chicken carcasses in Ontario abattoirs
Canadian Symposium "From the farm gate to the dinner plate", The Westin Edmonton, Edmonton, Alberta-Agricultural Institute of Canada Foundation
- JORES, J., WAGNER, S., RUMER, L., EICHBERG, J., LATURNUS, C., KIRSCH, P., SCHIERACK, P., TSCHÄPE, H., WIELER, L.H. (2005)
Description of a 111-bc pathogenicity island (PAI) encoding various virulence features in the enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) strain RW1374 (O103:H2) and detection of a similar PAI in other EHEC strains of serotype O103:H2
Intern. J. Med. Microbiol. 294, 417-425
- JUDGE, N.A., MASON, H.S., O'BRIEN, A.D. (2004)
Plant cell-based intimin vaccine given orally to mice primed with intimin reduces time of *Escherichia coli* O157:H7 shedding in feces
Infect. Immun. 72, 168-175

- KADDU-MULINDW, D.H., AISU, T., GLEIER, K., ZIMMERMANN, S., BEUTIN, L (2001)
Occurrence of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in fecal samples from children with diarrhea and from healthy zebu cattle in Uganda
Int. J. Food Microbiol. 66, 95-101
- KARCH, H. und BOCKEMÜHL, J. (1989a)
Infektionen durch enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC): ein klinisches und mikrobiologisches Problem und eine Herausforderung für den öffentlichen Gesundheitsdienst.
Immun. Infekt. 17, 206-211
- KARCH, H. und MEYER, T. (1989b)
Single primer pair for amplifying segments of distinct shiga-like-toxin genes by polymerase chain reaction
J. Clin. Microbiol. 27, 2751-2757
- KARCH, H., WISS, R., GLONING, H., EMMRICH, P., ALEKSIC, S., BOCKEMÜHL, J. (1990)
Hemolytic-uremic syndrome in infants due to verotoxin-producing *Escherichia coli*
Dtsch. Med. Wochenschr. 115, 489-495
- KARCH, H., MEYER, T., RÜSSMANN, H., HEESEMANN, J. (1992)
Frequent loss of Shiga-like toxin genes in clinical isolates of *Escherichia coli* upon subcultivation
Infect. Immun. 60, 3464-3467
- KARCH, H., SCHMIDT, H., SCHWARZKOPF, A. (1996a)
Enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC)
Die gelben Hefte 36, 125-135
- KARCH, H., JANETZKI-MITTMANN, C., ALEKSIC, S., DATZ, M. (1996b)
Isolation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 strains from patients with hemolytic-uremic syndrome caused by using immunomagnetic separation, DNA-based methods, and direct culture
J. Clin. Microbiol. 34, 516-519
- KARCH, H. und KOHLER, B. (1999)
Neue Erkenntnisse zur Molekularbiologie der Enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC) O157
Gesundheitswesen 61, 46-51
- KARCH, H., TARR, P.I., BIELASZEWSKA, M. (2005)
Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in human medicine
Intern. J. Med. Microbiol. 295, 405-418
- KARMALI, M.A., STEELE, B.T., PETRIC, M., LIM, C. (1983)
Sporadic cases of hemolytic uremic syndrome associated with fecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools
Lancet 1, 619-620

- KARMALI, M.A, PETRIC, M., LIM, C., FLEMING, P.C., ARBUS, G.S., LIOR, H. (1985)
The association between hemolytic uremic syndrome and infection by Verotoxin-producing *Escherichia coli*
J. Infect. Dis. 151, 775-782
- KARMALI, M.A. (1989)
Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*
Clin. Microbiol. Rev. 2, 15-38
- KASRAZADEH, M. und GENIGEORGIS, C. (1995)
Potential growth and control of *Escherichia coli* O157:H7 in soft hispanic type cheese
Int. J. Food Microbiol. 25, 289-300
- KATO, K., SHIMOURA, R., NASHIMURA, K., YOSHIFUZI, K., SHIROSHITA, K., SAKURAI, N., KODAMA, H., KURAMOTO, S. (2005)
Outbreak of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O111 among high school participants in excursion to Korea
Jpn. J. Infect. Dis. 58, 332-3
- KAUFFMANN, F. (1944)
Zur Serologie der *Coli*-Gruppe
Act. Pathol. Microbiol. Scand. 21, 20-45
- KAWASAKI, S., HORIKOSHI, N., OKADA, Y., TAKESHITA, K., SAMESHIMA, T., KAWAMOTO, S. (2005)
Multiplex PCR for simultaneous detection of *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli* O157:H7 in meat samples
J. Food. Prot. 68, 551-556
- KEHL, K.S., HAVENS, P., BEHNKE, C.E., ACHESON, D.W. K. (1997)
Evaluation of the Premier EHEC assay for the detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*
J. Clin. Microbiol. 35, 2051-2054
- KIJIMA-TANAKA, M., ISHIHARA, K., KOJIMA, A., MORIOKA, A., NAGATA, R., KAWANISHI, M., NAKAZAWA, M., TAMURA, Y., TAKAHASHI, T. (2005)
A national surveillance of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in food-producing animals in Japan
J. Vet. Med. B. 52, 230-237
- KILIAN, M. und BULOW, P. (1976)
Rapid diagnosis of Enterobacteriaceae, I. Detection of bacterial glycosidases
Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B84, 245-251
- KLIE, H., TIMM, M., RICHTER, H., GALLIEN, P., PERLBERG, K.-W., STEINRÜCK, H. (1997)
Nachweis und Vorkommen von Verotoxin- bzw. Shigatoxin-bildenden *Escherichia coli* (VTEC bzw. STEC) in Milch
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 110, 337-341

- KNAPPSTEIN, K., HAHN, G., HEESCHEN, W. (1996)
Untersuchungen zum Vorkommen von Verotoxin-bildenden *Escherichia coli* (VTEC) in Weichkäse
Arch. Lebensmittelhyg. 47, 59-62
- KONOWALCHUK, J., SPEIRS, J.I., STAVRIC, S. (1977)
Vero Response to a Cytotoxin of *Escherichia coli*
Infection and Immunity 18 , 775-779
- KUNTZE U., BECKER, H., MÄRTLBAUER, E., BAUMANN, C., BUROW, H. (1996)
Nachweis von verotoxinbildenden *E. coli*-Stämmen in Rohmilch und Rohmilchkäse
Archiv für Lebensmittel 47, 129-152
- KUCZIUS, T., BIELASZEWSKA, M., FRIEDRICH, A. W. , ZHANG, W. (2004)
A rapid method for the discrimination of genes encoding classical Shiga toxin (Stx)1 and its variants, Stx1c and Stx1d, in *Escherichia coli*
Mol. Nutr. Food Rs. 48, 515-521
- KUVDA I.T., HATFIELD, P.G., HOVDE, C.J. (1997)
Characterization of *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* serotypes isolated from sheep
J. Clin. Microbiol. 35, 892-899
- KWON, N.H., KIM, S.H., KIM, J.Y., LIM, J.Y., KIM, J.M., JUNG, W.K., PARK, K.T., BAE, W.K., NOH, K.M., CHOI, J.W., HUR, J., PARK Y.H. (2003)
Antimicrobial performance of alkaline ionic fluid (GC-100X) and its ability to remove *Escherichia coli* O157:H7 from the surface of tomatoes
J. Food Prot. 66, 1604-10
- LAINE, E.S., SCHEFTEL, J.M., BOXRUD, D.J., VOUGHT, K.J., DANILA, R.N., ELFERING, K.M., SMITH, K.E. (2005)
Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with nonintact blade-tenderized frozen steaks sold by door-to-door vendors
J. Food Prot. 68, 1198-1202
- LEAHY, E. (1995)
Lettuce associated with outbreak of *E. coli* O157:H7 infection
Newsletter 46/47, 3
- LEHMACHER A., MEIER, H., ALEKSIC, S., BOCKEMÜHL, J. (1998)
Detection of hemolysin variants of shiga toxin-producing *Escherichia coli* by PCR and culture on vanomycin-cefixime-cefsulodin blood agar
Appl. Environ. Microbiol. 64, 2449-2453
- LeJEUNE, J.T., BESSER, T.E., RICE, D.H., BERG, J.L., STILBORN, R.P., HANCOCK, D.D. (2004)
Longitudinal study of fecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in Feedlot cattle: predominance and persistence of specific clonal types despite massive cattle population turnover
Appl. Environ. Microbiol. 70, 377-84

- LeJEUNE, J.T. und KAUFFMAN, M.D. (2005)
Effect of sand and sawdust bedding materials on the fecal prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 in dairy cows
Appl. Environ. Microbiol. 71, 326-30
- LEOTTA, G.A., CHINEN, I., EPSZTEYN, S., MILIWEBSKY, E., MELAMED, I.C., MOTTER, M., FERRER, M., MAREY, E., RIVAS, M (2005)
Validation of a multiplex PCR for detection of shiga toxin-producing *Escherichia coli*
Rev. Argent Microbiol. 37, 1-10
- LEUNG, P.H., PEIRIS, J.S., NG, W.W., ROBINS-BROWNE, R.M., BETTELHEIM, K.A., YAM, W.C. (2003)
A newly discovered verotoxin variant, VT2g, produced by bovine verocytotoxigenic *Escherichia coli*
Appl. Environ. Microbiol. 12, 7549-53
- LEVINE, M.M. (1987a)
Escherichia coli that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic
J. Infect. Dis. 155, 377-389
- LEVINE, M.M., XU, J., KAPER, J., LIOR, H., BRADOP, V., TALL, B., NATARO, J., KARCH, H., WACHSMUTH, K. (1987b)
A DNA probe to identify enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and other serotypes that cause hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome
J. Infect. Dis. 156, 175-182
- LINDBERG, A.A., BROWN, J.E., STRÖMBERG, N., WESTLING-RYD, M., SCHULTZ, J.E., KARLSSON, K.A. (1987)
Identification of the carbohydrate receptor for Shiga toxin produced by *Shigella dysenteriae* type 1
J. Biol. Chem. 262, 1779-1785
- LINGWOOD, C.A., LAW, H., RICHARDSON, S.E., PETRIC, M., BRUNTON, J.L., de GRANDIS, S., KARMALI, M.A. (1987)
Glycolipid binding of natural and recombinant *Escherichia coli* produced Verotoxin in vitro
J. Biol. Chem. 262, 8834-8839
- LIPTAKOVA, A., SIEGFRIED, L., ROSOCHA, J., PODRACKA, L., BOGYIOVA, E., KOTULOVA, D. (2004)
A family outbreak of haemolytic uraemic syndrome and haemorrhagic colitis caused by verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157 from unpasteurised cow's milk in Slovakia
Clin. Microbiol. Infect. 10, 576-8
- LJUNGH, A. und WADSTRÖM, T. (1988)
Subepithelial connective tissue protein binding of *E. Coli* isolated from patients with ulcerative colitis
Mac Dermott, R.P. (Ed.): Inflammatory bowel disease: current status and future approach, Elsevier, Amsterdam , 571

- LOUIE, M., de AZAVEDO, J.C., HANDELSMAN, M.Y., CLARK, C.G., ALLY, B., DYTOC, M., SHERMAN, P., BRUNTON, J. (1993)
Expression and characterization of the eaeA gene product of *Escherichia coli* serotype O157:H7
Infect. Immun. 61, 4085-92
- LOW, J.C., McKENDRICK, I.J., McKECHNIE, C., FENLON, D., NAYLOR, S.W., CURRIE, C., SMITH, D.G.E, ALLISON, L., GALLY, D.L (2005)
Rectal carriage of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 in slaughtered cattle
Appl. Envir. Microbiol. 71, 93-97
- LUKASOVA, J., ABRAHAM, B., CUPAKOVA, S. (2004)
Occurrence of *Escherichia coli* O157 raw material and food in Czech Republic
J. Vet. Med. B. 51, 77-81.
- MÄRTLBAUER, E. und H. BECKER (1996)
Immunological determination of micro-organisms and toxins in food: application and prospects
Fleischwirtsch. 76, 54-57
- MALLMANN, W.L. und DARBY, C.W. (1941)
Use of a lauryl sulphate tryptose broth for the detection of coliforms organisms
Am. J. Publi. Health 31, 127-134
- MANAFI, M. und KREMSMAIER, B (2001)
Comparative evaluation of different chromogenic/fluorogenic media for detecting *Escherichia coli* O157:H7 in food
Int. J. Food Microbiol. 71, 257-62
- MARCH, S.B. und RATNAM, S. (1986)
Sorbitol-MacConkey medium for detection of *Escherichia coli* O157:H7
Associated with hemorrhagic colitis
J. Clin. Microbiol. 23, 869-872
- MARCH, S.B. und RATNAM, S. (1989)
Latex agglutination test for detection of *Escherichia coli* serotype O157
J. Clin. Microbiol. 27, 1675-1677
- MARIANI-KURKDJIAN, P., DENAMUR, E., MILON, A., PICARD, B., CAVE, H., LAMBERT-ZECHVSKY, N., LOIRAT, C., GOULLET, P., SANSONETTI, P.J., ELION, J. (1993)
Identification of a clone of *Escherichia coli* O103:H2 as a Potential Agent of Hemolytic-Uremic Syndrome in France
J.Clin. Microbiol. 31, 296-301
- MARQUES, L.R.M, PEIRIS, J.S.M, CRYZ, S.J., O'BRIEN, A.D. (1987)
Escherichia coli strains isolated from pigs with edema disease produce a variant of Shiga-like toxin II
FEMS Microbiol. Lett. 44, 33-38
- MASSA, S., ALTIERI, C., QUARANTA, V., de PACE, R. (1997)
Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in yoghurt during preparation and storage at 4 C
Lett. Appl. Microbiol. 24, 347-350

MATHEWSON, J.J., JOHNSON, P.C., DuPONT, H.L., MORGAN, D.R., THORNTON S.A., WOOD, L.V., ERICSSON, C.D. (1985)

A newly recognized cause of travelers' diarrhea: enteroadherent *Escherichia coli*
J. Infect. Dis. 151, 471-475

MAULE, A. (2000)

Survival of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157 in soil, water and on surfaces
Symp. Ser. Soc. Appl. Microbiol. 29, 71-78

McCARTHY, J., HOLBROOK, R., STEPHENS, P. J. (1998)

An improved direct plate method for the enumeration of stressed *Escherichia coli* O157:H7 from food
J. Food Prot. 61, 1093-1097

McCLEERY, D.R. und ROWE, M.T. (1995)

Development of a selective plating technique for the recovery of *Escherichia coli* O157:H7 after heat stress
Lett. Appl. Microbiol. 21, 252-256

McDANIEL, T.K., JARVIS, K.G., DONNENBERG, M.S., KAPER, J.B. (1995)

A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92, 1664-1668

McKEE, R., MADDEN, R.H., GILMOUR, A. (2003)

Occurrence of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* in dairy and meat processing environments
J. Food Prot. 66, 1576-80

McKENZIE, E.F.W., TAYLOR, W.E., GILBERT, W.E. (1948)

Recent Experiments in the rapid identification of *Bacterium coli* type I
J. Gen. Microbiol. 2, 197-204

McQUIGGE, M. , BRUCE-GREY-OWEN SOUND UNIT HEALTH (2000)

Waterborne outbreak of gastroenteritis associated with a contaminated municipal water supply, Walkerton, Ontario, May-June 2000
Can. Comm. Dis. Rep. 26, 170-3

MEAD, P.S., SLUTSKER, L., DIETZ, V., McCAIG, L. F., BRESEE, J.S., SHAPIRO, C., GRIFFIN, P.M., TAUXE, R.V. (1999)

Food related illness and death in the United States
Emerg. Infect. Dis. 5, 607-25

MEICHTRI, L., MILIWEBSKY, E., GIOFFRE, A., CHINEN, I., BASCHKIER, A., CHILLEMI, G., GUTH, B.E., MASANA, M.O., CATALDI, A., RODRIGUEZ, H.R., RIVAS, M. (2004)

Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in healthy young beef steers from Argentina: prevalence and virulence properties
Int. J. Food Microbiol. 96, 189-98

- MERMIN, J. H., HILBORN, E.D., VOETSCH, A., SWARTZ, M., LAMBERT-FAIR, M.A., FARRAR, J., VUGIA, D., HADLER, J., SLUTSKER, L. (1997)
A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with eating mesclun mix lettuce
3. Internationales Symposium und Workshop über Shiga Toxin (Verotoxigen)-produzierende *Escherichia coli*-Infektionen (VTEC) in Baltimore (Maryland, USA) (22.-26.6.1997)
- MOHAMMAD, A., PEIRIS, J.S.M., WIJEWANTA, E.A. (1986)
Serotypes of verocytotoxigenic *Escherichia coli* isolated from cattle and buffalo calf diarrhoea
FEMS Microbiol. Lett. 35, 261-265
- MOLINA, P.M., PARMA, A.E., SANZ, M.E. (2003)
Survival in acidic and alcoholic medium of shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 and non-O157:H7 isolated in Argentina
BMC Microbiol. 3, 17
- MORGAN, G.M., NEWMAN, C., PALMER, S.R., ALLEN, J.B., SHEPHERD, W., RAMPLING, A.M., WARREN, R.E., GROSS, R.J., SCOTLAND, S.M., SMITH, H.R. (1988)
First recognized community outbreak of haemorrhagic colitis due to verotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 in the U.K.
Epidemiol. Inf. 101, 83-91
- MORGAN, D., NEWMAN, C.P., HUTCHINSON, D.N., WALKER, A.M., ROWE, B., MAJID, F. (1993)
Verotoxin producing *Escherichia coli* O157 infections associated with the consumption of yoghurt
Epidemiol. Infect. 111, 181-187
- MORRISON, D.M., TYRELL, D.L.J., JEWELL, L.D. (1985)
Colonic biopsy in Verotoxin-induced hemorrhagic colitis and thrombotic thrombo-cytopenic purpura (TTP)
Am. J. Clin.Pathol. 86, 108-112
- MOSCHCOWITZ, E. (1924)
Hyaline thrombosis of the terminal arterioles and capillaries: a hitherto undescribed disease
Proc. N.Y. Pathol. Soc. 24, 21-24
- MOSUPYE, F.M. und HOLY, A. (2000)
Microbiological hazard identification and exposure assessment of street food vending in Johannesburg, South Africa
Int. J. Food Microbiol. 61, 137-45
- MUKHERJEE, J., CHIOS, K., FISCHWILD, D., HUDSON, D., O'DONNELL, S., RICH, S.M., DONOHUE-ROLFE, A., TZIPORI, S. (2002)
Human Stx2-specific monoclonal antibodies prevent systemic complications of *Escherichia coli* O157:H7 infection
Infect. Immun. 70, 612-9

MÜLLER, A. und BÜLTE, M. (1997)

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

Proc. 38. Arbeitstagung Arbeitsgebiet Lebensmittelhygiene der Dtsch. Vet. Med. Ges., 515-519

MÜLLER, A., BÜLTE, M., MACK, H. (1998)

Überlebenskinetik und Virulenzfaktoren von verotoxinogenen bzw. enterohämorrhagischen *Escherichia coli*-(VTEC-/EHEC-)Stämmen in Rohwurst

Proc. 39. Arbeitstagung Arbeitsgebiet Lebensmittelhygiene der Dtsch. Vet. Med. Ges., 495-499

MULLIS, K.B. und FALOONA, F.A. (1987)

Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalysed chain reaction methods
Enzymol. 155, 335-350

MUNIESA, M., RECKTENWALD, J., BIELASZEWSKA, M., KARCH, H., SCHMIDT, H. (2000)

Characterization of a shiga toxin 2e-converting bacteriophage from an *Escherichia coli* strain of human origin

Infect. Im. 68, 4850-4855

MURINDA, S.E., NGUYEN, L.T., IVEY, S.J., GILLESPIE, B.E., ALMEIDA, R.A., DRAUGHON, F.A., OLIVER, S.P. (2002)

Prevalence and molecular characterization of *Escherichia coli* O157:H7 in bulk tank milk and fecal samples from cull cows: a 12-month survey of dairy farms in east Tennessee
J. Food Prot. 65, 752-759

MURINDA, S.E., NGUYEN, L.T., NAM, H.M., ALMEIDA, R.A., HEADRICK, S.J., OLIVER, S.P. (2004a)

Detection of sorbitol-negative and sorbitol-positive shiga toxin-producing *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni* and *Salmonella spp.* in dairy farm environmental samples

Foodborne Pathog. Dis. 1, 97-104

MURINDA, S.E., BATSON, S.D., NGUYEN, L.T., GILLESPIE, B.E., OLIVER, S.P. (2004b)

Phenotypic and genetic markers for serotype-specific detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26 strains from North America

Foodborne Pathog. Dis. 1, 125-35

MURINDA, S.E., NGUYEN, L.T., LANDERS, T.L., DRAUGHON, F.A., MATHEW, A.G., HOGAN, J.S., SMITH, K.L., HANCOCK, D.D., OLIVER, S.P. (2004c)

Comparison of *Escherichia coli* isolates from humans, food, and farm and companion animals for presence of shiga toxin-producing *E. coli* virulence markers

Foodb. Pathog. Dis. 1, 178-84

MURPHY, M., CARROLL, A., WHYTE, P., O'MAHONY, M., ANDERSON, W., McNAMARA, E., FANNING, S. (2005)

Prevalence and characterization of *Escherichia coli* O26 and O111 in retail minced beef in Ireland

Foodb. Pathog. Dis. 2, 357-360

- MUTAKU, I., ERKU, W., ASHENAFI, M. (2005)
Growth and survival of *Escherichia coli* O157:H7 in fresh tropical fruit juices at ambient and cold temperatures
Int. J. Food Sci. Nutr. 56, 133-9
- NAKASONE, N., TRAN, H.H., NGUYEN, M.B., HIGA, N., TOMA, C., SONG, T., ICHINOSE, Y., IWANAGA, M. (2005)
Short report: isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from fecal samples of cows in Vietnam
Am. J. Trop. Med. Hyg. 73, 586-7
- NAKATANI, T., TSUCHIDA, K., YOSHIMURA, R., SUGIMURA, K., TAKEMOTO, Y. (2002)
Plasma exchange therapy for the treatment of *Escherichia coli* O157 associated hemolytic uremic syndrome
Int. J. Mol. Med. 10, 585-8
- NATARO, J.P. und KAPER, J.B. (1998)
Diarrheagenic *Escherichia coli*
Clin. Microbiol. Rev. 11, 142-201
- NEELY, E., BELL, C., FINLAY, D., McCAPPIN, WILSON, I., BALL, H.J. (2004)
Development of a capture/enrichment sandwich ELISA for the rapid detection of enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O26 strains
J. Appl. Microb. 97, 1161-1165
- NETER, E. (1959)
Enteritis due to enteropathogenic *Escherichia coli*. Present day status and unsolved problems
J. Pediatr. 55, 223-239
- NIELSEN, E.M., SKOV, M.N., MADSEN, J.J., LODAL, J., JESPERSEN, J.B., BAGGESEN, D.J. (2004)
Verocytotoxin-Producing *Escherichia coli* in wild birds and rodents in close proximity to farms
Appl. Environ. Microbiol. 70, 6944-6947
- O'BRIEN, A.D., LaVECK, G.D., THOMPSON, M.R., FORMAL, S.B. (1982)
Production of Shigella dysenteriae type 1-like cytotoxin by *Escherichia coli*.
J. Infect. Dis. 146, 763-769
- O'BRIEN, A.D. und LaVECK, G.D. (1983)
Purification and characterization of Shigella dysenteriae 1-like toxin produced by *Escherichia coli*.
Inf. Immun. 40, 675-683
- O'BRIEN, A.D. und HOLMES, R.K. (1987)
Shiga and Shiga-like toxins
Microbiol. Rev. 51, 206-220
- OGDEN, I.D., HEPBURN, N.F., MacRAE, M. (2001)
The optimization of isolation media used in immunomagnetic separation methods for the detection of *Escherichia coli* O157 in foods
J. Appl. Microbiol. 91, 373-379

- OGDEN, I.D., MACRAE, M., STRACHAN, N.J.C. (2005)
Concentration and prevalence of *Escherichia coli* O157 in sheep faeces at pasture in Scotland
J. Appl. Microbiol. 98, 646-651
- OKREND, A.J.G., ROSE, B.E., BENNETT, B. (1990a)
A screening method for the isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from ground beef
J. Food Prot. 53, 249-252
- OKREND, A.J.G., ROSE, B.E., LATTUADA, C.P. (1990b)
Use of 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide in MacConkey sorbitol agar to aid in the isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from ground beef
J. Food Prot. 53, 941-943
- OKREND, A.J.G., ROSE, B.E., MATNER, R. (1990c)
An improved screening method for the detection and isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from ground meat, incorporating the 3M Petrifilm™ Test Kit-HEC- for hemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7
J. Food Prot. 53, 936-940
- OLSEN, J.E., AABO, S., HILL, W., NOTERMANS, S., WERNARS, K., GRANUM, P.E., POPOVIC, T., RASMUSSEN, H.N., OLSVIC, Ö. (1995)
Probes and polymerase chain reaction for detection of food-borne bacterial pathogens Int. J. Food Microbiol. 28, 1-78
- OSWALD, D., TABOURET, M., BOIVIN, R., De RYCKE, J. (1994)
Detection of *Escherichia coli* strains producing cytotoxic necrotizing factor type two (CNF2) by enzyme-linked immunosorbent assay
Vet. Microbiol. 40, 209-218
- OKAYAMA, A., MIKASA, K., MATSUI, N., HIGASHI, N., MIYAMOTO, M., KITA, E. (2004)
An interventional approach to block brain damage caused by shiga-toxin-producing *Escherichia coli* infection, by use of a combination of phosphodiesterase inhibitors
J. Infect. Dis. 190, 2129-2136
- PADHYE, N.V. und DOYLE, M.P. (1991)
Rapid procedure for detecting Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in food
Appl. Environ. Microbiol. 57, p 2693-2698
- PAI, C.H., AHMED, N., LIOR, H., JOHNSON, W.M., SIMS, H.V., WOODS, D.E. (1988)
Epidemiology of sporadic diarrhea due to verocytotoxin-producing *Escherichia coli*: a two-year prospective study
J. Infect. Dis. 157, 1054-7
- PAIBA, G.A., GIBBENS, J.C., PASCOE, S.J.S., WILESMITH, J.W., KIDD, S.A., BYRNE, C., RYAN, J.B.M., SMITH, R.P., McLAREN, I.M., FUTTER, R.J. (2002)
Faecal shedding of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in cattle and sheep at slaughter in Great Britain
Vet. Rec. 150, 593-598

- PATON., A.W., PATON, J.C., HEUZENROEDER, M. W., GOLDWATER, P.N., MANNING, P.A. (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
Microbiol. Pathog 13, 225-236
- PATON., A.W., PATON, J.C., GOLDWATER, P.N., MANNING, P.A. (1993)
Direct detection of *Escherichia coli* Shiga-like toxin genes in primary fecal cultures using the polymerase chain reaction
J. Clin. Microbiol. 31, 3063-3067
- PATON. A.W., RATCLIFE, R. M., DOYLE, R.M., MURRAY, J.S., DAVOS, D., LANSER, J.A., PATON, J.C. (1996a)
Molecular Microbiological Investigation of an Outbreak of Hemolytic-Uremic Syndrome Caused by Dry Fermented Sausage Contaminated with Shiga-Like Toxin-Producing *Escherichia coli*
J. Clin. Microbiol. 34, 1622-1627
- PATON, A.W. und PATON, J.C. (1996b)
Enterobacter cloacae Producing a Shiga-Like Toxin II-Related Cytotoxin Associated with a Case of Hemolytic-Uremic Syndrome
J. Clin. Microbiol. 34, 463-465
- PATON, A.W. und PATON, J.C. (1998)
Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, enterohemorrhagic *E. coli hlyA*, *rfb*_{O111} and *rfb*_{O157}
J. Clin. Microbiol. 36, 598-602
- PATON, A.W., SRIMANOTE, P., WOODROW, M.C., PATON, J. (2001)
Characterization of Saa, a novel Autoagglutinating Adhesin Produced by locus of enterocyte effacement-negative Shiga-toxigenic *Escherichia coli* strains that are virulent for humans
Inf. Immun. 69, 6999-7009
- PATON, A.W., SRIMANOTE, P., TALBOT, U.M., WANG, H., PATON, J. (2004)
A new family of potent AB(5) cytotoxins produced by shiga toxigenic *Escherichia coli*
J. Exp. Med. 200, 35-46
- PATON, A. W. und PATON, J.C. (2005)
Multiplex PCR for direct detection of shiga toxigenic *Escherichia coli* strains producing the novel Subtilase Cytotoxin
J. Clin. Microbiol. 43, 2944-2947
- PAUNIO, M, PEBODY, R., KESKIMAKI, M., KOKKI, M., RUUTU, P., OINONEN, S., VUOTARI, V., SIITONEN, A., LAHTI, E., LEINIKKI, P. (1999)
Swimming-associated outbreak of *Escherichia coli* O157.H7
Epidemiol. Infect. 122, 1-5
- PAVIA, A.T., NICHOLS, C.R., GREEN, D.P., TAUXE, R.V., MOTTICE, S., GREENE, K.D., WELLS, J.G., SIEGLER, R.L., BREWER, E.D., HANNON, D., BLAKE, P.A. (1990)
Hemolytic-Uremic Syndrome during an outbreak of *Escherichia coli* O157.H7 infections in institutions for mentally retarded persons : clinical and epidemiologic observations
J. Pediatr. 116, 544-551

- PICHNER, R., SANDER, A., STEINRUCK, H., GAREIS, M. (2005)
Occurrence of *Salmonella* spp. and shigatoxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in horse faeces and horse meat
Berl. Munch. Tierärztl. Wochenschr. 118, 321-5
- PICOZZI, C., FOSCHINO, R., HEUVELINK, A., BEUMER, R. (2005)
Phenotypic and genotypic characterization of sorbitol-negative or slow-fermenting (suspected O157) *Escherichia coli* isolated from milk samples in Lombardy region
L. Appl. Microbiol. 40, 491-496
- PIERARD, D., Van DAMME, L., MORIAU, L., STEVENS, S., LAUWERS, S. (1997)
Virulence factors of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* isolated from raw meats
Appl. Environ. Microbiol. 63, 4585-4587
- PIERARD, D., MUYLDERMANS, G., MORIAU, L., STEVENS, D., LAUWERS, S. (1998)
Identification of new verocytotoxin type 2 Variant B-Subunit Genes in Human and animal *Escherichia coli* isolates
J. Clin. Microbiol. 36, 3317-3322
- PHILLIPS, D., SUMNER, J., ALEXANDER, J.F., DUTTON, K.M. (2001)
Microbiological quality of Australian sheep meat
J. Food Prot. 64, 697-700
- POZZI, W., BEUTIN, L., WEBER, H. (1996)
Überleben und Nachweis von enterohämorrhagischen *Escherichia coli* in streichfähiger Rohwurst
Fleischwirtsch. 76, 1300-1311
- PRADEL, N., LIVRELLI, V., de CHAMPS, C., PALCOUX, J.B., REYNAUD, A., SCHEUTZ, F., SIROT, J., JOLY, B., FORESTIER, C. (2000)
Prevalence and characterization of shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle, food and children during a one-year study in France
J. Clin. Microbiol. 38, 1023-1031
- PRAGER, R., ANNEMÜLLER, S., TSCHÄPE, H. (2005)
Diversity of virulence patterns among shiga toxin-producing *Escherichia coli* from human clinical cases- need for more detailed diagnostics
Intern. J. Med. Microbiol. 295, 29-38
- QUINTO, E.J. und CEPEDA, A. (1997)
Incidence of toxigenic *Escherichia coli* in soft cheese made with raw or pasteurized milk
Lett. Appl. Microbiol. 24, 291-295
- RADU, S., LING, O.W., RUSUL, G., KARIM, M.I.A., NISHIBUCHI, M. (2001)
Detection of *Escherichia coli* O157:H7 by multiplex PCR and their characterization by plasmid profiling, antimicrobial, resistance, RAPD and PFGE analyses
J. Microbiol. Met. 46, 131-139
- RAGHUBEER, E.V. und MATCHES, J.R. (1990)
Temperature range for growth of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and selected Coliforms in *E coli* (EC)-Medium
J. Clin. Microbiol. 28, 803-805

- RANGEL, J.M., SPARLING, P.H., CROWE, C., GRIFFIN, P., SWERDLOW, D.L. (2005)
Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks, United States, 1982-2002
Emerg. Infect. Dis. 11, 603-609
- READ, S.C., GYLES, C.L., CLARKE, R.C., LIOR, H., MACEWEN, S. (1990)
Prevalence of verocytotoxigenic *Escherichia coli* in ground beef, pork, and chicken in southwestern Ontario
Epidemiol. Infect. 105, 11-20
- REIDA, P., WOLFF, M., PÖHLS, H.W., KUHLMANN, W., LEHMACHER, A., ALEKSIC, S., KARCH, H., BOCKEMÜHL, J. (1994)
An outbreak due to enterohemorrhagic *E. coli* O157:H7 in a children day care centre characterized by person-to-person transmission and environmental contamination
Zbl. Bakt. 281, 534-543
- REISSBRODT, R., SACHSE, U., STEINRÜCK, H., TSCHÄPE, H. (1998)
Charakterisierung chromogener Nährmedien zum Nachweis von *E. coli* O157:H7/H⁻
Bundesgesundhbl. 41, Sonderheft, 36-39
- REY, J., SANCHEZ, S., BLANCO, J.E., HERMOSO de MENDOZA, J., HERMOSO de MENDOZA, M., GARCIA, A., GIL, C., TEJERO, N., RUBIO, R., ALONSO, J.M. (2005)
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. (epub ahead of print, record supplied by publisher)
- REYMOND, D., JOHNSON, R.P., KARMALI, M.A., PETRIC, M., WINKLER, M., JOHNSON, S., RAHN, K., RENWICK, S., WILSON, J., CLARKE, R.C., SPIKA, J. (1996)
Neutralizing Antibodies to *Escherichia coli* Vero Cytotoxin 1 and Antibodies to O157 Lipopolysaccharide in Healthy Farm Family Members and Urban Residents
J. Clin. Microbiol. 34, 2053-2057
- RICHTER, H., KLIE, H., TIMM, M., GALLIEN, P., PERLBERG, K.W., TEUFEL, P., PROTZ, D. (1998)
Verotoxin-bildende *Escherichia coli* (VTEC) in Milch, Fleisch und Wurst von Rindern als potentielle enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC)
RKI Info II, 3-5
- RILEY, L.W., REMIS, R.S., HELGERSON, S.D., MCGEE, H.B., WELLS, J.G., DAVIS, B.R., HERBERT, R.J., OLCOTT, E.S., JOHNSON, L.M., HARGRETT, N.T., BLAKE, P.A., COHEN, M.L. (1983)
Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype O157:H7
N. Engl. J. Med. 308, 681-685
- RILEY, L.W. (1987)
The epidemiologic, clinical, and microbiologic features of hemorrhagic colitis
Ann. Rev. Microbiol. 41, 383-407
- RILEY, D.G., GRAY, J.T., LONERAGAN, G.H., BARLING, K.S., CHASE, C.C. (2003)
Escherichia coli O157:H7 prevalence in fecal samples of cattle from a southeastern beef cow-calf herd
J. Food Prot. 66, 1778-82

- RIOS, M., PRADO, V., TRUCKSIS, M., ARELLANO, C., BORIE, C., ALEXANDRE, M., FICA, A., LEVINE, M.M. (1999)
Clonal diversity of chilean isolates of enterohemorrhagic *Escherichia coli* from patients with haemolytic-uremic syndrome, asymptomatic subjects, animal reservoirs, and food products
J. Clin. Microbiol. 37, 778-781
- RKI (Robert-Koch-Institut) (1996a)
Häufung von EHEC-Erkrankungen in Bayern
Epidemiologisches Bulletin 20/96
- RKI (Robert-Koch-Institut) (1996b)
EHEC-Epidemie in Japan klingt aus: Stand des Wissens
Epidemiologisches Bulletin 36/96
- RKI (Robert Koch Institut) (2004)
Risikofaktoren für sporadische STEC(EHEC)-Erkrankungen
Epidemiologisches Bulletin 50/04
- RKI (Robert Koch Institut) (2006)
Ausgewählte Zoonosen im Jahr 2005: Durch Lebensmittel übertragbare bakterielle gastrointestinale Infektionen
Epidemiologisches Bulletin 41/06
- ROBAEYS, G., SURMONT, I., LEMMENS, P., COREMANS, G., VANTRAPPEN, G., VANDEPITTE, J. (1987)
Hemorrhagic colitis and verotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in Belgium
Lancet ij, 1495-1496
- ROTHBAUM, R., McADAMS, J., GIANELLA, R., PARTIN, J.C. (1982)
A clinicopathologic study of enterocyte-adherent *Escherichia coli*: a cause of protracted diarrhea in infants
Gastroenterol. 83, 441-454
- RÜSSMANN, H., KOTHE, E., SCHMIDT, H., FRANKE, S., HARMSSEN, D., CAPRIOLI, A., KARCH, H. (1995)
Genotyping of shiga-like toxin genes in non-O157 *E. coli* strains associated with haemolytic uraemic syndrome
J. Med. Microbiol. 42, 404-410
- SAGE, J.R. und INGHAM, S.C. (1998)
Evaluating survival of *Escherichia coli* O157:H7 in frozen and thawed apple cider: potential use of a hydrophobic grid membrane filter SD-39 agar method
J. Food Prot. 61, 490-494
- SALMON, R.L., FARREL, I.D., HUTCHINSON, J.G.P., COLEMAN, D.J., GROSS R.J., FRY, N.K., ROWE, B., PALMER, S.R. (1989)
A christening party outbreak of haemorrhagic colitis and haemolytic syndrome associated with *Escherichia coli* O157:H7
Epidemiol. Inf. 103, 249-254

- SAMADPOUR, M., LISTON, J., ONGERTH, J.E., TARR, P.I. (1990)
Evaluation of DNA probes for detection of Shiga-like-toxin-producing *Escherichia coli* in food and fecal calf samples
Appl. Envir. Microbiol. 56, 1212-1215
- SAMUEL, J.E., PERERA, L.P., WARD, S., O'BRIEN, A.D., GINSBURG V., KRIVAN, H.C. (1990)
Comparison of their glycolipid receptor specificities of *Shiga*-like toxin type II and *Shiga*-like toxin type II variants
Infect. Immun. 58, 611-618
- SCHAUER, D.B, und FALKOW, S. (1993)
Attaching and effacing locus of a *Citrobacter freundii* biotype that causes transmissible murine colonic hyperplasia
Infect. Immun. 61, 2486-92
- SCHEUTZ, F. und ROWE, B. (1994)
Putative new O and H antigens among VTEC: an offer you cannot refuse !
EVC (European VTEC Club) News 1
- SCHMIDT H., MONTAG, M., BOCKEMÜHL, J., HEESEMANN, J., KARCH, H. (1993)
Shiga-Like Toxin II-Related cytotoxins in *Citrobacter freundii* Strains from Humans and Beef Samples
Infect. Immunity 61, 534-543
- SCHMIDT, H., RÜSSMANN, H., SCHWARZKOPF, A., ALEKSIC, S., HEESEMANN, J., KARCH, H. (1994)
Prevalence of attaching and effacing *Escherichia coli* in stool samples from patients and controls
Zbl. Bakt. 281, 201-213
- SCHMIDT, H., BEUTIN, L., KARCH, H. (1995)
Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933
Infect. Immun. 63, 1055-1061
- SCHMIDT, H. und KARCH, H. (1996)
Enterohemolytic Phenotypes and Genotypes of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O111 strains from Patients with Diarrhea and Hemolytic-Uremic Syndrome
J. Clin. Microbiol. 34, 2364-2367
- SCHMIDT, H., SCHEEF, J., JANETZKI-MITTMANN, C., DATZ, C., KARCH, H. (1997)
An *ile* X tRNA gene is located close to the Shiga toxin II operon in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 and non-O157 strains
FEMS Microbiol. Lett. 149, 39-44
- SCHMIDT H., GEITZ, C., TARR, P.I., FROSCH, M., KARCH, H. (1999)
Non-O157.H7 pathogenic Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: phenotypic and genetic profiling of virulence traits and evidence for clonality
J. Infect. Dis. 179, 115-123

SCHMIDT H., SCHEEF, J., MORABITO, S., CAPRIOLI, A., WIELER, L. H., KARCH H. (2000)

A new Shiga-Toxin 2 variant (Stx2f) from *Escherichia coli* isolated from Pigeons
App. Env. Microbiol. 66, 1205-1208

SCHMITT, C.K., McKEE, M.L., O'BRIEN, A.D. (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

SCHOUTEN, J.M., Van de GIESSEN, A.W., FRANKENA, K., DE JONG, M.C., GRAAT, E.A. (2005a)

Escherichia coli O157 prevalence in Dutch poultry, pig finishing and veal herds and risk factors in Dutch veal herds
Prev. Vet. Med. 70, 1-15

SCHOUTEN, J.M., GRAAT, E.A., FRANKENA, K., Van de GIESSEN, A.W., Van der ZWALUW, W.K., DE JONG, M.C., (2005b)

A longitudinal study of *Escherichia coli* O157 in cattle of a Dutch dairy farm and in the farm environment
Vet. Microbiol. 107, 193-204

SCHUY, C. und BÜLTE, M. (1997)

Vergleichende Untersuchungen zur Einsatzfähigkeit von kommerziell erhältlichen *E. coli*-Verotoxin-Nachweissystemen
Proc. 38. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene, Garmisch-Partenkirchen, Eigenverlag der Dtsch. Vet. Med. Ges. (DVG), Gießen, 567-573

SCOTLAND, S.M., WILLSHAW, G.A., SMITH, H.R., ROWE, B. (1987)

Properties of strains of *Escherichia coli* belonging to serotypes O157:H7 with special reference to production of Vero cytotoxins VT1 and VT2
Epidemiol. Infect. 99, 613-624

SCOTT, L., McGEE, P., SHERIDAN, J.J., EARLEY, B., LEONARD, N. (2006)

Comparison of the survival in feces and water of *Escherichia coli* O157:H7 grown under laboratory conditions or obtained from cattle feces
Food Prot. 69, 6-11

SEMANCHECK, J.J. und GOLDEN, D.A. (1998)

Influence of growth temperature on inactivation and injury of *Escherichia coli* O157:H7 by heat, acid and freezing
J. Food Prot. 61, 395-401

SERNOWSKI, L.P. und INGHAM, S.C. (1992)

Low specificity of the HEC O157TM ELISA in screening ground beef for *Escherichia coli* O157:H7
J. Food Prot. 55, 545-547

SHENG, H., DAVIS, M.A., KNECHT, H.J., HANCOCK, D.D., Van DONKERSGOED, J., HOVDE, C.J. (2005)

Characterization of a shiga toxin-, intimin-, and enterotoxin hemolysin-producing *Escherichia coli* O157:H25 strain commonly isolated from healthy cattle
J. Clin. Microbiol. 43, 3213-20

- SHERMANN, P., SONI, R., KARMALI, M. (1988)
Attaching and effacing adherence of Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* to rabbit intestinal epithelium in vivo
Infect. Immun. 56, 756-761
- SILK, T.M. und DONNELLY, C.W. (1997)
Increased detection of acid-injured *Escherichia coli* O157:H7 in autoclaved apple cider by using nonselective repair on trypticase soy agar
J. Food Prot. 60, 1483-1486
- SMITH, H.W. und HALLS, S. (1967)
Studies on *Escherichia coli* enterotoxin
J. Path. Bact. 90, 531-543
- SMITH, H.W., GREEN, P., PARSELL, Z. (1983)
Vero cell toxins in *Escherichia coli* and related bacteria: transfer by phage and conjugation and toxic action in laboratory animals, chickens and pigs
J. Gen. Microbiol. 129, 3121-3137
- SMITH, H.R., CHEASTY, T., ROBERTS, D., THOMAS, A., ROWE, B. (1991)
Examination of retail chickens and sausages in Britain for verocytotoxin-producing *Escherichia coli*
Environ. Microbiol. 57, 2091-2093
- SONNTAG, A.K., PRAGER, R., BIELASZEWSKA, M., ZHANG, W., FRUTH, A., TSCHAPE, H., KARCH, H. (2004)
Phenotypic and genotypic analyses of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O145 strains from patients in Germany
J. Clin. Microbiol. 42, 954-62
- SPIKA, J.S., PEARSONS, J.E., NORDENBERG, D., WELLS, J.G., GUNN, R.A., BLAKE, P.A. (1986)
Hemolytic uremic syndrome and diarrhoe associated with *Escherichia coli* O157:H7 in a day care center
J. Pediatr. 109, 287-291
- SPINA, N., ZANSKY, S., DUMAS, N., KONDRACKI, S (2005)
Four laboratory-associated cases of infection with *Escherichia coli* O157:H7
J. Clin. Microbiol. 43, 2938-9
- STAHL, A. und BÜLTE, M. (2000)
Enhancer zum verbesserten Nachweis von verotoxinbildenden *E. coli* (VTEC)
Proceed. 41. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene, Garmisch-Partenkirchen, Eigenverlag der Dtsch. Vet. Med. Ges. (DVG), Gießen, 412-415
- STEPHAN, R., RAGETTLI, S., UNTERMANN, F. (2000)
Prevalence and characteristics of verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) in stool samples from asymptomatic human carriers working in the meat processing industry in Switzerland
J. Appl. Microbiol. 88, 335-41
- STEWART, P.J., DESORMEAUX, W., CHENÉ, W., und J. (1983)
Hemorrhagic colitis in a home for the aged people - Ontario
Can. Dis. Week. Rep. 9, 29-32

- STRACHAN, N.J.C., DOYLE, M.P., KASUGA, F., ROTARIU, O., OGDEN, I.D (2005)
Dose response modelling of *Escherichia coli* O157 incorporating data from foodborne and environmental outbreaks
Intern. J. Food Microb. 103, 35-47
- STROCKBINE, N.A., MARQUES, L.R.M., NEWLAND, J.W., SMITH, H.W., HOLMES, R.K., O'BRIEN, A.D. (1986)
Two toxin-converting phages from *Escherichia coli* O157:H7 strain 933 encode antigenically distinct toxins similar biological activities
Infect. Immun. 53, 135-149
- STROCKBINE, N.A., JACKSON, M.P., SUNG, L.M., HOLMES, R.K., O'BRIEN, A.D. (1988)
Cloning and sequencing of the genes of Shiga toxin from *Shigella dysenteriae* type I
J. Bacteriol. 170, 1116-1122
- STROCKBINE, N. A., SOWERS, E., GREENE, K., HAYES, P., GRIFFIN, P., WELLS, J. (1997)
Characterization of shiga toxin-producing non-O157 *Escherichia coli* from the United States, 1983-1997
VTEC 97, 3rd Symposium, Abstrat 235, 67
- SWERDLOW, D.L., WOODRUFF, B.A., BRADY, R.C., GRIFFIN, P.M., TIPPEN, S., DONNELL, H.D.J., GELDREICH, E., PAYNE, B.J. (1992)
A waterborne outbreak in Missouri of *Escherichia coli* O157:H7 associated with bloody diarrhea and death
Ann. Int. Med. 117, 812-819
- SZABO, R.A., TODD, E.C.D., JEAN, A. (1986)
Method to Isolate *Escherichia coli* O157:H7 from food
J. Food Protect. 49, 768-772
- SZABO, R., TODD, E., MacKENZIE, J., PARRINGTON, L., ARMSTRONG, A. (1990)
Increased sensitivity of the rapid hydrophobic grid membrane filter enzyme-labeled antibody procedure for *Escherichia coli* O157 detection in foods and bovine feces.
Appl. Environ. Microbiol. 56, 3546-3549
- TARR, P.I., GORDON, C.A., WAYNE, L. (2005)
Shiga-toxing-producing *Escherichia coli* and heamolytic uraemic syndrome
Lancet 356, 1073-86
- TEUFEL, P., BARTELT, E., BRÄUNIG, J., ELLERBROEK, L., TELO, A., WICHMANN-SCHAUER, H., GALLIEN, P., RICHTER, H., KLIE, H., TIMM, M., PERLBERG, K.-W. (1998)
Nachweis von Verotoxin-produzierenden *E. Coli* (VTEC) in Rinderhackfleisch und Weichkäse
Bundesgesundheitsbl. Sonderheft Oktober, 31-36
- THOMPSON J.S., HODGE, D.S., BORCZYK, A.A. (1990)
Rapid biochemical test to identify verocytotoxin-positive strains of *Escherichia coli* serotype O157
J. Clin. Microbiol. 28, 2165-8

- THOMS, B. (1999)
Nachweis von verotoxinbildenden *Escherichia coli* in Rehfleisch
Archiv für Lebensmittelhygiene 50, 49-72
- THORPE, C.M. (2004)
Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection
Clin. Infect. Dis. 38, 1298-1303
- TIMM, M., KLIE, H., RICHTER, H., PERLBERG, K.W. (1996)
Eine Methode zur gezielten Isolierung Verotoxin-bildender *Escherichia coli*-Kolonien
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 109, 207-272
- TIMM, M., KLIE, H., RICHTER, H., GALLIEN, P., PERLBERG, K.-W., LEHMANN, S.,
PROTZ, D. (1998)
Verfahren zum qualitativen Nachweis von verotoxin-produzierenden *Escherichia coli*
(VTEC) in Lebensmitteln und Fäzes
Bundesgesundhbl. Sonderheft Oktober, 20-25
- TIMM, M., KLIE, H., RICHTER, H., GALLIEN, P., PERLBERG, K.-W., LEHMANN, S.,
PROTZ, D. (1999)
Detection and prevalence of verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) in raw sausage
Berl. Munch. Tierärztl. Wochenschr. 112, 385-9
- TISON, D.L. (1990)
Culture confirmation of *Escherichia coli* serotype O157:H7 by direct immunofluorescence.
J. Clin. Microbiol. 28, 612-613
- TODD, E.C.D, SZABO, R.A., DETERKIN, P., SHARPE, A.N., DARRINGTON, L.,
BUNDLE, L., GIDNEY, M.A.J., BERRY, M.B. (1988)
Rapid hydrophobic grid membrane filter- enzyme- labeled antibody procedure for
identification and enumeration of *Escherichia coli*
Appl. Environ. Microbiol. 54, 2536-2540
- TRUMPF, T. (1990)
Versuche zur Isolierung, Charakterisierung und Abgrenzung verotoxinogener *Escherichia coli*
(VTEC) von anderen *E. Coli*-Populationen aus der Darmflora von Rindern und die
Erfassung von VTEC-Stämmen des Serovars O157:H7 aus Hackfleisch in
Modellversuchen
Vet. Med. Diss., FU Berlin
- TSCHÄPE, H. und BÖHME, G. (1990)
Die hämorrhagische Colitis und das hämolytisch-urämische Syndrom - *E. coli* als
ätiologisches Agens
Kinderärztl. Praxis 59, 161-165, 200-205
- TSCHÄPE, H., PRAGER, R., STRECKEL, W., FRUTH, A., TIETZE, E., BÖHME, G.
(1995)
Verotoxinogenic *Citrobacter freundii* associated with severe gastroenteritis and cases of
haemolytic uraemic syndrome in a nursery school: green butter as the infection source
Epidemiol. Infect. 114, 441-450

- TUTTLE, J., GOMEZ, T., DOYLE, M.P., WELLS, J.G., ZHAO, T., TAUXE, R.V., u. P. M. GRIFFIN (1999)
Lessons from a large outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections: insights into the infectious dose and method of widespread contamination of hamburger patties
Epidemiol. Infect. 122, 185-92
- TYLER, S.D., JOHNSON, W., LIOR, H., WANG, G., ROZEE, K. (1991)
Identification for verotoxin type 2 variant B subunit genes in *Escherichia coli* by the polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis.
J. Clin. Microbiol. 29, 1339-43
- ULINSKI, T., LERVAT, C., RANCHIN, B., GILLET, Y., FLORET, D., COHAT, P. (2005)
Neonatal hemolytic uremic syndrome after mother-to-child transmission of *Escherichia coli* O157
Pediatr. Nephrol. 20, 1334-5
- UPTON, P. und COIA, J. E. (1994)
Outbreak of *Escherichia coli* O157 infection associated with pasteurized milk supply
Lancet 344, 1015
- UYTTENDAELE, M., GRANGETTE, C., ROGERIE, F., PASTEAU, S., DEBEVERE, J., LANGE, M. (1998)
Influence of cold stress on the preliminary enrichment time needed for detection of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in ground beef by PCR
Appl. Environ. Microbiol. 64, 1640-1643
- Van AMERONGEN, A., WICHERS, J.H., BERENDSEN, L.B., TIMMERMANS, A.J., KEIZER, G.D., Van DOORN, A.W., BANTJES, A., Van GELDER, W.M. (1993)
Colloidal carbon particles as a new label for rapid immunochemical test methode: quantitative computer image analysis of results
J. Biotechnol. 30, 185-195
- VANDERLINDE, P.B., SHAY, B., MURRAY, J. (1998)
Microbiological quality of Australian beef carcass meat and frozen bulk packed beef
J. Food Prot. 61, 437-43
- VANDERLINDE, P.B., SHAY, B., MURRAY, J. (1999)
Microbiological status of Australian sheep meat
J. Food Prot. 62, 380-5
- VERNOZY-ROZAND, C. (1997)
A review: Detection of *Escherichia coli* O157:H7 and other verotoxin-producing *E.coli* (VTEC) in food
J. Appl. Microbiol. 82, 537-551
- VERNOZY-ROZAND, C., MAZUY, C., RAY-GUENIOT, S., BOUTRAND-LOEI, S., MEYRAND, A. u. RICHARD, Y. (1998)
Evaluation of the VIDAS methodology for detection of *Escherichia coli* O157 in food samples
J. Food Prot. 61, 917-920

- VOLD, L., HOLCK, A., WASTESON, Y., NISSEN, H. (2000)
High levels of background flora inhibits growth of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef
Int. J. Food Microbiol. 56, 219-225
- VUDDHAKUL, V., PATARARUNGRONG, N., PUNGRASAMEE, P., JITSURONG, S., MORIGAKI, T., ASA, I. N., NISHIBUCHI, M. (2000)
Isolation and characterization of *Escherichia coli* O157 from retail beef and bovine feces in Thailand
FEMS Microbiol. Lett. 182, 343-7
- WACHSMUTH, I.K., KIEHLBAUCH, J.A., BOPP, C.A, CAMERON, D.N., STROCKBINE, N.A., WELLS, J.G., BLAKE, P.A. (1991)
The use of plasmid profiles and nucleic acid probes in epidemiologic investigation of foodborne, diarrheal disease
Int. J. Food Microbiol. 12, 77-90
- WADDEL, T.S., HEAD, S., PETRIC, M., COHEN, A., LINGWOOD, C. (1988)
Globotriosyl ceramide is specially recognized by the *Escherichia coli* verocytotoxin 2
Biochem. Biophys. Res. Commun. 152, 674-679
- WANG, J., YANG, R., GUO, Z., QIU, M. (2001)
Rapid detection of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in food with multiplex PCR assay
Wei Sheng Yan Jiu 30, 310-2
- WEAGANT, S.D., BRYANT, J.L, JINNEMAN, K.G. (1995)
An improved rapid technique for isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from foods
J. Food Prot. 58, 7-12
- WEINSTEIN, D.L., JACKSON, M.P., SAMUEL, J.E., HOLMES, R.K., O'BRIEN, A.D. (1988)
Cloning and sequencing of a Shiga-like toxin type II variant from an *Escherichia coli* strain responsible for edema disease of swine
J. Bacteriol. 170, 4223-4230
- WELINDER-OLSSON, C., STENQVIST, K., BADENFORS, M., BRANDBERG, A., FLOREN, K., HOLM, M., HOLMBERG, L., KJELLIN, E., MARILD, S., STUFAHL, A., KAIJSER, B. (2004)
EHEC outbreak among staff at a children's hospital- use of PCR for verocytotoxin detection and PFGE for epidemiological investigation
Epidem. Infect. 132, 43-49
- WELLS, J.G., SHIPMAN, L.D., GREENE, K.D., SOWERS, E.G., GREEN, J.H., CAMERON, D.N., DOWNES, F.P., MARTIN, M.L., GRIFFIN, P.M., OSTROFF, S.M., POTTER, M.E., TAUXE, R.V., WACHSMUTH, I.K. (1991)
Isolation of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and other shiga-like-toxin-producing *E.coli* from dairy cattle
J. Clin. Microbiol. 29, 985-989
- WELSH, J. und MacCLELLAND, M. (1990)
Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers
Nucl. Acids Res. 18, 7213-7218

- WERBER, D., FRUTH, A., LIESEGANG, A., LITTMANN, M., BUCHHOLZ, U., PRAGER, R., KARCH, H., BREUER, T., TSCHÄPE, H., AMMON, A. (2002)
A multistate outbreak of Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* O26:H111 infections in Germany, detected by molecular subtyping surveillance
J. Inf. Dis. 186, 419-422
- WHITTAM, T.S, WOLFE, M.L., WACHSMUTH, I.K., ÖRSKOV, F., ÖRSKOV, I., WILSON, R.A. (1993)
Clonal Relationships among *Escherichia coli* Strains that cause Hemorrhagic colitis and Infantile Diarrhea.
Inf. and Imm. 16, 1619-1629
- WHO (1994)
Working group meeting on „Shiga-like“ toxin producing *E. coli* with emphasis on zoonotic aspects
WHO/CDS/VPH 94.136, Bergamo,Italy (1 July 1994)
- WHO (1995)
Report of the WHO Consultation on selected emerging food borne diseases.
WHO/CDS/VPH 95. 142, Berlin, Germany (20-24 March 1995)
- WIELER, L.H., VIELER, E., ERPENSTEIN, C., SCHLAPP, T., STEINRÜCK, H., BAUERFEIND, R., BYOMI, A., BALJER, G. (1996)
Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from bovines: association of adhesion with carriage of eae and other genes
J. Clin. Microbiol. 34, 2980-4
- WILKS, S.A., MICHELS, H., KEEVIL, C.W. (2007)
The survival of *Escherichia coli* O157 on a range of metal surfaces
Int.J.Food Microbio. 105, 445-54
- WILLIAMS, R.C., ISAACS, S., DECOU, M.L., RICHARDSON, E.A., BUFFETT, M.C., SLINGER, R.W., BRODSKY, M. H., CIEBIN, B.W., ELLIS, A., HOCKIN, J. (2000)
Illness outbreak associated with *Escherichia coli* O157:H7 in genoa salami. *E. Coli* working group
CMAJ 162, 1409-13
- WILLSHAW G.A., THIRWELL, J., JONES, A.P., PERRY, S., SALMON, R.L., HICKEY, M. (1994)
Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in beefburgers linked to an outbreak of diarrhoea, haemorrhagic colitis and haemolytic uraemic syndrome in Britain.
Lettre in Applied Microbiology 19, 304-307
- WILLSHAW G.A., CHEASTY, T., SMITH, H.R., O'BRIEN, S.J., ADAK, G.K. (2001)
Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) O157 and other VTEC from human infections in England and Wales: 1995-1998
J. Med. Microbiol. 50, 135-142
- WILSON, J. B., McEWEN, S.A., CLARKE, R.C., LESLIE, K.E., WILSON, R.A., WALTER-TOEWS, D., GYLES, C.L. (1992)
Distribution and characteristics of verocytotoxigenic *Escherichia coli* isolated from Ontario dairy cattle
Epidemiol. Infect. 108, 423-439

- WONG, C.S., JELACIC, S., HABEEB, R.L., WATKINS, R.L., TARR, P.I. (2000)
The risk of the hemolytic-uremic syndrome after antibiotic treatment of *Escherichia coli* O157:H7 infections
N. Engl. J. Med. 342, 23-32
- WOODY, J.M., STEVENSON, J.A., WILSON, R.A., KNABEL, S.J. (1998)
Comparison of the Difco EZ Coli™ Rapid Detection System and Petrifilm™ Test Kit-HEC for detection of *Escherichia coli* O157:H7 in fresh and frozen ground beef
J. Food Prot. 61, 110-112
- YOUNTS-DAHL, S.M., OSBORN, G.D., GALYEAN, M.L., RIVERA, J.D., LONERAGAN, G.H., BRASHEARS, M.M (2005)
Reduction of *Escherichia coli* O157 in finishing beef cattle by various doses of *Lactobacillus acidophilus* in direct-fed microbials
J. Food Prot. 68, 6-10
- YUK, H.G. und MARSHALL, D.L. (2006)
Effect of trisodium phosphate adaptation on changes in membrane lipid composition, verotoxin secretion, and acid resistance of *Escherichia coli* O157:H7 in simulated gastric fluid
Intern. J. Food Microbiol. 106, 39-44
- ZADIK, P.M., CHAPMAN, P.A., SIDDON, C.A. (1993)
Use of tellurite for the selection of verocytotoxinogenic *Escherichia coli* O157.
Med. Microbiol. 39, 155-158
- ZHANG, W.L., BIELASZEWSKA, M., KUCZIUS, T., KARCH, H. (2002)
Identification, characterization and distribution of a Shiga toxin 1 gene variant (Stx(1c)) in *Escherichia coli* strains isolated from humans.
J. Clin. Microbiol. 40, 1441-1446
- ZHU, C., FENG, S., THATE, T.E., KAPER, J.B., BOEDEKER, E.C. (2005a)
Towards a vaccine for attaching/effacing *Escherichia coli*: a LEE encoded regulator (Ier) mutant of rabbit enteropathogenic *Escherichia coli* is attenuated, immunogenic, and protects rabbits from lethal challenge with the wild-type virulent strain
Vaccine, p S0264-410X
- ZHU, P., SHELTON, D.R., KARNS, J.S., SUNDARAM, A., LI, S., AMSTUTZ, P., TANG, C.M. (2005b)
Detection of water-borne *E. coli* O157 using the integrating waveguide biosensor
Biosens Bioelectron 21, 678-83
- ZSCHÖCK, M., HAMANN, H.P., KLOPPERT, B., WOLTER, W. (2000)
Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* in faeces of healthy dairy cows, sheep and goats: prevalence and virulence properties
Letters Appl. Microbiol. 31, 203-208
- ZWEIFEL, C., BLANCO, J.E., BLANCO, M., BLANCO, J., STEPHAN, R. (2004)
Serotypes and virulence genes of ovine non-O157 shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Switzerland
Int. J. Food Microbiol. 95, 19-27

ZWEIFEL, C., SCHUMACHER, M., BLANCO, M., BLANCO, J.E., TASARA, T., BLANCO, J., STEPHAN, R. (2005)
Phenotypic and genotypic characteristics of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) from swiss cattle
Vet. Microbiol. 105, 37-45

GESETZE und RICHTLINIEN

ASU (Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren) nach § 64 LFGB
(Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch)

L 00.00-68 (DIN EN ISO 16654) - Nachweis, Isolierung und Charakterisierung *E. coli* O157 in Lebensmitteln (DIN: + Futtermitteln) (2002)

L 03.00-1 – Vorbereitung der Proben für mikrobiologische Untersuchungen;
Verfahren für Käse (2002)

L 06.00-44 (DIN 10167) – Ergänzung zu DIN 16654 - Nachweis, Isolierung und Charakterisierung *E. coli* O157 in Fleisch und Fleischerzeugnissen, Wurstwaren (2004)

L 07.18-1 – Nachweis, Isolierung und Charakterisierung Verotoxin-bildender *Escherichia coli* (VTEC) in Hackfleisch mittels PCR und DNA-Hybridisierungstechnik (2002)

CODEX ALIMENTARIUS (1998)

Draft principles and guidelines for the conduct of microbiological risk assessment (At step 8 of the procedure)

Joint FAO/WHO Standards Programme, codex Committee on Food Hygiene, 31st Session, Olando, USA, 26.-30.10.1998, ALINORM 99/13, Appendix III 1-8

DIN 10110 (Deutsches Institut für Normung) (1994)

Microbiological analysis of meat and meat products; determination of *E. coli*; fluorescence optical colony count method using membranes; spatula method (Reference method)

DIN, Beuth Verlag Berlin

DIN 10183 (Deutsches Institut für Normung) (1992)

Microbiological analysis of milk; determination of *E. coli*; fluorescence optical method with parallel determination of coliforms

DIN, Beuth Verlag Berlin, Part 3

DIN EN ISO 16654 (2001)

Methode 16654: Microbiology of food and animal feeding stuffs – horizontal method for the detection of *Escherichia coli* O157

ISO, Schweiz

ISO 11866 (International Organisation for Standardisation) (2005)

Milk and milk products - Enumeration of presumptive *E. coli* – Part 1 : Most probable number technique using MUG

ISO, Schweiz

VO 2073/2005

Verordnung 2073/2005 der Kommission v. 15. Nov. 2005 über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel

Amstblatt der Europäischen Union 338, 1-26

9 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Bülte für die Überlassung des Themas, die stets gewährte Unterstützung und kritischen Ratschläge, sowie die damit verbundene Zeit, die er mir somit bei dieser Arbeit gewidmet hat.

Ganz herzlichen Dank an allen, die mir bei den Korrekturen sehr hilfreich waren.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern und meinem Mann, die mich bedingungslos unterstützt haben und auf meine vier Kinder aufgepasst haben.

Merci à tous de m'avoir aidée et encouragée pendant toutes ces années.



edition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFBENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5363-X



9