

Aus dem Zentralen Institut des Sanitätsdienstes
der Bundeswehr Kiel-Kronshagen
und
dem Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde
der Justus-Liebig-Universität Gießen

**Bewertung des Infektionsrisikos für den
Verpflegungsteilnehmer der Bundeswehr durch Verotoxin-
bildende *Escherichia coli* (VTEC) unter besonderer
Berücksichtigung streichfähiger und schnittfester Rohwürste**

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

Eingereicht von
ULRICH SCHOTTE

Gießen 2002

Aus dem Zentralen Institut des Sanitätsdienstes
der Bundeswehr Kiel-Kronshagen
und
dem Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: Prof. Dr. M. Bülte

**Bewertung des Infektionsrisikos für den
Verpflegungsteilnehmer der Bundeswehr durch Verotoxin-
bildende *Escherichia coli* (VTEC) unter besonderer
Berücksichtigung streichfähiger und schnittfester Rohwürste**

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

Eingereicht von
ULRICH SCHOTTE
Tierarzt aus Grevenkrug

Gießen 2002

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

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. B. Hoffmann

1. Berichterstatter: Prof. Dr. M. Bülte

2. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Baljer

Tag der mündlichen Prüfung: 28.10.02

Meiner Familie

INHALTSVERZEICHNIS

	<u>Seite</u>
1	EINLEITUNG
1	2
2	LITERATURÜBERSICHT
2.1	<i>Escherichia coli</i>
2.1	2
2.2	Gesundheitlich bedenkliche <i>E. coli</i>
2.2	3
2.2.1	Verotoxinogene <i>E. coli</i> (VTEC)
2.2.1	5
2.2.2	Enterohämorrhagische <i>E. coli</i> (EHEC)
2.2.2	10
2.2.2.1	Definition
2.2.2.1	10
2.2.2.2	Virulenzfaktoren und deren pathogenetische Eigenschaften
2.2.2.2	10
2.3	Bedeutung bei Lebensmittelinfektionen
2.3	17
2.3.1	Klinische Verlaufsformen einer Infektion beim Menschen
2.3.1	17
2.3.2	Sporadische Infektionen und Gruppenerkrankungen
2.3.2	18
2.3.3	Infektionswege
2.3.3	24
2.4	Epidemiologische Situation
2.4	27
2.4.1	Vorkommen bei Mensch und Tier
2.4.1	27
2.4.2	Vorkommen in Lebensmitteln
2.4.2	32
2.4.3	Mikrobiologie der Rohwürste unter besonderer Berücksichtigung verotoxinogener <i>E. coli</i> (VTEC)
2.4.3	35
2.5	Amtliche Lebensmittelüberwachung in der Bundeswehr
2.5	40
2.5.1	Zuständigkeit für die Lebensmittelüberwachung bei der Bundeswehr
2.5.1	40
2.5.2	Anforderungen an Lieferbetriebe der Bundeswehr sowie Betriebsstrukturen und Produktionsprozesse in Verpflegungseinrichtungen der Bundeswehr
2.5.2	41
2.5.3	Lebensmittelhygiene in Einrichtungen zur Gemeinschaftsverpflegung bei der Bundeswehr
2.5.3	42
2.6	Nachweismethoden für VTEC und EHEC
2.6	44
2.6.1	Phänotypische Nachweismethoden
2.6.1	44
2.6.1.1	Zelltests
2.6.1.1	45
2.6.1.2	Kulturelle Verfahren
2.6.1.2	46

2.6.1.3	Immunoassays	49
2.6.1.4	Immunomagnetische Separation	60
2.6.2	Genotypische Nachweisverfahren	65
2.6.2.1	DNA-Sonden-Technik	65
2.6.2.2	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	67
2.7	Subtypisierung / Feintypisierung	74
2.7.1	Phänotypische Tests	75
2.7.1.1	Serotypisierung	75
2.7.1.2	Phagentypisierung / Lysotypie	77
2.7.1.3	Biotypisierung	78
2.7.1.4	VT-Phänotyp	78
2.7.2	Genotypische Differenzierungsverfahren	79
2.7.2.1	Plasmidtypisierung	79
2.7.2.2	Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)	81
2.7.2.3	Ribotypisierung und Modifikationen wie „Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis“ (RFLP)	83
2.7.2.4	Genotypisierung / Subtypisierung einzelner Gene	84
2.7.2.5	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Modifikationen wie „Random Amplified Polymorphic DNA“ (RAPD), „Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction“ (AP-PCR)	87
2.7.2.6	DNA-Sequenzanalysen	89
3	EIGENE UNTERSUCHUNGEN	90
3.1	Material	90
3.1.1	Referenz- und Sammlungsstämme	90
3.1.2	Gesamtprobenaufkommen und Anzahl der Verpflegungs- und Betreuungsteilnehmer	91
3.1.3	Probenmaterial	92
3.1.4	Nähr- und Testmedien	93
3.1.4.1	Flüssige Nährmedien	93
3.1.4.2	Feste Nähr- und Testmedien	93
3.1.5	Immunomagnetische Separation	94
3.1.6	Isolierung von VT 1- und VT 2-bildenden <i>E. coli</i> -Stämmen	95

3.1.7	Phänotypische Differenzierung	96
3.1.8	Genotypische Differenzierung	96
3.1.8.1	Primer für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	96
3.1.8.2	Medien zur Amplifizierung	98
3.1.8.3	Random Amplified Polymorphic DNA-Analyse (RAPD)	98
3.1.8.4	Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)	98
3.1.8.5	Medien zur Darstellung der Amplifikate	101
3.2	Methodik	102
3.2.1	Aufbewahrung und Anzüchtung von Referenz- und Sammlungsstämmen sowie Isolaten aus Feldproben	102
3.2.2	Einteilung der Lieferbetriebe	102
3.2.3	Sensorische Untersuchung	103
3.2.4	Mikrobiologische Untersuchungen auf <i>Enterobacteriaceae</i> , Hefen und <i>Salmonella</i> spp.	104
3.2.5	Nachweis von <i>E. coli</i> O157-Stämmen	104
3.2.5.1	Immunomagnetische Separation	105
3.2.5.2	Identifizierung und Bestätigung	106
3.2.6	Nachweis von verotoxinogenen <i>E. coli</i> -Stämmen	106
3.2.6.1	Screening mit Enzym-Immunoassay	107
3.2.6.2	Isolierung mit dem Immunoblot-Verfahren	107
3.2.7	Phänotypische Differenzierung der Isolate	109
3.2.7.1	Biochemische Differenzierung der Isolate	109
3.2.7.2	Serotypisierung	110
3.2.8	Genotypische Differenzierung der <i>E. coli</i> -Isolate	111
3.2.8.1	Aufbereitung der DNA	111
3.2.8.2	PCR-Ansatz und Cycloerbedingungen für die PCR	111
3.2.8.3	Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)	112
3.2.8.4	Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE)	112
3.2.9	Statistische Methoden	114
3.2.9.1	Berechnung des Stichprobenumfanges	114
3.2.9.2	Darstellung der Daten	114
3.2.9.3	Statistisch vergleichende Prüfung auf Zusammenhänge	114

3.2.9.4	Fragmentmuster nach Restriktionsverdau und Bandenmuster nach Amplifikation und Dendrogramm-Erstellung	115
3.3	Ergebnisse	117
3.3.1	Charakterisierung der Risikopopulation und lebensmittelbedingte Gruppenerkrankungen im Untersuchungszeitraum	117
3.3.2	Probenaufkommen	119
3.3.2.1	Stichprobenumfang	120
3.3.2.2	Struktur der Lieferbetriebe und Verteilung der Proben auf die Lieferbetriebe	124
3.3.2.3	Verteilung der Proben auf die Population	127
3.3.3	Erhebung des sensorischen und mikrobiologischen Status	130
3.3.3.1	Sensorische Untersuchung und Bestimmung des pH-Wertes	130
3.3.3.2	Mikrobiologische Untersuchungen auf <i>Enterobacteriaceae</i> , Hefen und <i>Salmonella</i> spp.	135
3.3.3.3	Einflußfaktoren auf den mikrobiologischen Status streichfähiger und schnittfester Rohwürste	140
3.3.4	Nachweis von VTEC in streichfähigen und schnittfesten Rohwürsten	142
3.3.4.1	Vorkommen	142
3.3.4.2	Einflußfaktoren auf die Nachweisrate von VTEC/EHEC	144
3.3.4.3	<i>E. coli</i> -Serovare mit verotoxinogenen Eigenschaften	145
3.3.4.4	„Fingerprinting“ der Isolate mittels RAPD-PCR und PFGE	146
4	DISKUSSION	152
5	SCHLUSSFOLGERUNGEN	168
6	ZUSAMMENFASSUNG	169
7	SUMMARY	171
8	ANHANG	173
9	LITERATURVERZEICHNIS	177

Übersicht relevanter bzw. häufig verwendeter Abkürzungen und Einheiten

A	<u>A</u> ustria (Österreich)
ae	<u>a</u> ttaching and <u>e</u> ffacing
Aqua dest.	<u>A</u> qua <u>d</u> estillata
AUS	<u>A</u> ustralia (Australien)
B	<u>B</u> elgium (Belgien)
bp	<u>b</u> ase <u>p</u> air
BRILA	<u>B</u> rillantgrün-Galle- <u>L</u> aktose-Bouillon
bzw.	<u>b</u> eziehungs <u>w</u> eise
ca.	<u>c</u> irca
CH	<u>C</u> onfoederatio <u>H</u> elvetia (Schweiz)
CND	<u>C</u> an <u>a</u> da
CT-SMAC	<u>C</u> efixim- <u>T</u> ellurit- <u>S</u> orbitol- <u>M</u> ac <u>C</u> onkey
d.h.	das <u>h</u> eißt
D	<u>D</u> eutschland
DIN	<u>D</u> eutsches <u>I</u> nsitut für <u>N</u> ormung
DNA	<u>D</u> esoxyribon <u>u</u> cleic <u>A</u> cid
etc.	<u>e</u> t <u>c</u> etera
evtl.	<u>e</u> vent <u>u</u> ell
E	<u>E</u> spana (Spanien)
eae	<u>E. coli</u> <u>a</u> ttaching and <u>e</u> ffacing (-Gen)
EaggEC	<u>E</u> ntero <u>a</u> ggregative <u>E. coli</u>
ECD	<u>E</u> scherichia <u>c</u> oli Direkt-Agar
<i>E. coli</i>	<u>E</u> scherichia <u>c</u> oli
EHEC	<u>E</u> ntero <u>h</u> ämorrhagische <u>E. coli</u>
<i>Ehly</i>	<u>E</u> HEC- <u>H</u> ämolysin (-Gen)
Ehly	<u>E</u> HEC- <u>H</u> ämolysin
EIA	<u>E</u> nzym <u>i</u> mmuno <u>a</u> ssay
EIEC	<u>E</u> ntero <u>i</u> nvasive <u>E. coli</u>
ELISA	<u>E</u> nzyme <u>L</u> inked <u>I</u> mmuno <u>s</u> orbent <u>A</u> ssay
EPEC	<u>E</u> ntero <u>p</u> athogene <u>E. coli</u>
ET	<u>E</u> gypt (Ägypten)
et al.	<u>e</u> t <u>a</u> lii
ETEC	<u>E</u> ntero <u>t</u> oxinogene <u>E. coli</u>
FC	<u>F</u> luoro <u>c</u> ult® <u>E. coli</u> O157-Agar
g	<u>G</u> ramm
GB	<u>G</u> reat <u>B</u> ritain (Großbritannien)
Gb ₃	<u>G</u> lob <u>o</u> tri <u>s</u> ylceramid
Gb ₄	<u>G</u> lob <u>o</u> tetra <u>s</u> ylceramid
h	<u>h</u> ora (Stunde/Stunden)
HC (-Agar)	<u>H</u> ämorrhagische <u>C</u> olitis- / <u>H</u> emorrhagic <u>C</u> olitis (-Agar)
HUS	<u>H</u> ämolytisch- <u>u</u> rämisches <u>S</u> yndrom
I	<u>I</u> taly (Italien)
i.d.R.	in <u>d</u> er <u>R</u> egel
IMS	<u>I</u> mmuno <u>m</u> agnetische <u>S</u> eparation
ISO	<u>I</u> nternational <u>O</u> rganization for <u>S</u> tandardization
JPN	<u>J</u> apan
kb	<u>k</u> ilob <u>a</u> se
KbE	<u>K</u> olonie- <u>b</u> ildende <u>E</u> inheit(en)
kDa	<u>K</u> ilo <u>D</u> alton
kg	<u>K</u> ilogramm
l	<u>L</u> iter

LD	letale <u>D</u> osis
LEE	<u>L</u> ocus of <u>E</u> nterocyte <u>E</u> ffacement
LMBG	<u>L</u> ebensmittel- und <u>B</u> edarfsgegenständegesetz
log	dekadischer <u>L</u> ogarithmus
MDa	<u>M</u> ega <u>D</u> alton
mEC + N	modifizierte <u>E</u> <i>scherichia coli</i> -Bouillon + <u>N</u> ovobiocin
mg	milligramm
min	<u>M</u> inute
ml	<u>M</u> illiliter
mmol	millimol
mTSB + N	modifizierte <u>T</u> rypton- <u>S</u> oja- <u>B</u> ouillon + <u>N</u> ovobiocin
MUG	4- <u>M</u> ethylumbiliferyl- β -D- <u>G</u> lucuronid
n	Stichprobenumfang
NaCl	<u>N</u> atrium <u>c</u> hlorid
NL	<u>N</u> etherlands (Holland)
nm	<u>N</u> anometer
OR	odds <u>r</u> atio
p	Wahrscheinlichkeit
PCR	<u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction (Polymerase-Kettenreaktion)
pg	<u>P</u> ikogramm
RKI	<u>R</u> obert <u>K</u> och <u>I</u> nstitut
S	<u>S</u> weden (Schweden)
SLT	<u>S</u> higa-like- <u>T</u> oxin
SLTEC	<u>S</u> higa-like- <u>T</u> oxin-bildende <u>E. coli</u>
SMAC	<u>S</u> orbitol- <u>M</u> ac <u>C</u> onkey-Agar
STEC	<u>S</u> higa- <u>T</u> oxin-bildende <u>E. coli</u>
Stx	<u>S</u> higa- <u>T</u> oxin
TSB	<u>T</u> ryptic- <u>S</u> oy- <u>B</u> roth (Trypton-Soja-Bouillon)
TTP	<u>T</u> hrombotisch <u>t</u> hrombocytopenische <u>P</u> urpura
U/min	<u>U</u> mdrehungen pro <u>M</u> inute
US/USA	<u>U</u> nited <u>S</u> tates (of <u>A</u> merica)
UV	ultraviolett
VRBD	<u>V</u> iolet- <u>R</u> ed- <u>B</u> ile- <u>D</u> extrose-Agar
VT	<u>V</u> erotoxin
VT2e	<u>VT</u> 2 edema disease
VT2vh	<u>VT</u> 2 variant <u>h</u> uman
VT2vp	<u>VT</u> 2 variant <u>p</u> orcine
VTEC	<u>V</u> erotoxin-bildende (<u>V</u> erotoxinogene) <u>E. coli</u>
X	Median
X _{max}	<u>M</u> aximum/Maximalwert
X _{min}	<u>M</u> inimum/Minmalwert
z. B.	zum <u>B</u> eispiel
μl	<u>M</u> ikroliter
°C	<u>G</u> rad <u>C</u> elsius
%	Prozent
§	Paragraph
>	größer als
≥	größer als oder gleich
<	kleiner als
≤	kleiner als oder gleich

1 EINLEITUNG

Seit 1982 wurden zunehmend Infektionen durch enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC) beobachtet. Das Serovar *E. coli* O157:H7 gilt als Prototyp dieser Pathogruppe, dessen erste Beschreibung im Zusammenhang mit einem größeren Ausbruch nach Verzehr von „Hamburgern“ einer „Fast-Food“-Kette in den Vereinigten Staaten von Amerika erfolgte. In den folgenden Jahren wurden, insbesondere in Deutschland, zunehmend Infektionen auch mit anderen Serovaren beschrieben. Der Anteil des „klassischen“ Serovars wurde bei enteritischen Krankheitsverläufen geringer. Beim „Hämolytisch-urämischem Syndrom“, der schwersten Verlaufsform einer EHEC-Infektion, spielt jedoch nach wie vor das Serovar O157 die dominierende Rolle.

Weltweit konnten Rinder als wichtigstes Erregerreservoir dieser Zoonose identifiziert werden. Fleisch und Fleischerzeugnisse aus Rindfleisch stellen eine der Hauptinfektionsquellen dar, insbesondere wenn sie roh oder unzureichend durchgegart verzehrt werden. Daneben traten auch Erkrankungen durch den Verzehr von Rohmilch und Rohmilcherzeugnissen aber auch kontaminierter pflanzlicher Lebensmittel, kontaminierten Trinkwassers oder durch Schmierinfektionen nach Tierkontakt oder ausgehend von Menschen als Ausscheider auf.

In der Vergangenheit wurde eine Vielzahl phänotypischer und genotypischer Nachweisverfahren für die Gruppe der verotoxinogenen *E. coli* (VTEC) entwickelt. Ziel der vorliegenden Untersuchungen war es, mit Hilfe eines immunologischen sowie eines kulturellen Verfahrens solche Stämme aus Risikolebensmitteln zu erfassen. Die Isolierung eines Stammes ist hierbei wesentlich für die Bestimmung des konkreten Virulenzprofils, auf dessen Basis eine Einschätzung der gesundheitlichen Bedenklichkeit erfolgen kann.

In den eigenen Untersuchungen sollte auf Grundlage der spezifischen Voraussetzungen für das Inverkehrbringen von Lebensmitteln bei der Bundeswehr das Infektionsrisiko für den Verpflegungsteilnehmer bewertet werden. Hierzu wurden streichfähige und schnittfeste Rohwürste aus Verpflegungseinrichtungen der Bundeswehr mit Hilfe standardisierter Untersuchungsverfahren auf das Vorkommen von VTEC untersucht. Die Charakterisierung der Isolate erfolgte hinsichtlich ihrer Virulenzfaktoren sowie mit Hilfe molekularbiologischer „Fingerprint“-Techniken.

2 LITERATURÜBERSICHT

2.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli (*E. coli*) sind GRAM-negative, fakultativ anaerobe, sporenlose mesophile und stäbchenförmige Bakterien, die eine Größe (Breite x Länge) von 1-1,5 µm x 2-6 µm haben. Sie gehören zur Familie der *Enterobacteriaceae*, sind meist beweglich. Die meisten Stämme bilden eine Kapsel aus.

E. coli wurde erstmals von Dr. Theodor ESCHERICH im Jahre 1885 aus dem Stuhl menschlicher Säuglinge isoliert. *E. coli* ist der wichtigste Vertreter der Gattung *Escherichia*, wobei zusätzlich die Spezies *E. blattae*, *E. fergusonii*, *E. hermanii* und *E. vulneris* beschrieben wurden. Die genannten Spezies lassen sich biochemisch voneinander unterscheiden. Eine Differenzierung innerhalb der Spezies *E. coli* erfolgt mit Hilfe der Oberflächen- (O-), Kapsel- (K-) und Geißel- (H-) Antigene. Derzeit sind etwa 173 O-, 72 H- und 90 K-Antigene bekannt. Die Serotypisierung geht auf F. Kauffmann (KAUFFMANN, 1966) zurück und wird laufend weiter entwickelt, um neue bisher nicht-typisierbare Stämme einordnen zu können.

E. coli gehört zur Normalflora des hinteren Dünndarms und des Dickdarms von Mensch und Tier. Eine Ausnahme bilden Meerschweinchen und Chinchilla. Mit etwa 1 % der normalen Dickdarmflora und 10^5 bis 10^9 KbE/g Stuhl bzw. Kot bildet *E. coli* gemeinsam mit den Enterokokken die Begleitflora (SELBITZ, 2002).

In der Regel treten *E. coli*-Stämme als Kommensalen im Dickdarm auf, jedoch können einige pathogene Stämme sowohl beim Menschen als auch beim Tier Erkrankungen hervorrufen. Enteropathien sowie Enterotoxämien mit Septikämien stehen hierbei im Vordergrund. Einige dieser pathogenen Stämme haben besondere Bedeutung als Zoonose-Erreger erlangt.

Durch seine ubiquitäre Verbreitung wird *E. coli* neben den coliformen Keimen als Indikatorkeim für die fäkale Kontamination von Trinkwasser aber auch Lebensmitteln herangezogen. Der klassische Nachweis erfolgt durch Laktose-Fermentation bei 44-45°C unter Bildung von Säure und Gas, sowie Indol-Bildung bei fehlender Citrat-Verwertung. In der Lebensmittelhygiene haben sich seit einigen Jahren Schnellmethoden durchgesetzt, wobei insbesondere der Nachweis der β -Glucuronidase-Aktivität eine Rolle spielt, die *E. coli*-Stämme zu etwa 94-96% besitzen. Die Glucuronidase-Aktivität wird über fluorogene (BÜLTE und REUTER, 1989; FENG

und HARTMAN, 1982) als auch mit Hilfe chromogener Medien (THOMPSON et al., 1990) nachgewiesen.

2.2 Gesundheitlich bedenkliche *E. coli*

Neben den apathogenen *E. coli* existieren Varianten mit pathogenen Eigenschaften für Menschen und Tiere. Die Virulenzfaktoren werden durch horizontalen Gentransfer übertragen, wobei einzelne Serovare bei den einzelnen Pathovaren vorzuherrschen scheinen. Eine eindeutige Zuordnung der Serovare zu den Pathovaren lässt sich jedoch nicht vornehmen. In Tabelle 1 sind die derzeit bekannten sieben Pathovare von *E. coli* aufgelistet.

Tabelle 1 Nomenklatur und Einteilung von pathogenen *E. coli*-Stämme (ANONYMUS, 1996a; LEVINE, 1987)

Gruppe	Unterteilung	Virulenzeigenschaften	Erkrankung
<u>E</u> nteropathogene <i>E. coli</i> (EPEC)	Class I, Class II	Adhäsion, Zytotoxine	Säuglingsdiarrhoe
<u>E</u> nterotoxinogene <i>E. coli</i> (ETEC)	LT ⁺ -Stämme, ST ⁺ -Stämme ⁴	Enterotoxine, Haftungsfähigkeit	Reisediarrhoe, Säuglingsdiarrhoe
<u>E</u> ntero <u>i</u> nvasive <i>E. coli</i> (EIEC)		Invasivität kodierendes Virulenzplasmid	ruhrähnliche Erkrankung
Verotoxinogene <i>E. coli</i> (VTEC)	„low/trace/high level toxin producer“	Verotoxine; (Enterohämolysin)	
<u>E</u> ntero <u>h</u> ämorrhagische <i>E. coli</i> (EHEC)		Verotoxine, Haftungsfähigkeit, Enterohämolysin, Virulenzplasmid, (Enterotoxin)	Diarrhoe, HC ¹ , HUS ² , TTP ³
<u>E</u> ntero <u>a</u> ggregative <i>E. coli</i> (EAaggEC)		Enterotoxine, Haftungsfähigkeit	Diarrhöe
<u>D</u> iffus <u>a</u> dhärente <i>E. coli</i> (DAEC)		Adhäsion	(infantile Diarrhoe)

¹ Hämorrhagische Colitis ² Hämolytisch-urämisches Syndrom ³ Thrombotisch-thrombocytopenische Purpura ⁴ hitzelabiles/-stabiles Toxin

Enteropathogene *E. coli* (EPEC) weisen als wesentlichen Virulenzfaktor eine chromosomal kodierte Adhärenz an Enterozyten des Dünndarms auf. Als weitere Virulenzfaktoren wurden ein Plasmid-kodiertes, etwa 94 kDa großes Membranprotein,

der EPEC Adhärenz-Faktor (EAF), sowie ein hitzestabiles Enterotoxin (EAST 1) beschrieben. EPEC werden in die, Class I-(EAF positiv) und Class II-(EAF negativ) Untergruppen eingeteilt. Die chromosomal kodierte Adhärenz ist charakterisiert durch die Expression eines membranständigen Intimins, sowie die Exkretion des „translocated intimin receptors (Tir)“ wodurch es, neben anderen weiteren Faktoren, nach Polymerisation des Actins der Eukaryontenzelle zur Ausbildung der „attaching and effacing lesions“ kommt. In der Folge kommt es unter Fieber und Erbrechen zur schleimigen Diarrhoe, jedoch ohne Blutbeimengungen. Zumeist sind Kleinkinder und Säuglinge befallen, wobei sich der Krankheitsverlauf auf bis zu 14 Tage erstrecken kann.

Als Virulenzfaktoren produzieren enterotoxinogene *E. coli* (ETEC) entweder ein hitzelabiles (choleraähnliches) Enterotoxin (LT^+) und/oder ein hitzestabiles Enterotoxin (ST^+). Beide Enterotoxine sind Plasmid-kodiert. Darüber hinaus weisen die klassischen ETEC-Serovare Plasmid-kodierte Fimbrien-assoziierte Kolonisationsfaktoren auf. Diese 6-7 nm im Durchmesser betragenden Fimbrien werden meist von dem gleichen Plasmid kodiert, das auch eines der Enterotoxine kodiert (LEVINE, 1987). Im Zuge einer Infektion kommt es nach Kolonisation des proximalen Dünndarms zur wässrigen Diarrhoe, Übelkeit, Bauchkrämpfen und leichter Erhöhung der Körpertemperatur. Als Infektionswege werden kontaminierte Lebensmittel einschließlich Wasser angegeben. Die epidemiologische Bedeutung ist in den sogenannten Entwicklungsländern groß, in Deutschland spielen ETEC-Infektionen im Rahmen der „Reisediarrhoe“ eine eher untergeordnete Rolle.

Enteroinvasive *E. coli* (EIEC) tragen ihre Virulenzfaktoren auf einem etwa 140 MDa großen Plasmid, das die Produktion verschiedener Membran-Proteine sowie die Invasivität kodiert. Bei einer Infektion kommt es zur Kolonisation mit anschließender Invasion in die Mukosa des Kolons. Die Infektion ist durch ein Ruhr-ähnliches Erkrankungsbild gekennzeichnet, wobei Dysenterie (wässriger Durchfall gefolgt von Schleim- und Blutbeimengungen), Fieber und Intoxikationserscheinungen im Vordergrund stehen. Epidemiologisch spielen EIEC-Stämme in Südostasien eine wesentliche Rolle, in Deutschland sind sie von untergeordneter Bedeutung.

Enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC) verdienen neben den vorstehend genannten drei Hauptgruppen enteropathogener *E. coli* als weitere Gruppe besondere Beachtung

(BÜLTE, 1995). Die EHEC als Untergruppe der verotoxinogenen *E. coli* (VTEC) werden ausführlich in den Kapiteln 2.2.1 und 2.2.2 beschrieben.

Enteroaggregative *E. coli* (EAggEC) führen über die Kolonisation des Dickdarms durch die Ausbildung verschiedener Fimbrien zu einer aggregativen Adhärenz. Es werden derzeit AAF/II und OMP als mögliche Adhäsionsfaktoren diskutiert. Darüber hinaus erfolgt die Bildung eines Zytotoxins sowie auch die Bildung des hitzestabilen Enterotoxins EAST1 (ähnlich dem der ETEC), welches jedoch auch mit anderen Pathovaren von *E. coli* assoziiert ist. Das Erkrankungsbild ist der einer EPEC-Infektion ähnlich (schleimige, nicht blutige Diarrhoe, z.T. Erbrechen). Vielfach werden EAggEC auch im Zusammenhang mit persistierenden Darmstörungen gefunden. Die Infektiosität für Kinder erscheint gesichert, die für Erwachsene wird derzeit diskutiert (LAW u. CHART, 1998).

Bei einer Infektion mit diffus adhärenenten *E. coli* (DAEC) kommt es ebenfalls zur Kolonisation des Dickdarms, wobei sie allerdings im Zusammenhang mit Durchfallerkrankungen derzeit von untergeordneter Bedeutung sind.

2.2.1 Verotoxinogene *E. coli* (VTEC)

Der Hauptvirulenzfaktor für VTEC ist ein Exotoxin mit der Bezeichnung Verotoxin (synonym Shiga-Toxin oder Shiga-like Toxin). Nach KARMALI (1989) sind alle *E. coli* als VTEC zu definieren, die in Kulturüberständen Verotoxin (VT) bilden. KONOWALCHUK et al. (1977) beschrieben als erste das Verotoxin, welches cytotoxisch auf Verozellen wirkt (Nierenzellen der grünen afrikanischen Meerkatze *Cercopithecus aethiops*). Neben den beiden Haupttypen VT 1 und VT 2 (SCOTLAND et al., 1985) bilden *E. coli*-Stämme, die die Ödemkrankheit bei Schweinen auslösen, eine porcine Variante des Verotoxins VT 2e (für „edema disease“ ehemals VT 2v; MARQUES et al., 1987). Mittlerweile wurden weitere Varianten des VT 2 beschrieben (vgl. Tabelle 2 und 3; CALDERWOOD et al. 1996; SCHMIDT et al., 2000). Die Verotoxine bestehen aus einer A-Untereinheit und 5 B-Untereinheiten. VT 1 ist antigenetisch sehr eng mit dem Shiga-Toxin von *Shigella dysenteriae* Typ 1 verwandt (O'BRIEN et al., 1983). Ähnliche Toxine werden auch von *Salmonella typhimurium*, *Vibrio parahaemolyticus* und *Vibrio cholerae* gebildet (DONOHUE-ROLFE et al., 1984). Die biologische Aktivität der Verotoxine unterscheidet sich nicht wesentlich

voneinander; jedoch wurden unterschiedliche Dosis-Wirkungs-Beziehungen in Zellkulturen und verschiedenen Tiermodellen beschrieben (s. Tabelle 2 und 3). Die biologische Wirkung von VT 1 läßt sich mit Hilfe von Antiseren gegen das Shiga Toxin von *Shigella dysenteriae* Typ 1 neutralisieren, VT 2 hingegen nicht (SCOTLAND et al., 1985). Eine weitere Differenzierung des VT 1 vom VT 2 ist durch den Einsatz monoklonaler Antikörper möglich (STROCKBINE et al., 1985; DONOHUE-ROLFE et al., 1989). Die Verotoxine sind phagenkodiert, ausgenommen das der porcinen Variante VT 2e. Die einzelnen Varianten des VT 2 unterscheiden sich untereinander wie auch gegenüber dem VT 1 in ihrer Aminosäure-Sequenz. VT 1 und das Shiga-Toxin unterscheiden sich lediglich durch eine Aminosäure in ihrer A-Untereinheit. Deshalb wurden diese beiden, genauso wie das VT 2 mit seinen Varianten zu jeweils einer Gruppe zusammengefaßt (MELTON-CELSA und O'BRIEN, 1988). PIÉRARD et al. (1998) unterschieden innerhalb der Gruppe der VT 2 weitere Untergruppen, wobei sie aufgrund der Homologien der Nukleinsäure-Sequenz VT 2 und VT 2c (dort als VT 2vh-a und VT 2vh-b bezeichnet) zu einer Untergruppe zählten und eine weitere Untergruppe aus drei Varianten des VT 2d bilden. VT 2e war nach ihren Untersuchungen ebenso wenig wie VT 1 einer der beiden Untergruppen zuzuordnen.

Tabelle 2 Eigenschaften der Shiga- und Verotoxine

Eigenschaft	Shiga-Toxin	VT 1	VT 2	VT 2c	VT 2d	VT 2e	VT 2f
Untereinheiten	1 A/5 B	1 A/5 B	1 A/5 B	1 A/5 B	1 A/5 B	1 A/5 B	1 A/5 B
Rezeptor	Gb ₃	Gb ₃	Gb ₃	Gb ₃	Gb ₃	Gb ₄	Gb ₃
Wirkung auf Wirtszelle	cytotoxisch durch Inhibition des Proteinstoffwechsels (N-Glykosidase-Aktivität auf Adenin der 28S rRNA)						
Toxinproduktion	chromosomal	phagenkodiert	phagenkodiert	phagenkodiert	phagenkodiert	chromosomal	phagenkodiert
Neutralisierbar durch Antiseren gegen							
Shiga-Toxin	+	+	-	-	-	-	-
VT 2	-	-	+	+	+	+	+
Cytotoxische Wirkung auf							
HeLa-Zellen	+	+	+	+	+	-	?
Verozellen	+	+	+	+	+	+	+
Y1-Zellen	-	-	-	-	-	+	-

Gb₃: Globotriaosyl-CeramidGb₄: Globotetraosyl-Ceramid

Tabelle 3 Vergleichende Darstellung der Verotoxine (MELTON-CELSA und O'BRIEN, 1998)

Toxin	nachgewiesen bei	Homologie der Aminosäure-Sequenz zu VT 2		spezifische Aktivität auf Verozellen/ mg Protein	LD ₅₀ bei Mäusen (Injektion i.p.) in ng	aktivierbar durch intestinalen Mucus	LD ₅₀ bei Streptomycin-behandelten CD-1 Mäusen in CFU
		A	B				
VT 1	<i>E. coli</i>	55	57	1×10^9	400	Nein	nicht virulent
VT 2	<i>E. coli</i> , <i>C. freundii</i>	100	100	$0,75 \times 10^9$ bis 5×10^9	0,5 bis 2	Nein	ca. 10^{10}
VT 2c	<i>E. coli</i>	100	97 ^a	n. b.	n. b.	Nein	ca. 10^{10}
VT 2d	<i>E. coli</i>	99	97 ^a	5×10^7	1 bis 5 aktiviert 0,5	Ja	≤ 10
VT 2e	<i>E. coli</i>	93	84	2×10^9	200	Nein	nicht virulent
VT 2f	<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	-

^a die B-Untereinheiten von VT 2c und VT 2d sind identisch

Die Menge des gebildeten Verotoxins ist unterschiedlich, so daß die Unterscheidung der einzelnen Stämme in „low-level“- „moderate/trace-level“- und „high-level“-Toxinproduzenten vorgenommen wurde (O'BRIEN et al., 1982). Im Zusammenhang mit Erkrankungen an HC, HUS oder TTP werden fast ausschließlich „high-level“-Toxinproduzenten nachgewiesen.

Die Bezeichnung der Verotoxine bzw. Shiga-like Toxine bzw. Stx variiert seit der ersten Beschreibung je nach Autor. O'BRIEN et al. wiesen 1982 die enge Verwandtschaft des VT 1 zum Shiga-Toxin durch die Neutralisierbarkeit der cytotoxischen Wirkung des VT 1 mit Hilfe eines für das Shiga Toxin spezifischen Antikörpers nach. Beide Toxine haben den gleichen isoelektrischen Punkt und die gleiche relative Hitzestabilität. Aufgrund der engen Verwandtschaft wurde daher die Bezeichnung Shiga-like Toxin (SLT) bzw. Shiga-like Toxin-bildende E. coli (SLTEC) eingeführt (O'BRIEN und HOLMES, 1987). Auch STROCKBINE et al. (1986) vertraten diese Auffassung, da eine Toxizität gegenüber Verozellen auch durch Toxine anderer Mikroorganismen besteht, was somit nicht die Bezeichnung VT bzw. VTEC rechtfertigt. Dieser Sachverhalt steht der in der ersten Beschreibung verwendeten Bezeichnung Verotoxin (VT) entgegen (KONOWALCHUK et al., 1977), die auch in der Folge von verschiedenen Autoren übernommen wurde (BLANCO et al., 1983; SCOTLAND et al., 1987; KARMALI, 1989). Es gibt neuerdings Bestrebungen, diese Gruppe der enteropathogenen *E. coli* als Shiga-Toxin bildende E. coli STEC zu bezeichnen. Die Toxine sollten demnach als Shiga-Toxine (Stx) bezeichnet werden. Da ein hoher Verwandtschaftsgrad zwischen den einzelnen Toxinen besteht, sei dies neben dem Gesichtspunkt der Vereinfachung der Nomenklatur nach Auffassung verschiedener Autoren gerechtfertigt (CALDERWOOD et al., 1996). Dem entgegen steht die Auffassung von KARMALI et al. (1996), die aus historischen Gründen und um keine weitere Verwirrung durch eine neue Bezeichnung zu stiften, die Bezeichnungen Verotoxin (VT) bzw. Shiga-like Toxin (SLT) beibehalten wollen. Dies stünde nicht den international vorgegebenen Regeln für die Bezeichnung von Toxinen entgegen. ACHESON et al. (1996) weisen schließlich darauf hin, daß beide Termini, Verotoxin (VT) und Shiga-like Toxin (SLT) bzw. Verotoxin-bildende E. coli (VTEC) und Shiga-like Toxin bildende E. coli (SLTEC) nebeneinander verwendet werden könnten.

In den folgenden Kapiteln werden die Begriffe Verotoxin (VT) und Verotoxin-bildende E. coli (VTEC) verwendet.

2.2.2 Enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC)

2.2.2.1 Definition

Der Terminus Enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC) wurde zum ersten Mal von LEVINE (1987) verwendet. Als Prototyp für dieser Pathogruppe wurde das Serovar O157:H7 beschrieben (KARMALI, 1989; GRIFFIN und TAUXE, 1991). Als weitere Serotypen innerhalb der Gruppe der EHEC werden mittlerweile O26:H11, O118:H⁻, O4:H⁻, O45:H2, O111:H⁻ und O145:H⁻ beschrieben.

Nach KARMALI (1989) gelten als EHEC diejenigen *E. coli*, die hinsichtlich Klinik, Epidemiologie und ihrer pathogenen Eigenschaften dem Prototyp *E. coli* O157:H7 vergleichbar sind. TZIPORI et al. (1987) definieren EHEC als solche Bakterien, die im Zusammenhang mit einer HC isoliert wurden, mindestens ein Verotoxin bilden, ein 60 MDa Plasmid besitzen und in gnotobiotischen Schweinen charakteristische „attaching-and-effacing“-Läsionen verursachen. BOCKEMÜHL und KARCH (1996) fassen EHEC als *E. coli* zusammen, die unter Bildung eines Zytotoxins spezifische Erkrankungen wie das HC oder das HUS auslösen können. Grundsätzlich sind somit alle verotoxinogenen *E. coli* als zumindest potentielle EHEC einzustufen (GALLIEN et al., 1999a; ANONYMUS, 1999).

2.2.2.2 Virulenzfaktoren und deren pathogenetische Eigenschaften

Verotoxin (VT)

KONOWALCHUK et al. wiesen 1977 das VT nach, das cytotoxisch auf Verozellen wirkt. Die cytotoxische Wirkung ist ebenso in HeLa-Zellkulturen nachweisbar, jedoch nicht in Y1-Zellkulturen. Des weiteren bewirkt VT eine Dilatation und Flüssigkeitsansammlung in Ileum-Segmenten von erwachsenen Kaninchen. VT inhibiert die Protein-Biosynthese durch Purin-Abspaltung an der 28S rRNA der 60S Ribosomen und führt dadurch zum Zelltod. Die relative Toxizität im Mäuseletalitätstest (LD₅₀ Maus; i.p. Injektion) beträgt je nach Subtyp zwischen 0,5 und 400 ng (Tabelle 3). VT 2 weist mit seinen Subtypen in Verozellen eine geringere Toxizität auf als VT 1, die Wirkung im Tiermodell ist umgekehrt: Die Injektion in Kaninchen bewirkt bei VT 1 eine milde, nicht blutige Diarrhoe, bei VT 2 eine hämorrhagische Caecitis. Auch die LD₅₀ Maus ist bei VT 2 höher als bei ST und VT 1. Damit ist das VT nach dem Botulinum-Toxin eines der

potentesten bakteriellen Toxine (KARMALI, 1989; MELTON-CELSA und O'BRIEN, 1998).

Das VT besteht aus einer A-Untereinheit von etwa 32 kDa und 5 B-Untereinheiten zu je etwa 7,7 kDa (Gesamtgewicht von etwa 70,5 kDa), die nonkovalent über die A₂-Untereinheit miteinander verbunden sind. Es bindet über seine B-Untereinheiten an seinen spezifischen Rezeptor Gb₃ (resp. Gb₄ für VT 2e). Durch Endocytose wird der Holotoxin-Rezeptor-Komplex in die Zelle eingeschleust und retrograd über den Golgi-Apparat zum Endoplasmatischen Retikulum transportiert. Im Golgi-Apparat oder im Endoplasmatischen Retikulum kommt es zur Freisetzung der A₁-Untereinheit (ca. 28 kDa), die eine Inaktivierung der Ribosomen bewirkt. Gb₃ als der bei humanen Erkrankungen funktionelle Rezeptor tritt im menschlichen Körper besonders im Bereich der Glomeruli des Nieren-Endothels und auf den Endothelien kleiner Blutgefäße sowie des ZNS auf. Die diarrhöische Wirkung des VT entspricht nicht der des LT/CT oder der des ST, vielmehr kommt es zu einer Hemmung oder Blockierung der Flüssigkeitsabsorption, möglicherweise durch Zerstörung der absorptiven Epithelzellen (O'BRIEN und HOLMES, 1987).

Die Produktion des ST und des VT 1 wird durch höhere Eisenkonzentrationen des Kulturmediums gehemmt, die des VT 2 und seiner Subtypen hingegen nicht (CALDERWOOD und MEKALANOS, 1987). Eine erhöhte Toxin-Freisetzung wurde durch Antibiotika-Zusatz in subinhibitorischen Konzentrationen erreicht. KARCH et al. (1985) konnten nach Zusatz von Sulfmethoxazol, Trimethoprim sowie Cotrimoxazol eine deutlich erhöhte Freisetzung von Toxin nachweisen. Sie konnten allerdings nicht den Nachweis der Phageninduktion erbringen. Vielmehr vermuteten sie eine Permeabilitäts-Veränderung der äußeren Membran und damit eine erhöhte Freisetzung inklusive erhöhter Toxin-Produktion über einen Feed-back-Mechanismus. Eine Phageninduktion war durch UV-Bestrahlung möglich. Eine weitere Möglichkeit zur Freisetzung von VT ist der Zusatz von Mitomycin C zum Kulturmedium. Dies führt nach AL-JUMAILI et al. (1992) zu einer um das 100-fache erhöhten Menge an detektierbarem VT.

Adhärenz-Faktoren

Um zu einer Erkrankung mit den unter 2.3.1 beschriebenen Symptomen zu führen, muß es zunächst zu einer Kolonisation des Intestinums bzw. zur Adhäsion an die Darm-Mucosa kommen.

Als Hauptfaktor, der die Adhärenz an Darmzellen bewirkt, wird derzeit das im LEE (Locus of Enterocyte Effacement) kodierte Intimin angesehen. Neben EHEC und EPEC werden Intimine auch bei Stämmen anderer Spezies, wie *Hafnia alvei* und *Citrobacter rodentium* nachgewiesen. Das LEE kodiert für ein Typ III-Sekretionssystem, wie es auch andere *Enterobacteriaceae*, wie z. B. pathogene Yersinien aufweisen. Das durch das *eae*-Gen kodierte Intimin wird abhängig von seiner Antigenität und PCR-Reaktivität in vier Gruppen eingeteilt (α -, β -, γ - und δ -Intimin; KAPER et al., 1998a und 1998b). Die Pathogenitätsinsel LEE unterscheidet sich in ihrer Größe bei EHEC und EPEC nur durch die etwa 7500 bp lange Sequenz eines P4-Prophagen in EHEC. Die Struktur des LEE ist mit ihren 41 Genen in Reihenfolge und Anzahl bei EPEC und EHEC gleich. Das *eae*-Gen ist als Intimin-kodierendes Gen Teil des LEE. Es konnten bisher noch keine *eae*-positiven Stämme und gleichzeitig LEE-negativen Stämme nachgewiesen werden. Das *eae*-Gen weist zwischen EPEC und EHEC eine Homologie von ca. 87 % auf, wobei der konservierte Teil in den ersten 75 % des N-terminalen Endes liegt. Das C-terminale Ende kodiert für die Rezeptor-Spezifität. Die Regulation des *eae*-Gens wird bei EPEC durch einen Plasmid-kodierten Regulator vorgenommen, bei EHEC konnte noch kein Regulator nachgewiesen werden. Ein weiteres im LEE kodiertes Protein ist der „translocated intimine receptor“ (Tir). Er weist eine Homologie von etwa 33 % zwischen EPEC und EHEC auf. Das *tir*-Protein wird als Teil des Typ III Sekretions-Systems sezerniert und bindet an die äußere Membran der Zielzelle. Das Typ III Sekretionssystem besteht des weiteren aus Poren-formenden Proteinen (EscC, -D, -F, -J, -R bis EscV), deren Katalysatoren (EscN) sowie eines in *E. coli* O157:H7 nachgewiesenen Proteins EscP bzw. in EPEC nachgewiesenen Proteins EspC (E. coli secreted protein C). Des weiteren werden auch noch EspA, -B und EspD kodiert, die sich durch eine hohe Immunogenität auszeichnen. Darüber hinaus wird im LEE noch das Chaperone of E. coli Secretion D (*cesD*) kodiert, das die Sekretion von EspB und EspD beeinflusst. Im LEE liegen noch weitere, in ihrer Funktion nicht bekannte *orf* („open reading frames“).

Die Ausbildung des „Attaching“ wird durch die Adhäsion des Intimins an die Wirtszelle ausgelöst. Als Rezeptoren fungieren das β_1 -Intergrin der Wirtszelle und das Tir-Protein (sezerniert über das Typ III Sekretions-System), das sich an die Membran der Wirtszelle bindet und damit als Rezeptor für das Intimin fungiert. Weitere Wirkungen des Tir sind die Polymerisation des Actins und damit Verkürzung der Mikrovilli („effacing“) sowie die Phosphorylierung zelleigener Enzyme (Phosphorylase C $_{\gamma}$, Protein

Kinase C, der „Myosin light chain“ Kinase) und möglicherweise eine Induktion von Interleukin 8 (IL-8) (KAPER et al., 1998a).

Bei der Untersuchung von Stämmen aus humanen Erkrankungsfällen wurde beim Serovar O157:H7 zu 100 % das *eae*-Gen nachgewiesen, bei den nonO157-Stämmen konnten jedoch auch Stämme mit fehlender Expression des *eae*-Gens isoliert werden. Dies ließ den Schluß zu, daß es auch noch weitere bestimmende Virulenzfaktoren geben müsse.

Um das zoonotische Potential boviner VTEC-Stämme zu erfassen, untersuchten WIELER et al. (1996) 174 Isolate von Kälbern, die an Diarrhöe erkrankt waren. 70 % der Isolate wiesen das *eae*-Gen auf, wobei sich hierunter vielfach Serovare befanden, die auch im Zusammenhang mit humanen Erkrankungen nachgewiesen werden. Die phänotypische Expression der Adhäsion wurde bei 81 % der Isolate nachgewiesen, lediglich 65 % stimulierten die Actin-Polymerisation. Bei weiteren Untersuchungen der Serogruppe O118 stellten WIELER et al. (1998) fest, dass der Anteil der Stämme, die lokale Adhäsion in Hep-2-Zelllinien zeigten, bei 66 % lag. Dem gegenüber stehen 88 % der Stämme, die ein vergleichbares Bild in einer Zelllinie fetaler Kälberlungen zeigten. Es ließen sich jedoch keine signifikanten Unterschiede im Hinblick auf die Spezies-Spezifität nachweisen. Diese Ergebnisse zeigen zum einen, dass bovine VTEC-Stämme nach wie vor von großer Bedeutung als Zoonoseerreger sind. Andererseits lassen die deutlichen Unterschiede zwischen genotypischem Nachweis des *eae*-Gens und phänotypischer Expression der Adhäsion den Schluß zu, dass der phänotypische Nachweis der Adhäsion allein nicht ausreicht, um die Virulenz eines Isolates auch für den Menschen abschließend zu beurteilen. Zudem lassen auch diese Daten vermuten, dass weitere Intimin-unabhängige Adhäsionsfaktoren eine Rolle im Krankheitsgeschehen spielen.

Diese Intimin-unabhängige Adhärenz kann zum einen Fimbrien-assoziiert sein und zu einer Adhäsion an Henle 407 Darmzellen führen (KARCH et al., 1987), aber auch eine diffuse wie lokale Adhäsion an Henle 407 Darmzellen und HEp-2-Zellen bewirken. Auch wird eine Typ I Fimbrien-Struktur beschrieben, die meist zu einer lokalen Adhäsion in Mikrokolonien führt (TARR und BILGE, 1998). Diese Adhäsionsfaktoren werden von einem Virulenzplasmid (pO157) kodiert.

Auf diesem **Virulenzplasmid pO157**, konnten in der Folge verschiedene Virulenzfaktoren nachgewiesen werden, die eine weitere Klärung zur Pathogenese der EHEC-assoziierten Erkrankungen bzw. Virulenz bringen könnten (KARCH et al., 1998).

SCOTLAND et al. (1987) wiesen bei der vergleichenden Untersuchung von *E. coli* O157-Stämmen das vermehrte Vorkommen eines 60 MDa großen Plasmids bei VT-positiven Stämmen nach. KARCH et al. (1987) zeigten, daß dieses Plasmid die Fähigkeit zur Fimbrien-assoziierten Adhäsion an Henle 407 Zellen kodierte. pO157 zeichnet sich bei fast allen untersuchten Stämmen dadurch aus, daß nur etwa 5 % eine intakte Sequenz in der IncF-II-Region aufwiesen, der Großteil kann als Defektmutanten angesehen werden.

Neben den im oberen Teil beschriebenen Adhäsionsfaktoren werden zudem weitere in das Infektionsgeschehen eingebundene Virulenzfaktoren auf pO157 beschrieben:

Das **Enterohämolysin (syn. EHEC-Hämolysin)** ist ein etwa 107 kDa großes Protein, das von einer 2997 bp großen Region des pO157 kodiert wird (BEUTIN et al. 1990). Es wirkt als ein „pore-forming Cytotoxin“, das zur Familie der RTX- („repeats-in-toxins“) Exoproteine gehört. Die Kodierung des Toxins und der assoziierten Faktoren erfolgt durch die Gene EHEC-*hlyA* bis EHEC-*hlyD*, wobei die Sequenz im EHEC-*hlyA* kodiert ist. Es besteht zwischen den Sequenzen des EHEC-*hlyA* und der des *hlyA* (kodierende Sequenz des α -Hämolysins) eine Homologie von etwa 40 %. Untersuchungen von SCHMIDT et al. (1995) konnten zeigen, daß die Ausbildung des enterohämolytischen Phänotyps (kleine, runde trübe Hämolyse nach 18-24 Stunden auf Blutagar mit 5 % gewaschenen Schaferythrozyten) durch einen Defekt im Transportsystem des Enterohämolysins bedingt ist und nicht aufgrund einer geringeren Aktivität des Toxins. EHEC-*hlyA* wurde bei 94,3 % der EHEC-Isolate von HUS-Patienten und 72,7 % der Stämme von Enteritis-Patienten nachgewiesen. Genotypisch konnten bei 100 % der O157-Stämme das EHEC-*hlyA*-Gen nachgewiesen werden, jedoch exprimierten nur 74,3 % den Phänotyp auf Blutagar.

Des weiteren wird auf dem pO157 Plasmid eine **bifunktionale Katalase-Peroxidase (KatP)** kodiert (BRUNDER et al., 1996). Sie hat eine molekulare Masse von 81,8 kDa. KatP bewirkt eine erhöhte Resistenz gegen H_2O_2 , das z. B. von Makrophagen sezerniert wird, um pathogene Mikroorganismen abzutöten. Bei 50 untersuchten Stämmen konnte KatP in 66 % der EHEC O157 und 38 % der EHEC nonO157 nachgewiesen werden.

Als weiteres Enzym wird auf dem pO157 Plasmid die **sezernierte Serin-Protease (EspP)** auf einem 3900 bp langen Genabschnitt kodiert (BRUNDER et al., 1997). Das Transskriptionsprodukt ist ein etwa 1300 Aminosäuren langes Protein mit einer kalkulierten molekularen Masse von 141,8 kDa. Das Exoprotein hat eine molekulare Masse von 104 kDa. In sechs Rekonvaleszenten-Seren war der Antikörnernachweis bei

fünf positiv. Des weiteren konnte zusätzlich eine 105,4 kDa große Serin-Protease EspP* nachgewiesen werden, deren Substrat wahrscheinlich der Koagulationsfaktor V in der Gerinnungskaskade humanen Blutes ist. Die Sequenz *espP* konnte bei 50 untersuchten Stämmen zu 66 % bei EHEC O157 und zu 36 % bei EHEC nonO157 nachgewiesen werden. Vergleichbare Enzyme wurden bei EPEC (EspC), *Shigella flexneri* (SepA) und affenpathogenen *E. coli* (Tsh) beschrieben.

Auf dem pO157 Plasmid wurde darüber hinaus ein **Typ II Sekretions-System** beschrieben, das in 13 Genabschnitten kodiert (KARCH et al., 1998). Es weist einen ähnlichen Aufbau auf, wie die Gene anderer GRAM-negativer Bakterien mit einem Typ II Sekretions-System. Die Funktion und Spezifität des daraus sezernierten Proteins EtpD sind noch nicht geklärt. Die Sequenz *etpD* wurde in 100 % von 50 untersuchten EHEC O157 sowie zu 52 % in 50 untersuchten EHEC non-O157 nachgewiesen.

Das Genom von *Escherichia coli* O157:H7 ist um 1 Mbp größer als das von *E. coli* K12. Dies läßt den Schluß zu, daß, neben den nachfolgend beschriebenen, möglicherweise noch **weitere Virulenzfaktoren** vorliegen.

Einer dieser weiteren Virulenzfaktoren ist das **EAggEC heat stable enterotoxin (EAST1)**, das im *astA*-Gen chromosomal kodiert ist. Das EAST1 wird u. a. von enteroaggregativen *E. coli* (EAggEC) exprimiert und bewirkt, vergleichbar dem hitzestabilen Enterotoxin von *E. coli*, eine wäßrige Diarrhoe über Aktivierung der Guanylatcyclase. Das hitzestabile EAST wurde in EAggEC zu 41%, in EHEC O157 zu 100 %, aber auch zu 41 % in 149 untersuchten ETEC und 22 % von 65 untersuchten EPEC (SAVARINO et al., 1996) nachgewiesen. Die Toxin-Wirkung alleine führte bei Erwachsenen nicht zu Erkrankungen und wurde auch aus 38 % von *E. coli*-Stämmen asymptomatischer Kinder nachgewiesen. Die Infektion von T84-Zellen mit EPEC führte jedoch zu einer um 60 % höheren Sensivität gegenüber EAST1. Die ließe den Schluß zu, daß mit *eae*-positiven EPEC oder VTEC infizierte Endothelzellen eine höhere Sensivität gegenüber der Wirkung von EAST1 haben (KAPER et al., 1998b).

Als weiterer möglicher Virulenzfaktor wird ein **Eisen-Transport-System** beschrieben, das durch das *chuA*-Gen kodiert ist und ein 69 kDa großes Protein auf der äußeren Membran exprimiert. Die Expression dieses oder anderer homologer Proteine durch andere GRAM-negative Stämme wurde nicht nachgewiesen. Auch wurde ein durch *E. coli* O157:H7 produziertes **Exopolysaccharid** beschrieben, das eventuell eine Rolle bei der Adhäsion an Zellen spielt.

Des weiteren können zusätzliche extrachromosomal kodierte Virulenzfaktoren, wie die Plasmide pColD 157 und p4821 genannt werden. pColD 157 kodiert Colicin D, einen colicinogenen Faktor. Die Wirkung ist stammesspezifisch auf *Enterobacteriaceae*, insbesondere *E. coli* begrenzt. Von 46 1987 bis 1991 untersuchten Stämmen wiesen 16 dieses Plasmid auf, in 1996 lediglich nur 1 Stamm. p4821 ist ein Resistenzplasmid, das eine 98 %ige Homologie zur Cor Region von NTP1 hat, einem Resistenzplasmid von *Salmonella typhimurium*. 57 % aller EHEC O157 wiesen dieses Plasmid auf, das wahrscheinlich die Funktion eines selbstreduzierenden Trägers für Antibiotikaresistenzen hat. Spezifische Aktivitäten wurden nur bei 4 von 50 untersuchten Stämmen nachgewiesen (KARCH et al., 1998).

2.3 Bedeutung bei Lebensmittelinfektionen

EHEC wurden als Infektionserreger erstmals 1983 von RILEY et al. im Zusammenhang mit zwei Ausbrüchen von HC beschrieben. In der Folge wurden weltweit zunehmend weitere Infektionen mit verschiedenen Krankheitsverläufen beschrieben, sowohl als Gruppenerkrankungen, als auch in Form sporadischer Infektionen. Als Ursache für Infektionen wurden neben Lebensmitteln auch menschlicher Kontakt sowie Schmierinfektionen nach Kontakt mit Tieren beschrieben.

2.3.1 Klinische Verlaufsformen einer Infektion beim Menschen

Nach einer Inkubationszeit von etwa 3 bis 5, in einzelnen Fällen auch bis zu 9 Tagen, kommt es zur Infektion des Colons. Die Erkrankung ist durch das Auftreten kolikartiger Bauchkrämpfe und wässriger Diarrhöe charakterisiert, die im weiteren Verlauf blutig werden kann. Vielfach treten Übelkeit und Erbrechen auf, vereinzelt kommt es zu leichter Erhöhung der Körpertemperatur. Die Symptomatik ist durch die Abwesenheit hohen Fiebers und fehlende entzündliche Infiltration des Intestinuums gekennzeichnet. Die Erkrankung heilt, sofern es nicht zu Komplikationen kommt, innerhalb einer Woche ab. Bei Auftreten blutigen Durchfalls in etwa 20 % der Fälle steigt das Risiko für extraintestinale Komplikationen. Die Ausbildung einer hämorrhagischen Colitis (HC) stellt in bis zu 20 % der Fälle das Prodromalstadium für extraintestinale Komplikationen, wie die Ausbildung des Hämolytisch-urämischen Syndroms (HUS) oder der Thrombotisch-thrombocytopenischen Purpura (TTP; synonym: Moschcowitz-Syndrom) dar.

Das HUS wird in seiner klassischen Form durch die klinische Trias „akutes Nierenversagen, Thrombocytopenie und mikroangiopathische hämolytische Anämie“ definiert (GASSER et al., 1955). Weitere Symptome können sich in neurologischen Begleiterscheinungen äußern. Eine HUS-Erkrankung kann auch durch Medikamente, Toxine oder bestimmte Chemikalien verursacht werden, wobei es in diesen Fällen zumeist nicht zur Ausbildung der klassischen Form kommt. Die klassische Form ist durch ein Prodromalstadium mit akutem Durchfall gekennzeichnet, wobei es in einigen Fällen mit HC auch zur Ausbildung eines subklinischen HUS kommt. Die Mortalität des HUS liegt bei bis zu 10 %. Bis zu 30 % der Fälle führen zu Langzeitschäden in Form von chronischem Nierenleiden, Bluthochdruck und neurologischen Defiziten (KARMALI, 1989).

Die TTP ist genauso wie HUS durch die klinische Trias gekennzeichnet, wobei zusätzlich neurologische Symptome in fast 100 % aller Fälle auftreten. Sie tritt vornehmlich bei älteren Menschen auf. Mortalitäten bis zu 75% wurden beschrieben (KARMALI, 1989).

Die schwereren Verlaufsformen, insbesondere die extraintestinalen Komplikationen treten hauptsächlich bei Kleinkindern unter 10 Jahren, und hier besonders unter 6 Jahren, sowie bei älteren Menschen (über 60 Jahre) und immunsupprimiert Erkrankten auf. Man spricht auch von der sog. YOPIS-Gruppe („young, old, pregnant, immunocompromised segments of the public“; MOSSEL und STRUIJK, 1993).

Beim immunkompetenten Erwachsenen treten, wenn überhaupt, meist mildere Verläufe auf. Dieses klinische Bild zeigte sich bei einer 1988 nach Verzehr von Roastbeef aufgetretene Gruppenerkrankung, wo das mittlere Alter der Erkrankten bei 28 Jahren lag (RODRIGUE et al., 1995). Auch im Zusammenhang mit größeren Ausbrüchen, die bei Kindern oder alten Menschen auftraten, wurden wiederholt vereinzelt mildere Verläufe bei Erwachsenen (BOCKEMÜHL et al., 1990; PULZ et al., 1997) wie auch bei Kindern (SPIKA et al., 1986) beschrieben. Allerdings sind im Rahmen sporadischer Infektionen wie auch bei Ausbrüchen auch bei nicht zur genannten Risikogruppe gehörenden Erwachsenen vereinzelt Fälle von HUS beschrieben worden (NEILL et al., 1985; CARTER et al., 1987; ALEKSIC et al., 1992).

Die Ausscheidung des Erregers dauert in der Regel 5-20 Tage, kann in einzelnen Fällen auch bis zu 57 Tagen andauern, wobei die Gabe von Antibiotika die Dauer der Erregerausscheidung eher zu verlängern scheint (SHAH et al. 1996). Gerade zur Behandlung sollten Antibiotika nach heutigem Kenntnisstand nicht eingesetzt werden, da sie eher zu einer Stimulation der Bildung von Verotoxin bzw. zu einer vermehrten Toxin-Freisetzung führen.

2.3.2 Sporadische Infektionen und Gruppenerkrankungen

Infektionen mit EHEC wurden seit Beginn der 80er Jahre wiederholt beschrieben. Das vorherrschende Serovar ist hierbei das Serovar O157:H7 oder O157:H⁻. Auch der in Deutschland 1995/96 beschriebene Ausbruch in Bayern war durch *E. coli* O157:H⁻ verursacht, jedoch war dieser Stamm in der Lage, Sorbit und 1,4-Methyl-Umbelliferyl-β-D-Glucuronid (MUG) zu fermentieren. Die sehr niedrige infektiöse Dosis zeigte, daß die damit verbundene hohe Virulenz des Erregers auch bisher als relativ sicher angesehene Lebensmittel wieder als Vektoren wahrscheinlich werden läßt.

1982 erkrankten von Februar bis März und von Mai bis Juni insgesamt 47 Personen nach Essen in Restaurants einer „Fast-Food-Kette“ aus Oregon und Michigan an Hämorrhagischer Colitis (HC). Es wurde aus den Stuhlproben das bisher nicht im Zusammenhang mit Erkrankungen aufgetretene Serovar *E. coli* O157:H7 isoliert. Als Ursache wurde der Verzehr nicht ausreichend gegarter Hamburger ermittelt. Das mittlere Alter der Patienten lag in Oregon bei 28 Jahren (8 bis 76 Jahre), Fieber trat bei beiden Ausbrüchen nur in 7 % der Fälle auf. Diese von RILEY et al. (1983) beschriebene lebensmittelbedingte Gruppenerkrankung war der erste bekannt gewordene durch *E. coli* O157:H7 verursachte Ausbruch.

In einer weiteren Studie konnten KARMALI et al. (1985a) belegen, daß Infektionen mit verotoxinogenen *E. coli* (VTEC) mit dem HUS assoziiert sind. In dieser Studie wurden noch andere Serovare als O157:H7 aus den Stuhlproben der Erkrankten isoliert (O26, O113, O111). Dieses ließ den Schluß zu, daß auch andere VTEC-Stämme als Auslöser von Erkrankungen (Diarrhoe, HC bzw. HUS/TTP) in Betracht zu ziehen sind. Auf dem nordamerikanischen Kontinent wurden allerdings weiterhin, insbesondere im Zusammenhang bei Gruppenerkrankungen O157:H7-Stämme isoliert. Andere Serovare wurden vermehrt bei sporadischen Infektionen nachgewiesen, wenn auch in erheblich geringerem Maße (s. Tabelle 4).

Daß rohes bzw. unzureichend gegartes Fleisch einen erheblichen Risikofaktor für Infektionen mit VTEC darstellt, zeigten LÓPEZ et al. (1998) dadurch eindrucksvoll, daß sie die hohe Inzidenz von HUS in Argentinien den Verzehrsgewohnheiten gegenüber stellten. Die Inzidenz ist in Argentinien mit 22/100.000 Kinder jünger als 5 Jahre im Vergleich zur Inzidenz in Europa (0,2 bis 1,9/100.000 Kinder 0-15 Jahre) sehr hoch. Des weiteren sind blutige Durchfälle zu 30 bis 38 % mit EHEC-Infektionen assoziiert. Dieses ist gerade vor dem Hintergrund interessant, daß in Argentinien bereits mit einem Alter von 3 Monaten mit dem Verzehr von Fleisch begonnen wird. Etwa 20 % der gesunden Kinder weisen geringe Antikörper-Titer gegen VT auf, was nach Angaben der Autoren für zurückliegende Infektionen spricht. Im Unterschied zu den USA oder Kanada spielt jedoch das Serovar O157:H7 in Lateinamerika eher eine untergeordnete Rolle. In diesen Ländern wurden überdies vornehmlich VT1-bildende Stämme isoliert.

In Australien erkrankten 1995 über 100 Menschen nach dem Verzehr einer fermentierten Rohwurst („Mettwurst“) an einer VTEC-Infektion. Aus den meisten Stuhlproben der Erkrankten wurde *E. coli* O111:NM isoliert, jedoch konnten sowohl aus den Stuhlproben der Erkrankten als auch aus den untersuchten Mettwürsten

verschiedene andere Serovare isoliert werden. Das Serovar O111:NM war jedoch das einzige, daß beim überwiegenden Teil der Erkrankten und einem Teil der Mettwürste isoliert wurde und dieselben phänotypischen wie genotypischen Eigenschaften aufwies (PATON et al., 1996). Somit wurde das Auftreten der Erkrankungen mit einer Infektion mit *E. coli* O111:NM in Zusammenhang gebracht, insbesondere weil das Adhärenzverhalten gegenüber Henle 407-Zellen mit der Eigenschaft Erkrankungen auszulösen, korrelierte. Den Erhebungen zufolge genügte eine *E. coli* O111:NM-Zelle/10 g Mettwurst als infektiöse Dosis. Diese extrem niedrige infektiöse Dosis wird noch dadurch unterstrichen, daß Infektionen wiederholt durch „person-to-person“-Kontakte auftraten (SPIKA et al., 1986; REIDA et al., 1994). Man geht derzeit von einer minimalen infektiösen Dosis von etwa 10 bis 100 Keimen aus (BOCKEMÜHL und KARCH, 1996).

Im Zeitraum von 1996 bis 1997 wurden in Japan wiederholt Rettichsprossen wie auch andere pflanzliche Lebensmittel als Ursache sowohl für Gruppenerkrankungen als auch für sporadische Infektionen ermittelt. Der bisher größte bekannte Ausbruch wurde aus Japan beschrieben, wo 7.892 Menschen, in der Hauptsache Kinder, an einer Infektion mit *E. coli* O157:H7 erkrankten. Es wurden aus den Stuhlprobe der Patienten auch noch Stämme der Serovare O118:H2 und O26:H11 isoliert. Als Ursache wurden Rettichsprossen als einziges nicht gekochtes Lebensmittel vermutet.

Die Letalität bei den einzelnen Gruppenerkrankungen schwankt, wobei Todesfälle zumeist bei der bereits erwähnten YOPIS-Gruppe auftraten. Die in Japan 1996/97 beschriebenen Ausbrüche hatten eine Letalität von 3 bis 5 % (ANONYMUS, 1996a), bei dem bisher größten in Europa beschriebenen Ausbruch in Schottland starben 19 von 496 Erkrankten (ANONYMUS, 1996a, WHO Dec. 1997). Auch von den über 300 Infizierten aus Deutschland 1995/96 starben 7 infolge HUS (PULZ, 1997).

In den Tabellen 4 und 5 sind einige ausgewählte Gruppenerkrankungen aufgeführt, wobei als Ursachen sowohl Lebensmittel ermittelt bzw. vermutet wurden, aber auch „person-to-person“-Übertragung sowie Kontakte mit Tieren. Die einzelnen möglichen Übertragungswege werden in Kapitel 2.3.3 beschrieben.

Tabelle 4 Infektionen durch enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC) außerhalb Deutschlands

Land	Jahr	D/HC ¹	HUS ² / TTP ³	Letal	Erreger	Vektor Beschreibung	Referenz
USA	1982	25	0	0	O157:H7	Hamburger	RILEY et al. 1983
USA	1982	21	0	0	O157:H7	Hamburger	RILEY et al. 1984
USA	1984	53	?	4	O157:H7	Hamburger	RYAN et al. 1986
USA	1984	47	3	0	O157:H7	person-to-person	SPIKA et al. 1986
CAN	1986	73	12	17	O157:H7	1. Welle: Sandwich, 2. Welle: person-to-person	CARTER et al. 1987
USA	1988		8			Hackfleisch (vermutet)/Kontakt	PAVIA et al., 1990
USA	1988	63	0	0	O157:H7	unzureichend gegartes Roastbeef, kontaminierter Salat	RODRIGUE et al., 1995
USA	1989	243	2	4	O157:H7	Trinkwasser (vermutet),	SWERDLOW et al., 1992
USA	1990	4	1	0	O111:NM	"person to person"	BANATVALA et al., 1996
USA	1991	38	4 (5)	0	O157:H7	Apfelcidre (vermutet)	BESSER et al., 1993
USA	1991	11	0	0	O157:H7	Trockenfleisch vom Rentier	KEENE et al., 1997
USA	1993	3	41	4	O157:H7	"Hamburger Patty"	CDC, 1993
GB	1993	7	1	0	O157:H7	"Beefburger"	WILLSHAW et al., 1994

Tabelle 4 Infektionen durch enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC) außerhalb Deutschlands (Fortsetzung)

Land	Jahr	D/HC ¹	HUS ² / TTP ³	Letal	Erreger	Vektor/Beschreibung	Referenz
GB	1993	.	.	0	O157:H7	Hund/Rinder	SYNGE et al., 1993
USA	1994	37	0	0	O157:H7	Rindfleisch, Lammfleisch (vermutet)	BANATVALA et al., 1995
USA	1994	23	1	0	O157:H7	Salami	CDC, 1995
GB	1994	-	10	0	O157:H7	pasteurisierte Milch	UPTON und COIA, 1994
AUS	1995	>100	26	1	O111:NM	Mettwurst	CDC, 1995; PATON et al., 1996
JPN	1995/ 96	>9000	101	11	O157:H7 / O157:H-	Wasserkresse	ANONYMUS, 1996a
USA	1996	-	≥3	-	O157:H7	unpasteurisierter Apfelsaft	MCCARTHY, 1996
GB	1997	1	0	0	O157:H?	Pferd mit Diarrhoe	CHALMERS et al., 1997
CAN	1998	29	2	0	O157:H7	„Genoa Salami“	WILLIAMS et al., 2000
GB	1999	29	1	0	O157:H?	Rohmilchkäse aus Ziegenmilch	ANONYMOUS, 1999c

¹: Diarrhoe/Haemorrhagische Colitis ²: Hämolytisch-urämische Syndrom ³: Thrombotisch-Thrombocytopenische Purpura

USA = Vereinigte Staaten von Amerika

AUS = Australien

CAN = Kanada

GB = Großbritannien

Tabelle 5 Infektionen durch enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC) in Deutschland

Jahr	D/HC ¹	HUS ² / TTP ³	Letal	Serovar	Vektor/Beschreibung	Referenz
1988	322	0	0	O101:NT	Mayonnaise	BÜLTE et al., 1997
1990	2	1	0	O22:H8	unpasteurisierte Milch	BOCKEMÜHL et al., 1990
1992	50	3	1	O157:H7	"person to person", diverse Lebensmittel (Ausscheider)	REIDA et al., 1994
1995	8	9	1	<i>Citrobacter freundii</i>	Petersilienbutter	TSCHÄPE, 1995
1995/96	-	45	7	O157:H ⁻	Teewurst, Mortadella (vermutet)	ANONYMUS, 1996
1996	1	1	0	O157:H?	"person to person", Kontakt mit Tieren	GALLIEN et al. 1997a
1997	11	1	-	-	-	ANONYMUS, 1997
1997	-	2	-	-	-	ANONYMUS, 1997
1998	5	1	0	O157:H7/ O157:H ⁻	"person to person", diverse kleinere Ausbrüche	ANONYMUS, 1998
2000	-	-	-	-	-	ANONYMUS, 2000

¹: Diarrhoe/Hämorrhagische Colitis ²: Hämolytisch-urämisches Syndrom ³: Thrombotisch-Thrombocytopenische Purpura

- = keine Angaben

2.3.3 Infektionswege

Wie aus den Tabellen 4 und 5 hervorgeht, wurden durch die Aufklärung der Ursachen bei Erkrankungen vielfältige Übertragungswege ermittelt. Es wurden sowohl primär als auch sekundär kontaminierte Lebensmittel beschrieben, ebenso wie der fäkal-orale Übertragungsweg.

Nach wie vor wird rohen bzw. nicht ausreichend erhitzten **Lebensmitteln tierischen Ursprungs**, die von Wiederkäuern stammen, das höchste Gefährdungspotential zugeschrieben. In den letzten Jahren wurde wiederholt von Gruppenerkrankungen berichtet, die ihre Ursache im Verzehr roher bzw. unzureichend gegarter Fleischerzeugnisse hatten. Insbesondere „**Hamburger**“ sind in den ersten Jahren in Nordamerika als häufige Ursache ermittelt worden (RILEY et al., 1983; RILEY et al., 1984; RYAN et al., 1986; CDC, 1993). „Hamburger“ wie auch andere zerkleinerte Fleischerzeugnisse stellen aufgrund ihrer hohen Oberfläche, des freigesetzten Fleischsaftes und der Schädigung mechanischer Schutzbarrieren (z. B. Faszien) ein ideales Habitat für Mikroorganismen dar. EHEC können bei Kühlraumtemperaturen über mehrere Wochen überleben. Auch bei Kontakt der Schlachtkörper untereinander kann es zu Kontaminationen kommen, wie auch im Zuge der Verarbeitung des Fleisches zu „Hamburgern“ oder anderen zerkleinerten Fleischerzeugnissen. Zur Unterbrechung der Kontaminationskette vom Fleisch auf das fertige Lebensmittel wurden verschiedene Versuche gemacht, um eine Reduktion der Keimbelastung mit *Enterobacteriaceae* einschließlich darunter befindlicher EHEC zu erreichen. Nach wie vor stellt jedoch das sorgfältige Durchbraten die einzige Möglichkeit dar, um GRAM-negative Krankheitserreger sicher abzutöten.

Es zeigte sich in den folgenden Jahren, daß auch **fermentierte Fleischerzeugnisse** wie „Salamis“ (CDC, 1995) oder auch Trockenfleisch (KEENE et al., 1997) Infektionen verursachen können. Gerade Rohwürste sind aufgrund der immer kürzer werdenden Reifungszeiten als potentielle Infektionsquellen zu werten, denn auch wenn es im Zuge des Herstellungsprozesses in den ersten Stunden zu einer rapiden Absenkung des pH-Wertes von 5,6 bis 5,8 auf unter 5,0 kommt, führt dies nur zu einer Hemmung des Wachstums und nicht zum Abtöten der vegetativen Zellen. Vielmehr bleiben die Stämme über einen Zeitraum von z.T. mehreren Wochen lebensfähig (GLASS et al., 1992, KOFOTH, 1999, STIEBING et al., 2000). Nach dieser Adaptation an niedrigere pH-Werte sind EHEC-O157 gegenüber pH-Wert-Absenkungen auf bis zu pH 2 über längere Zeiträume unempfindlich, so daß die aufgenommene Menge die

Magenpassage ohne wesentliche Reduktion der Keimzahl überstehen kann und somit Erkrankungen auslösen kann (LIN et al., 1996).

Als weitere Lebensmittel tierischen Ursprungs wurden **Milch und Milchprodukte**, insbesondere Rohmilch und daraus hergestellte Erzeugnisse als Ursache für Infektionen ermittelt. Der erste in Deutschland beschriebene Fall ging auf eine Infektion durch Aufnahme unpasteurisierter Milch zurück (BOCKEMÜHL et al., 1990). Auch im bisher größten Ausbruch in Deutschland, in den Jahren 1996 bis 1997 in Bayern, mit insgesamt etwa 300 Fällen konnte unter den 198 Fällen, bei denen die Infektionsquelle ermittelt werden konnte, zu 18 % rohe Milch als Infektionsquelle nachgewiesen werden (WHO, 1998). Auch in anderen Ländern Europas wurden Infektionen durch Milch (CHAPMAN et al., 1993, UPTON und COIA, 1994) oder Milchprodukte beschrieben (ANONYMUS, 1994, ANONYMUS, 1999, WHO, 1999). Außerhalb Europas konnte als Infektionsquelle pasteurisierte Milch vermutet (BORCZYK et al., 1987) sowie auch rohe Milch nachgewiesen werden (MARTIN et al., 1986).

Aber auch **Lebensmittel pflanzlichen Ursprungs** wurden in der Vergangenheit als Ursache für Erkrankungen ermittelt. Bei einem größeren Ausbruch mit 23 nachgewiesenen Fällen vermuteten BESSER et al., (1993) die Aufnahme von kontaminiertem „Apfelcidre“ als Ursache. CIESLAK et al. (1993) konnten Infektionen durch im eigenen Garten kontaminiertes Gemüse nachweisen. Der größte bisher beschriebene Ausbruch von EHEC-Infektionen wurde mit etwa 11.000 Fällen, über 500 hospitalisierten Patienten und mehr als 100 HUS-Fällen in Japan beschrieben, wo kontaminierte Wasserkresse über Großküchen in Kindergärten und Kindertagesstätten ausgegeben wurde. Eine durch Erregernachweis gesicherte Infektionskette wurde von McCARTHY et al. (1996) beschrieben, wo unpasteurisierter Apfelsaft der Vektor war.

Ein großer Ausbruch mit über 240 Fällen, der auf kontaminiertes **Wasser** innerhalb einer Ortschaft zurückgeht, wurde von SWERDLOW et al. (1992) beschrieben. Es wurden 32 Erkrankte hospitalisiert. Im Rahmen kleinerer Ausbrüche konnte sowohl Badewasser (WHO, 1997, NEILL et al., 1985) als auch Trinkwasser (DEV et al., 1991) als Ursache für Infektionen mit VTEC ermittelt oder zumindest vermutet werden. Vielfach war aus den vermuteten Infektionsquellen kein Erregernachweis möglich. Jedoch konnten entweder andere Infektionsquellen ausgeschlossen werden (DEV et al., 1991) oder aufgrund der epidemiologischen Zusammenhänge erwies sich Wasser als Infektionsquelle sehr wahrscheinlich (SWERDLOW et al., 1992, NEILL et al., 1995). Im Rahmen des in Bayern beschriebenen Ausbruchs konnten in 43 % der Fälle, bei denen die Infektionsquelle ermittelt wurde, **Kontakt zu Tieren** auf Bauernhöfen als

Infektionsquelle nachgewiesen werden. Aber auch im Rahmen kleinerer Ausbrüche traten Schmierinfektionen nach Kontakt zu Tieren auf, wobei sowohl Nutztiere (GALLIEN et al., 1997a) als auch Heimtiere wie Hunde (SYNGE et al., 1993) oder Pferde (CHALMERS et al., 1997, TREVENA et al., 1998) als Infektionsquelle ermittelt wurden.

Von zunehmender Bedeutung ist die direkte Übertragung von **Mensch zu Mensch**. Sie stellt neben Infektionen nach Verzehr von Tieren stammender Lebensmittel einen immer stärker in den Vordergrund tretenden Infektionsweg dar. Bei einem *E. coli* O157:H7-Ausbruch in einer Kindertagesstätte 1994 erkrankten 36 von 107 Kindern an Diarrhoe, wobei 11 blutige Diarrhoe entwickelten. Der größte Anteil an Erkrankten trat in den Gruppen der bis 3 Jahre alten Kinder auf. Auch 2 der 15 Erzieher (15 %) fielen unter die Falldefinition. Ursache waren in diesem Fall nicht kontaminierte Lebensmittel, sondern wahrscheinlich Mensch-zu-Mensch-Übertragung (REIDA et al., 1994). Bei einem von CARTER et al., (1987) beschriebenen Ausbruch in einem Altersheim wurde die erste Welle der Erkrankungen durch Aufnahme eines kontaminierten Sandwiches hervorgerufen, die zweite Erkrankungswelle ging jedoch auf Mensch-zu-Mensch-Übertragung, hervorgerufen durch infiziertes Pflegepersonal, zurück. Kleinere in Deutschland beschriebene Ausbrüche gingen vielfach auf Mensch-zu-Mensch-Übertragung zurück, wobei Familienmitglieder der Erkrankten asymptomatische Ausscheider waren und der engere Kontakt zur Infektion führte (ANONYMUS, 1998). Aber auch im Zusammenhang mit sporadischen Erkrankungen konnten durch Umgebungsuntersuchungen vermehrt symptomlose Ausscheider als Infektionsquelle ermittelt werden (GALLIEN et al., 1997a). Es traten sowohl ältere Familienmitglieder, wie Großeltern, als auch Geschwister im Alter unter 10 Jahren als symptomlose Ausscheider auf.

2.4 Epidemiologische Situation

E. coli stellt mit unterschiedlichen Serovaren und Virulenzfaktoren eine sehr heterogene Gruppe dar, die sowohl beim Menschen als auch beim Tier nachgewiesen wird. Viele Stämme scheinen spezifisch für ihren Wirt zu sein (BEUTIN et al., 1997). Es wurden jedoch auch mehrere Serotypen nachgewiesen, die sowohl beim Menschen als auch beim Tier sowie in von Tieren stammenden Lebensmitteln vorkommen.

2.4.1 Vorkommen bei Mensch und Tier

Im Rahmen der Untersuchung des Ausbruches in Oregon und Michigan 1982 wurde aus 3000 *E. coli* Stämmen des CDC seit 1972 nur ein Stamm des Serovars O157:H7 identifiziert, der bei einer 50-jährigen Frau akutes Krankheitsgefühl, jedoch kein Fieber und blutige Diarrhoe verursacht hatte (RILEY et al. 1983). In der Folge wurden verschiedene Studien zum Vorkommen von EHEC in diversen Ländern durchgeführt. Die Inzidenz lag in Nordamerika zwischen 2,1 bis 5,2/100.000 Personen (GRIFFIN und TAUXE, 1991). In Deutschland wurden in der Jahresstatistik ausgewählter Infektionserreger lediglich die Salmonellose-Fälle sowie neben Typhus und Paratyphus die übrigen Enteritis-Erreger zusammengefaßt. Seit etwa Mitte der 90er Jahre stehen zunehmend gesicherte Daten zur Verfügung, die auch weitere wichtige Enteritiserreger einschließen. *E. coli* ist nach *Salmonella*, *Campylobacter* und *Yersinia enterocolitica* einer der häufigsten bakteriellen Erreger der Enteritis infectiosa. In Deutschland traten Infektionen mit enteropathogenen *E. coli* 1998 bei 6,84/100.000 Menschen und 1999 bei 6,33/100.000 Menschen auf (ANONYMUS, 1999a; ANONYMUS, 2000). Die EHEC stellen hierbei die bedeutsamste Pathogruppe dar. Die Inzidenz für EHEC lag 1997 je nach Bundesland (außer Bayern) zwischen 0,3 und 1,2 pro 100.000 Einwohner. Weitere Daten aus Bayern zeigen, daß es, je nach Spezifität des Meldesystems, zu sehr unterschiedlich hohen Inzidenzen kommen kann. Im Rahmen einer Labor-Sentinel-Studie wurden die Inzidenz an EHEC-Infektionen auf 13 pro 100.000 Einwohner geschätzt (PRAGER et al., 1988). Diese Daten liegen damit weit über denen im Rahmen der Meldepflicht erhobenen, auch denen aus Bayern. In diese Zahlen wurden sowohl Erkrankungsfälle, als auch im Rahmen kleinerer familiärer Ausbrüche diagnostizierte asymptomatische Ausscheider eingeschlossen. Der Schwerpunkt insbesondere bei den schwereren Erkrankungsverläufen trat in der Altersgruppe der Kinder 1 bis 4 Jahre auf (ANONYMUS, 1999a). Die hier erhobenen Daten stellen nach

Auffassung des RKI jedoch nur einen kleinen Teil der vorkommenden Infektionen dar, da es unter anderem infolge unzureichender Standardisierung der Diagnostik zu erheblicher Untererfassung kommen kann.

1998 traten 89 % der Erkrankungen im Rahmen von Einzelerkrankungen und zu 10 % als kleinere familiäre Häufungen auf. Die Symptome gehen von leichtem Durchfall (1998: 35 %), schweren Durchfall (1998: 30 %) über blutigen Durchfall (1998: 18 %) bis hin zum HUS (1998: 12 %) (ANONYMUS, 1999b). Das häufigste, im Zusammenhang mit HUS nachgewiesene Serovar ist nach wie vor O157. Im Zusammenhang mit enteritischen Erkrankungen wurden zu 39,8 % VT1-bildende Stämme nachgewiesen, jedoch nur in 2,9 % der HUS-Fälle. Andererseits verursachen Stämme, die entweder VT2- oder VT1- und VT2-positiv sind, 97,1 % der HUS-Erkrankungen (BOCKEMÜHL et al., 1998). Damit käme dem VT2 bei systemischen Komplikationen eine größere pathogenetische Bedeutung zu als dem VT1.

Daten aus Einzelfallerhebungen lassen eine stete Abnahme des Serovars O157 sowohl bei enteritischen Verläufen als auch bei HUS gegenüber den non-O157 Serovaren erkennen. Insbesondere spielen die „klassischen“ non-O157-EHEC-Serovare O26 und O111 eine Rolle, es wurden jedoch auch in den letzten Jahren weitere Serovare gehäuft isoliert wie O145 und O103 (BOCKEMÜHL et al., 1998). Daher wurde geschlußfolgert, daß die Gruppe der EHEC durch eine ständige Ausweitung der Erregertypen gekennzeichnet ist, und damit eine zunehmende Gefährdung des Verbrauchers nach sich ziehe. Derzeit sind mindestens 160 verschiedene Serovare beim Menschen isoliert worden.

Die Vielzahl der *E. coli*-Serovare, die VT bilden können, spiegelt sich insbesondere bei Differenzierung der **von Tieren stammenden Stämme** wider. In Deutschland konnten MONTENEGRO et al. (1990) bei Mastbullen eine Kontaminationsrate von 8,4 % nachweisen, bei Milchrindern sogar von 17,0 %. Ebenso wiesen die Autoren aus zwei von 212 Proben von Mastbullen *E. coli* O157:H7 mit vollen Virulenzspektrum (VT-, eae- und EHEC-positiv) nach. Auch weitere im Zusammenhang mit Erkrankungen beim Menschen nachgewiesene Serovare konnten in dieser Studie isoliert werden (O22, O39, O82, O91, O113, O116, O126, O136). Die Nachweisraten in Deutschland liegen für Rinder etwa zwischen 10 bis 25 %, einigen Untersuchungen zufolge sogar bei fast 50 % (RICHTER et al., 1997). Die Prävalenz, bezogen auf die untersuchten Herden, liegt teilweise noch höher. WEBER et al. (1997) berichteten von Prävalenzen über 70 %, nach den Zahlen von RICHTER et al. (1997) gehen sie teilweise sogar auf über 90 %. Diese hohe Prävalenz, bezogen auf untersuchte Gehöfte, spiegelt sich auch in

den Jahresstatistiken des BgVV wider, die, je nach Jahr, bis zu fast 50 % der Herden als VTEC-Ausscheider auswiesen.

BEUTIN et al. (1997) konnten nachweisen, daß es innerhalb einer Herde (sowohl Rinder als auch Schafe) unterschiedlich lange Ausscheidungszeiten für die einzelnen Serovare gibt, und wohl auch gegenseitige Infektion der Tiere untereinander vorkommen. Auch bei Haus- und Heimtieren, wie Hunden und Katzen, wurden VTEC nachgewiesen, z. T. auch bekannt humanpathogene Serovare (BgVV, 1998). Nachweise bei Heimtieren wurden auch geführt, scheinen jedoch epidemiologisch derzeit von eher untergeordneter Bedeutung zu sein.

In den Tabellen 6 und 7 sind die Ergebnisse aus ausgewählten Untersuchungen zum Vorkommen von VTEC bei Nutztieren sowie auch anderen Tierarten aufgeführt.

Tabelle 6 Nachweis von verotoxinogenen *Escherichia coli* (VTEC) einschließlich Serogruppe O157 aus Kotproben von Nutztieren (Bundesrepublik Deutschland)

Tiere	Anzahl	Anzahl VTEC (%)		Quelle
		O157	non-O157	
Mastbullen	212	2 (0,9)	18 (8,4)	MONTENEGRO et al., 1990
Milchkühe	47	0	8 (17,0)	
Schweine	75	0	5 (6,7)	BÜLTE et al., 1990
Rinder	111	0	31 (27,9)	GEIER et al., 1992
Schafe	120	0	84 (70,0)	
Schweine	120	0	11 (9,2)	
Kälber, Diarrhoe (`89)	232	0	7 (3,0)	WIELER et al., 1992
Kälber, Diarrhoe (`89-`90)	73	0	16 (21,9)	
Kälber, gesund (`90)	101	0	13 (12,9)	
Rinder	142	0	30 (21,1)	BEUTIN et al., 1993 Isolierung von 208 Stämmen., davon fast 60 % als humanpathogen eingestuft
Schafe	120	0	80 (66,6)	
Ziegen	66	0	37 (56,1)	
Schweine	120	0	9 (7,5)	
Hühner	144	0	0 (< 0,7)	
Rinder	141	0	7 (5)	GALLIEN et al., 1994
Schweine	306	0	99 (32,3)	
Schafe	15	0	3 (20)	
Schlachtrinder	204	0	97 (47,6)	RICHTER et al., 1997
Rinder	13 Herden	1 (7,7)	10 (76,9)	WEBER et al., 1997

Tabelle 7 Nachweis von verotoxinogenen *Escherichia coli* (VTEC) einschließlich Serogruppe O157 aus Kotproben von Haus- und Heimtieren

Land*	Tiere	Anzahl	Anzahl VTEC (%)		Quelle
			O157	non-O157	
D	Hunde	63	0	3 (4,8)	BEUTIN et al., 1993 Isolierung von 208 Stämmen., davon fast 60 % als humanpathogen eingestuft
	Katzen	65	0	9 (13,8)	
	Katzen	29	0	0	GALLIEN et al., 1994
	Hunde	25	0	1 (4)	
GB	Wildvögel	100	13 (13)	n.d.	WALLACE et al., 1997
CH	Hunde	265	0	5 (1,9)	HÖRZER und AWAD-MASELMEH, 2000
	Fuchs	506	0	6 (1,2)	
	Katze	141	0	0	
	Wildente	10	0	1 (10)	
	exot. Vögel	35	0	1 (2,9)	
	Reh	103	0	10 (10)	

* D = Deutschland GB = Vereinigtes Königreich CH = Schweiz

n.d. = nicht durchgeführt

2.4.2 Vorkommen in Lebensmitteln

In der Folge der Vielzahl der Vektoren, die zu einer Übertragung von EHEC auf den Menschen führen können, wurden Untersuchungen durchgeführt, die eine Risikoabschätzung darüber treffen sollten, ob und in wieweit von Tieren stammende Lebensmittel, insbesondere diejenigen deren Ausgangsprodukte von Wiederkäuern stammen, ein Infektionsrisiko für den Verbraucher darstellen.

In Proben aus Rindfleisch wurden zunehmend Stämme isoliert, die VT2-Bildungsvermögen aufwiesen, im Gegensatz zu Proben aus Schaffleisch, die in der Hauptsache VT1-Bildner enthielten (WILLSHAW et al., 1993, HECKÖTTER und BÜLTE, 1998). CHAPMAN et al. (2001) konnten jedoch zeigen, daß nicht nur von Schafen, sondern auch aus den von ihnen hergestellten Produkten *E. coli* O157 nachweisbar ist. Aus den Erhebungen des BgVV im Rahmen des Deutschen Trendberichts über Zoonosen aus den Jahren 1995 bis 1998 geht hervor, daß die Kontaminationsraten in Lebensmitteln bei den sogenannten „Risikolebensmitteln“ wie Hackfleisch, Rohmilchprodukten oder Rohwürsten mit meist unter 1 % niedrig lagen. Höhere Kontaminationsraten konnten lediglich bei Frischfleisch, insbesondere Rind- und Geflügelfleisch, nachgewiesen werden. Allerdings waren hier z. T. die Gesamtprobenzahlen niedrig und sollten deshalb nicht überbewertet werden (HARTUNG, 1998). Auf der anderen Seite stehen aus eigenen Untersuchungen des BgVV Zahlen über höhere Kontaminationsraten, z. B. bei Rohwürsten, zur Verfügung, die mit 8,8 % angegeben werden (TIMM et al. 1999).

Insgesamt läßt sich feststellen, daß aufgrund der vom BgVV erhobenen Zahlen wesentlich niedrigere Nachweisraten in Lebensmitteln festgestellt wurden, als aufgrund der hohen Prävalenz in Nutztier-, insbesondere Rinderbeständen zu vermuten gewesen wäre. In diesem Zusammenhang ist aber auch auf die Methodik des Nachweises hinzuweisen. Es werden sehr unterschiedliche geno- wie phänotypische Verfahren eingesetzt, die bei weitem nicht alle validiert sind. Auf die mangelhafte Sensitivität zum Nachweis bzw. zur Isolierung von VTEC hatten bereits ARMSTRONG et al. (1996) hingewiesen.

In den Tabellen 8 und 9 sind die Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen bezüglich des Nachweises von *E. coli* O157 bzw. VTEC in Lebensmitteln in Europa und Deutschland aufgeführt.

Tabelle 8 Nachweis verotoxinogener *E. coli* (VTEC) einschließlich Serogruppe O157 in Lebensmitteln tierischer Herkunft (Europa ohne Deutschland)

Land*	Lebensmittel	Proben- zahl	Anzahl VTEC (%)		Quelle
			O157	non-O157	
BEL	Fleisch (Geflügel)	1532	0	25 (1,6)	PIÉRARD et al. 1997
	Fleisch (Schaf)	135	0	6 (4)	
	Fleisch (Wildsäuger)	128	0	14 (11)	
	Fleisch (Wild-Wdk)	238	0	48 (20)	
CH	Hackfleisch gemischt	166	1 (VT-)	4 (2,4)	BAUMGARTNER und GRAND (1995)
	Hamburger roh	121	3 (VT-)	5 (4,1)	
	Hamburger TK	76	0	16 (21,1)	
GB	Fleisch (Geflügel)	112	0	0	SMITH et al., 1991
	Wurst (Schw.-Fleisch)	184	0	20 (10,9)	
	Hackfleisch (Rind)	134	0	17 (13)	WILLSHAW et al., 1993
	Hamburger (Beef-)	124	0	27 (22)	
	Rindswurst	52	0	9 (17)	
	Hackfleisch (Rind)	1979	7 (0,35)	-	CHAPMAN et al., 2001
	Hamburger (Rind)	1129	5 (0,45)	-	
	Rohwurst (Rind)	4	0	-	
	Hackfleisch (Lamm)	484	1 (0,21)	-	
	Hamburger (Lamm)	489	6 (1,22)	-	
	Rohwurst (Lamm)	171	2 (1,17)	-	
	Hackfleisch, gemischt	456	1 (0,22)	-	
	Hamburger, gemischt	90	0	-	
	Rohwurst, gemischt	179	0	-	
IT	Weichkäse	397	0	0	AURELI et al., 1992
NL	Fleisch (Geflügel)	300	0	0	HEUVELINK et al., 1996
		110	0	15 (13,6)	
	Fleisch (Schwein)	260	0	0	
		1000	0	0	
		201	0	6 (3)	
	Hackfleisch (Rind)	92	0	13 (14,1)	
		49	0	1 (2)	
	Hackfleisch gemischt	770	2 (0,3)	0	
		88	0	16 (18,2)	

* BEL = Belgien CH = Schweiz GB = Vereinigtes Königreich

IT = Italien NL = Niederlande

- = nicht durchgeführt VT- = kein Verotoxin-Bildungsvermögen

Tabelle 9 Nachweis verotoxinogener *E. coli* (VTEC) einschließlich Serogruppe O157 in Lebensmitteln tierischer Herkunft (Deutschland)

Lebensmittel	Proben- zahl	Anzahl VTEC (%) O157	Anzahl VTEC (%) non-O157	Quelle
Fleisch	98	0	1 (1,0)	TRUMPF et al., 2000
Fleisch (Lamm)	267	0	14 (5,2)	BÜLTE, 2001
Fleisch (Schwein)	307	1 (0,3)	1 (0,3)	BÜLTE, 2001
Fleisch (Tropfsaft)	98	0	1 (1,0)	BREY et al., 1998
Fleisch, Faschiertes	317	18	55	MAIER et al., 1997
Hackfleisch (Rind)	1381	3 (0,3)	95 (6,9)	BÜLTE, 2001
	454	2 (0,4)	-	BÜLTE, 2001
	105	0	13	TEUFEL et al., 1998
Hackfleischprodukte	362	0	9 (2,5)	TRUMPF et al., 2000
Lammschlachtkörper	87	0	63 (72,4)	BÜLTE, 2001
Rohmilch (Pferd)	1028	0	0	BÜLTE, 2001
Rohmilch (Rind)	127	1 (0,79)	5 (3,9)	KLIE et al. 1997
	245	2 (VT-)	0	KUNTZE et al., 1996
Rohmilch (Rind, Tankmilch)	70	-	8 (11)	MÄDE und STARK, 1996
Rohmilchkäse (Rind)	267	0	2 (0,7)	BÜLTE, 2001
	15	0	0	KUNTZE et al., 1996
Rohwurst	375	0	7 (1,9)	BREY et al., 1998
	158	0	14 (8,8)	TIMM et al., 1999
	167	0	0	TRUMPF et al., 2000
Vorzugsmilch	246	0	0,80%	TRUMPF et al., 2000
Vorzugsmilch (Rind)	146	0	3 (2,1)	KLIE et al. 1997
Weichkäse, past. Milch	47	0	0	TEUFEL et al., 1998
Weichkäse, Rohmilch	72	0	3	TEUFEL et al., 1998

- = nicht durchgeführt

VT- = kein Verotoxin-Bildungsvermögen

2.4.3 Mikrobiologie der Rohwürste unter besonderer Berücksichtigung verotoxinogener *E. coli* (VTEC)

Die für die Herstellung und Reifung von Rohwürsten wichtigsten Bakteriengattungen sind *Lactobacillus*, *Staphylococcus* und *Micrococcus*. Das rohe Fleisch enthält zwar Vertreter verschiedener anderer Mikroorganismen insbesondere aus den Familien der *Enterobacteriaceae* und der *Pseudomonadaceae*, jedoch setzen sich Laktobazillen und *Micrococcaceae*, die gezielt als Starterkulturen zugesetzt werden, im Laufe der Kühllagerung durch. Die Selektion der Mikroorganismen zu den erwünschten Spezies hin wird insbesondere durch den pH-Wert, den a_w -Wert, das Vorhandensein von Luftsauerstoff und den Zusatz von Nitrat und Nitrit beeinflusst. Bei niedrigen pH-Werten und mikroaerophilem Milieu können insbesondere Laktobazillen besonders gut konkurrieren. Durch Zusatz von Zuckern zum Rohwurstbrät führt deren Abbau zu einer Absenkung des pH-Wertes. Damit werden Verderbniserreger, insbesondere *Enterobacteriaceae* in ihrem Wachstum stark gehemmt. Dieses tritt insbesondere bei schnellreifenden Produkten durch Zusatz von Säuerungsmitteln auf, während sich die säureempfindlicheren Mikroorganismen bei langsam gereiften Rohwürsten ohne diesen Zusatz besser entfalten können (LÜCKE, 1985).

Micrococcaceae bewirken neben der Säuerung eine Reduktion des Nitrates zu Nitrit und spielen damit bei der Ausbildung des typischen Aromas durch die dabei entstehenden Stoffwechselprodukte eine Rolle. Eine weitere Wirkung ist die Zerstörung von Peroxiden und damit der Schutz vor „Ranzigwerden“ des Produktes. Lipolytische Aktivitäten der erwünschten Flora führen zu einer weiteren Aromatisierung.

Hefen und Schimmelpilze treten insbesondere als „Oberflächenflora“ bei luftgereiften Produkten auf. Hefen sind zu Beginn der Rohwurstreifung regelmäßig nachweisbar. Sie sind jedoch unter Sauerstoffabschluß nicht wachstumsfähig, so daß sie im Zuge der Fermentation, wenn überhaupt, nur noch in den Randbereichen nachweisbar sind (WEBER, 1996). Vorteilhaft werden die antioxidative Wirkung, sowie der positive Einfluß auf die Aromabildung durch die Bildung spezifischer Stoffwechselprodukte, insbesondere zu Beginn der Reifung, bewertet (HECHELMANN, 1985). Der Einsatz von Hefen und Schimmelpilzen erscheint LÜCKE und HECHELMANN (1985) teilweise bei langgereiften Rohwürsten sinnvoll, um durch Ausbildung der typischen Oberflächenflora das Ansiedeln unerwünschter, möglicherweise toxinogener Schimmelpilze zu vermeiden. Im Zuge der Fermentation kommt es zu einer Abnahme

der Keimzahl der Hefen auf unter 10^2 KbE/g in einem Zeitraum von 14 bis 18 Tagen (HECHELMANN, 1985).

Enterobacteriaceae und *Pseudomonadaceae* sind Bestandteil der Ausgangsprodukte. Je nach Hygiene des Schlachtprozesses und Lagerung können sie in hohen Keimzahlen im Fleisch vorliegen und dadurch sowohl die Fermentation als auch die lebensmittelhygienische Sicherheit des Endproduktes gefährden. Das Ziel der Fermentation von Rohwürsten ist die Zurückdrängung solcher proteolytischen Anteile innerhalb von wenigen Stunden bis Tagen (HECHELMANN, 1985). Kommt es nicht zu dieser Reduzierung, so kann es zur Fäulnis kommen, insbesondere nach Trockenrandbildung, der die Wasserabgabe aus dem Wurstinnern verhindert. Zur Familie der *Enterobacteriaceae* gehören jedoch nicht nur für den Verderb relevante, sondern auch verschiedene pathogene Spezies.

Lebensmittelinfektionen bzw. Lebensmittelintoxikationen wurden aufgrund des Verzehrs von mit *Salmonella* spp., *Staphylococcus* spp. aber auch VTEC kontaminierten Rohwürsten beschrieben (SCHMIDT, 1985). Staphylokokken können sich bei unzureichender Säuerung zu Beginn der Reifung sowie mangelnder Reduktion des Sauerstoffgehaltes bei höheren Reifungs-Temperaturen vermehren und so durch die Bildung von Enterotoxinen im Lebensmittel zu Intoxikationen führen. Ebenso stellen mit *Salmonella* spp. kontaminierte Rohwürste ein potentiell Risiko dar. Bei frischen Mettwürsten ist über die Zugabe von Glucono-delta-Lacton, Nitritpökelsalz sowie von Starterkulturen eine Hemmung der Salmonellen zu erreichen. Je nach Anteil der einzelnen Komponenten variiert die Haltbarkeit sowie die dazu erforderliche Temperatur. Streichfähige Rohwürste lassen sich als risikoarme Produkte in den Verkehr bringen, wenn Kochsalz, Natriumnitrit, Natriumascorbat und milchsäurebildende Starterkulturen zugesetzt werden. Bei den schnittfesten Rohwürsten konnten Salmonellen durch den Zusatz von Kochsalz, Natriumnitrit sowie pH-Wert-Absenkung auch durch zugesetzte Starterkulturen nach Reifung und Trocknung erfolgreich gehemmt werden. Der zusätzliche Einsatz von Glucono-delta-Lacton führte zu einer weiteren Stabilisierung des Produktes (SCHMIDT, 1985).

Verotoxinogenen *E. coli* (VTEC) kommt in diesem Zusammenhang eine besondere Bedeutung zu, da, wie bereits in Kapitel 2.4.1 dargestellt, Rinderbestände das Hauptreservoir für VTEC darstellen. Dieses potentielle Risiko für den Verbraucher wird um so deutlicher, als der überwiegende Teil der Rohwürste nach den Leitsätzen für Fleisch und Fleischerzeugnisse des Deutschen Lebensmittelbuches sowie nach KOCH

(1982) unter dem Zusatz von Rindfleisch hergestellt werden. Dieses zeigt einen wichtigen möglichen Übertragungsweg dieser Zoonose vom Tier auf den Menschen. Das Risiko einer Infektion mit EHEC nach Verzehr von Rohwürsten zeigte sich in beschriebenen Gruppenerkrankungen sowohl in Amerika (CDC, 1995) als auch in Australien (PATON et al., 1996). Auch in Deutschland wurden mehrere Erkrankungen zumindest mit dem Verzehr von Teewurst in Verbindung gebracht (ANONYMUS, 1996). GLASS et al. (1992) konnten bei Inokulationsversuchen mit *E. coli* O157:H7 eine Abnahme der ursprünglich zugesetzten $4,8 \times 10^4$ KbE/g um zwei log-Stufen nachweisen. Der pH-Wert lag bei diesen Untersuchungen bei 4,8, die zugesetzten *E. coli* O157 waren nach zweimonatiger Lagerung bei 4°C weiterhin nachweisbar, wenn auch keine Vermehrung stattgefunden hatte. Diese Ergebnisse wurden von CLAVERO und BEUCHAT (1996) bestätigt, die verschiedene *E. coli* O157:H7-Stämme unterschiedlichen pH-Werten (4,8, 5,4, 6,0), a_w -Werten (0,90, 0,95, 0,99) sowie Inkubationstemperaturen (5, 20 und 30°C) in Tryprouse-Soja-Bouillon aussetzten. Die Widerstandsfähigkeit gegenüber den Streßfaktoren war bei niedrigen Bebrütungstemperaturen höher als bei den höheren. Diese Ergebnisse zeigten sich ebenso nach einer Erhitzung für 0, 15 und 30 Minuten und anschließender Inkubation. Lebensfähige Mikroorganismen konnten ohne vorherige Erhitzung auf Salami-Scheiben mit einem a_w -Wert von 0,90 nach bis zu 16 Tagen Lagerung bei 5°C und 20°C nachgewiesen werden, bei einem a_w -Wert von 0,95 sogar nach 32-tägiger Lagerung. Der Zusatz hitzegeschädigter Zellen ließ einen Nachweis nach bis zu 8 Tagen Lagerung zu. Unabhängig von einer Hitzeschädigung vor der Lagerung konnte nachgewiesen werden, daß mit sinkenden pH-Werten bzw. sinkender Wasseraktivität eine Abnahme der wachstumsfähigen Zellen verbunden war. Die Autoren hielten es für unwahrscheinlich, daß *E. coli* O157:H7 bei niedrigen Kontaminationsraten (<100 kbE/g) eine Lagerung von 32 Tagen bei 5°C überleben könne, daß jedoch bei höheren Kontaminationsraten (10^4 - 10^5 kbE/g) durchaus ein Risiko für den Verbraucher entstehen könnte. Auf der anderen Seite war eine geringere Abnahme der Keimzahl in „shredded hard salami“ nachzuweisen, nachdem die Zellen vorher an Säure adaptiert waren (LEYER et al., 1995).

Eine antagonistische Wirkung gegen einige *E. coli* O157:H7-Stämme wurde für *Lactococcus lactis* beschrieben, der in der hohen Menge der von ihm produzierten Wasserstoffperoxids begründet war. Innerhalb von 7 Tagen kam es zu einer signifikanten Abnahme der Keimzahlen (KOFOTH, 1998). Eine Reduktion von *E. coli* O157:H7 konnten auch KANG und FUNG (1999) durch den Zusatz von *Pediococcus*

acidilactici nachweisen, wenn dieser über den Zusatz von MnSO_4 und OxyraseTM stimuliert wurde.

MÜLLER et al. (1998) setzen sechs Isolate verschiedener Herkunft in Konzentrationen zwischen 10^0 und 10^2 KbE/g einer Teewurst, einer kurzgereiften Salami und einer langgereiften Salami mit jeweils zwei unterschiedlichen Rezepturen zu. Sie konnten zwar eine Reduktion der zugesetzten Keimzahlen beobachten, jedoch waren die zugesetzten Stämme auch nach 14 Tagen (Teewurst), 30 Tagen (kurzgereifte Salami) bzw. 36 Tagen (langgereifte Salami) weiterhin über Anreicherungsverfahren und/oder mit der PCR nachweisbar. KOFOTH (1999) untersuchte die Abnahme von verschiedenen *E. coli* O157-Stämmen im Zuge der Rohwurst-Reifung. Ihren Untersuchungen zufolge stellt die herkömmlich hergestellte, langgereifte schnittfeste Rohwurst kein Sicherheitsrisiko dar, da es zu einer Reduktion der zugesetzten Keimzahlen von etwa fünf log-Stufen nach einer Reifung von bis zu 84 Tagen kam. Bei den streichfähigen, kurzgereiften Rohwürsten war eine deutliche Reduktion der Prüfstämme, wenn überhaupt, nur durch den Zusatz von Glucono-delta-Lacton zu erreichen. Jedoch waren auch hier nur vergleichsweise geringe Abnahmen der Keimzahlen mit 0,3 log bzw. 1,4 log nach Zusatz von 0,6 % Glucono-delta-Lacton zu verzeichnen. Somit stellen auch nach diesen Ergebnissen streichfähige Rohwürste insbesondere bei kurzer Reifezeit ein potentiell Risiko für den Verbraucher dar. Ebenso können bei kürzerer Reifungszeit der sog. „schnellgereiften“ Rohwürste infektionstüchtige Zellen überleben. STIEBING et al. (2000) konnten eine Abnahme der zugesetzten Keimzahlen an EHEC im Zuge der Fermentation und Reifung in schnittfesten Rohwürsten nach 28 Reifetagen um bis zu 3 Zehnerpotenzen nachweisen, wobei insbesondere der Abtrocknungsgrad, die Reife- bzw. Lagertemperatur und die Reifungsdauer einen primären Einfluß auf die Reduktion der zugesetzten EHEC-Stämme hatten. Nach Auffassung der Verfasser ist eine Reifungszeit von mindestens 21 Tagen mit entsprechender Säuerung und Trocknung für eine ausreichende Reduktion notwendig.

In einer Studie von GAREIS et al. (2000) wurden neben 623 Rohwürsten verschiedene Proben im Rahmen eines Monitorings aus einem fleischverarbeitenden Betrieb auf VTEC/EHEC untersucht. Aus den Endprodukten konnten in 2,1 % der Proben VTEC isoliert werden, hinzu kam ein Nachweis aus 168 untersuchten Tropfsaftproben und wiederholte Nachweise aus Stuhlproben bei den Mitarbeitern des Betriebes. Ziel war hierbei, mögliche Kontaminationswege innerhalb der Produktionskette aufzuzeigen. Aufgrund differenzierender Typisierungsergebnisse der Isolate konnte die Übertragung

eines Stammes vom Menschen auf ein Lebensmittel nicht gesichert werden. Jedoch wurde durch diese Studie eindrucksvoll ein mehrmonatiges Ausscheidertum bei einem Mitarbeiter in einem fleischverarbeitenden Betrieb nachgewiesen. Damit ist eine Kontamination im Produktionsbereich durch den symptomlos ausscheidenden Menschen denkbar. Das Vorkommen symptomloser Ausscheider im Bereich der Fleischproduktion konnten STEPHAN und UNTERMANN (1999) ebenso nachweisen. Die Nachweisrate war mit 14 Isolaten aus 1370 Stuhlproben (1,0 %) niedrig. Lediglich ein Isolat neben nachgewiesenem VT-Bildungsvermögen auch eae-positiv war.

2.5 Amtliche Lebensmittelüberwachung in der Bundeswehr

Die Rechtsgrundlage für die amtliche Lebensmittelüberwachung ist das Gesetz über den Verkehr mit Lebensmitteln, Tabakerzeugnissen, kosmetischen Mitteln und sonstigen Bedarfsgegenständen (Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetz LMBG). Für den Rechtsbereich des LMBG ist in § 40 festgelegt, daß die Bundeswehr innerhalb ihres Zuständigkeitsbereiches Eigenvollzugskompetenz besitzt. Dies gilt für sämtliche hoheitlichen Aufgaben, außer denen für den innergemeinschaftlichen Handel sowie den Im- und Export und die Durchfuhr. Vergleichbares ist in § 22 a des Fleischhygiene- bzw. § 17 des Geflügelfleischhygienegesetzes definiert.

Die Aufgaben des Amtsarztes nach dem Bundes-Seuchengesetz bzw. Infektionsschutzgesetz nimmt innerhalb der Bundeswehr der Standortarzt wahr. Diese Aufgaben erstrecken sich auf den Bereich der Lebensmittelhygiene insbesondere bei Verdacht auf lebensmittelbedingte Gruppenerkrankungen. Bereits bei einer Erkranktenzahl von fünf oder mehr Erkrankten mit gleicher Symptomatik im gleichen zeitlichen Zusammenhang wird eine gemeinsame Ursache angenommen und ist somit als Gruppenerkrankung zu melden. Im Falle von Erkrankungen, die ihre Ursache im Bereich der Verpflegung haben könnten, werden grundsätzlich die innerhalb der Bundeswehr für die Lebensmittelüberwachung zuständigen Stellen hinzugezogen.

Änderungen im Bereich des Sanitätsdienstes der Bundeswehr, die im Zuge der Neustrukturierung der Bundeswehr auch den Bereich der Lebensmittelüberwachung und -untersuchung betreffen, werden im Folgenden nicht berücksichtigt.

2.5.1 Zuständigkeit für die Lebensmittelüberwachung bei der Bundeswehr

Die amtliche Lebensmittelüberwachung in der Bundeswehr wird von den Sachverständigen der Abteilungen „Sanitäts- und Gesundheitswesen“ der jeweiligen Wehrbereichskommandos (WBK) wahrgenommen. Den Verfahrensablauf zur Durchführung der Lebensmittelüberwachung nach dem LMBG regelt der Erlaß BMVg-InSan I 7- Az 42-21-30 „Bestimmungen zur Überwachung und Qualitätskontrolle von Lebensmitteln und Bedarfsgegenständen in der Bundeswehr (DBBwLMBG)“ vom 01.09.1999 (VMBI. S. 357).

Die Untersuchung der in den Einrichtungen zur Gemeinschaftsverpflegung ausgegebenen Lebensmittel wird durch vier „Zentrale Institute des Sanitätsdienstes der Bundeswehr (ZInstSanBw)“ vorgenommen. Im Norden werden die Lebensmittel aus

Einrichtungen Schleswig-Holsteins, Hamburgs, Bremens und Niedersachsens im Kieler ZInstSanBw untersucht und auf Grundlage nationaler und europäischer Rechtsvorgaben sowie innerhalb der Bundeswehr geltender Dienstvorschriften beurteilt. Die Beurteilung erfolgt unter anderem aufgrund durchgeführter veterinärmedizinischer Untersuchungen durch Sachverständige im Sinne des Erlasses BMVg-InSan I 7- Az 42-21-30 vom 01.09.1999 (VMBl. S. 357). Hier ist die Einsendung von Lebensmittelproben zur Untersuchung geregelt. Die Zahl der zu entnehmenden Proben richtet sich anteilig nach der Anzahl der Verpflegungsteilnehmer. Ebenso sind auch Zuständigkeiten sowie Verfahrensweisen bei lebensmittelrechtlichen Beanstandungen vorgegeben.

2.5.2 Anforderungen an Lieferbetriebe der Bundeswehr sowie Betriebsstrukturen und Produktionsprozesse in Verpflegungseinrichtungen der Bundeswehr

Es können nur Lieferbetriebe unter Vertrag genommen werden, die durch einen Sachverständigen der Bundeswehr als geeignet beurteilt wurden. Diese Beurteilung erfolgt aufgrund einer jährlich durchzuführenden Auditierung der Betriebe, zu deren Akzeptanz sich die Betriebe bei Vertragsunterzeichnung verpflichten. Hierbei werden sowohl nationale wie auch EU-weite rechtliche Vorgaben zugrunde gelegt, aber auch Aufbau und Art der Durchführung des betriebseigenen Qualitätsmanagements. Ziel ist hier, durch diese Maßnahmen transparent darzustellen, daß die produzierten Erzeugnisse eine höchstmögliche lebensmittelhygienische Sicherheit haben, um so ein Infektionsrisiko durch den Verzehr dieser Lebensmittel ausschließen zu können. Diese Vorgaben führen dazu, daß unter mangelhaften Bedingungen produzierte Lebensmittel von den Truppenküchen gar nicht erst bezogen werden. Steht ein Betrieb erst unter Vertrag, unterliegen auch die von ihm produzierten Lebensmittel der Untersuchung durch die regional zuständigen ZInstSanBw. Die aufgrund dieser Untersuchungen erstellten Gutachten geben eine weitere Grundlage für die jährlichen Auditierungen durch die Wehrbereichskommandos. So kann bei vermehrtem Nachweis pathogener Bakterien in den produzierten Produkten durch Auflagen eine Verbesserung gefordert werden. Es entspricht der Fürsorgepflicht des Dienstherrn, daß insbesondere Soldaten, die zur Einnahme der Truppenverpflegung verpflichtet sind, eine höchst mögliche Unbedenklichkeit der an sie ausgegebenen Lebensmittel erwarten dürfen. Dies kann in Teilbereichen auch zu einer höheren Untersuchungsichte bei einzelnen Produkten führen.

2.5.3 Lebensmittelhygiene in Einrichtungen zur Gemeinschaftsverpflegung bei der Bundeswehr

Diese Fürsorgepflicht führt auch dazu, daß über die nationale Rechtssetzung hinaus gehende Dienstvorschriften und Erlasse innerhalb der Bundeswehr gelten. Die Fragen zur Durchführung der Lebensmittelhygiene im Verkehr mit Lebensmitteln und Bedarfsgegenständen in allen Einrichtungen der Bundeswehr sind in der Zentralen Dienstvorschrift (ZDv) 46/28 „Lebensmittelhygiene“ geregelt. Die entsprechenden Rechtsgrundlagen sind die der nationalen aber auch die der europäischen Rechtssetzung. Einrichtungen im Sinne dieser ZDv sind neben Küchen an Land, an Bord schwimmender Einheiten und in Luftfahrzeugen, in denen Lebensmittel behandelt werden, auch deren Betriebs- und Nebenräume sowie alle Arten von Lagerbereichen, Verpflegungslagern, Versorgungspunkten sowie Feldküchen und deren Fahrzeuge.

Im Unterschied zur nationalen Rechtssetzung gelten die Bestimmungen der ZDv 46/28 jedoch ebenso im Ausland. Dadurch wird z. B. auch im Auslandseinsatz gewährleistet, daß die Anforderungen für die Herstellung, Behandlung und das Inverkehrbringen der Verpflegung den Normen der ZDv 46/28 entsprechen.

Im einzelnen sind durch die ZDv 46/28 Maßnahmen festgelegt, die den hygienisch einwandfreien Zustand der abgegebenen Verpflegung gewährleisten sollen, um so eine gesundheitlich bedenkliche, ekelerregende oder sonst nachteilige Beeinflussung zu verhindern. Diese Maßnahmen umfassen Vorschriften bei der Übernahme von Verpflegung, für die bauliche Raumgestaltung und -ausstattung, Vorgaben für Lagerräume sowie Bedarfs- und Einrichtungsgegenstände. Des weiteren werden Verfahrensanweisungen für das Küchenpersonal und den Küchenbetrieb definiert. Darüber hinaus enthält sie spezielle Anweisungen zur Behandlung verschiedener Lebensmittel, wie z. B. von Fleisch und Fleischerzeugnissen.

Entsprechend **§ 4 Abs. 1 der Verordnung über Lebensmittelhygiene (LMHV)** sind zudem betriebseigene Maßnahmen und Kontrollen zur Gewährleistung der Lebensmittelsicherheit und zur Vermeidung gesundheitlicher Gefahren gefordert. Diese Vorschriften sind in den „Hinweisen für Maßnahmen zur Eigenkontrolle im Bereich der Bundeswehr“ (MEkBw) niedergelegt, die in Anlage 7 bis 15 der ZDv 46/28 festgelegt sind. Durch das MEkBw werden den Betreibern der Truppenküchen inhaltliche Vorgaben gemacht, welche Elemente die betriebseigenen Maßnahmen beinhalten müssen. Hierbei ist festzuhalten, daß es sich im Gegensatz zu den übrigen Maßgaben der ZDv 46/28 nicht um Vorschriften handelt, die in jedem Fall zu erfüllen sind.

Vielmehr werden Anleitungen gegeben, die das Aufsuchen kritischer Punkte im Zuge des Herstellungsprozesses erleichtern. Jeder Arbeitsschritt soll in regelmäßigen Abständen auf mögliche Gefahren hin analysiert und dessen Risiken bewertet werden, um dann zu angemessenen Sicherungsmaßnahmen und Kontrollverfahren zu führen (Anlage 7/2, Ziffer I 4). Hierzu sind für die Bereiche Warenannahme, Lagerung, Garküche, Heißausgabe, Kaltausgabe, Reinigung und Desinfektion, Geschirreinigung sowie die Durchführung von Unterrichten und Schulungen Hinweise gegeben, welche Fragen zu prüfen sind, ebenso Vorschläge zur Dokumentation (Anlagen 8 bis 14). Gemäß MEkBw sollen die durchzuführenden Maßnahmen im Bedarfsfall an die betriebsspezifischen Vorgaben angepaßt werden. Lediglich der durch MEkBw geforderte niedergelegte Informationsgehalt muß mindestens erhalten bleiben. Also bildet dieser Teil der ZDv 46/28 mit der Verpflichtung zur Durchführung betrieblicher Eigenkontrollen eine zusätzliche Ergänzung der übrigen im folgenden skizzierten Vorschriften. Sie ersetzen jedoch in keinem Fall die Vorgaben der ZDv 46/28 (Anlage 7/1, Ziffer I 1).

Unabhängig von den „Hinweisen für Maßnahmen zur Eigenkontrolle im Bereich der Bundeswehr“ (MEkBw) wird in der **ZDv 46/28 „Lebensmittelhygiene“** der Bezug bestimmter Lebensmittel untersagt. Dies sind sowohl Lebensmittel einfacher Qualität, als auch Produkte, die aus mikrobiologischer Sicht ein höheres Risiko für die Übertragung von Zoonoseerregern bieten. Hierzu gehören Rohmilch und Produkte daraus, Enteneier, aber auch Hackfleischerzeugnisse, sofern sie nicht küchenfertig und bereits einmal bis in den Kern erhitzt als Tiefkühlware bezogen werden (ZDv 46/28, Anlage 3). Hühnereier und Produkte daraus dürfen nur bis in den Kern erhitzt ausgegeben werden, ebenso Fleisch- und Hackfleischerzeugnisse. Diese Vorschriften haben zum Ziel, die Infektkette bei Zoonoseerregern zu unterbrechen. Dieses wird durch zusätzliche Vorgaben z. B. Erhitzung bestimmter Lebensmittel, Mindesttemperaturen von 65°C bei der Heißausgabe der verzehrsfertigen Lebensmittel, sowie maximale Temperaturen von +7°C bei der Kaltausgabe unterstützt.

2.6 Nachweismethoden für VTEC und EHEC

In den letzten Jahren wurden verschiedene Nachweismethoden für die Detektion und die Isolierung von VTEC aber auch einzelner Serogruppen wie *E. coli* O157 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.

Die Eignung der Methoden für die Routinediagnostik wird, neben der Sensitivität und Spezifität, insbesondere an ihrer einfachen und schnellen Durchführung, der Robustheit und Standardisierbarkeit des Nachweissystems gemessen und es darf nicht zu kostenintensiv sein.

Im Folgenden werden hauptsächlich Verfahren für den Lebensmittelbereich beschrieben, wobei grundsätzlich zwischen phäno- und genotypischen Nachweismethoden unterschieden werden kann. Aufgrund der geringen infektiösen Dosis von unter 100 Zellen ist für die Untersuchung von Lebensmitteln der Einsatz von Anreicherungsverfahren zwingend. Im Folgenden werden die einzelnen Voranreicherungen und Anreicherungen in Verbindung mit dem jeweiligen Nachweissystem beschrieben.

2.6.1 Phänotypische Nachweismethoden

Die phänotypischen Methoden zur Identifizierung und Isolierung der gesuchten Spezies basieren einerseits auf dem Nachweis biochemischer Indikator-Reaktionen oder exprimierter Virulenzfaktoren. Für die präsumtive Erfassung des Serovars *E. coli* O157 wurde das fehlende Vermögen, Sorbitol zu fermentieren sowie die fehlende Expression der β -D-Glucuronidase herangezogen. Ebenso wird die Serovar-spezifische Agglutination eingesetzt. Zur Bestimmung der Gruppe der VTEC erwiesen sich biochemische Marker als nicht geeignet, so daß als „Screening“-Verfahren für eine gezielte Isolierung solcher Stämme der Verotoxin-Nachweis eingesetzt wird. Das Verotoxin ist gleichzeitig der Hauptvirulenzfaktor dieser Pathogruppe und ermöglicht innerhalb der Spezies *E. coli* eine Abgrenzung.

Im Folgenden werden die verschiedenen Nachweisverfahren, gruppiert nach ihrer Methodik, aufgeführt.

2.6.1.1 Zelltests

Der Nachweis von Verotoxinen oder verschiedener Adhäsionsfaktoren mittels empfindlicher Zellkulturen stellt in der Diagnostik der VTEC/EHEC ein seit mehr als 20 Jahren etabliertes Verfahren dar. Sie stellen gegenüber dem Tierversuch ein sensitiveres und besser standardisierbares Nachweissystem dar. Sie sind jedoch relativ zeitaufwendig und daher für eine Routinediagnostik wenig geeignet.

Im Rahmen der VTEC-Diagnostik ist der Verozelltest am weitesten verbreitet (KONOWALCHUK et al., 1977). Hierbei wird freies Verotoxin aus Kulturüberständen von VTEC eingesetzt, und es kommt im Rahmen der Inkubation zu charakteristischen cytotoxischen Effekten. Diese Veränderungen müssen durch einen Neutralisationstest mit spezifischen, in der Regel monoklonalen, Antikörpern bestätigt werden. So kann es bis zu 5 Tage dauern, bis ein abschließendes Ergebnis vorliegt. Die Nachweisgrenze liegt mit 1 pg für VT2 und 10 pg für VT1 sehr niedrig, der zusätzliche Einsatz von HeLa-Zellen zur Differenzierung der VT2-Subtypen ist je nach Fragestellung sinnvoll. Nach PETRIC et al. (1987) führt der Zusatz von Cycloheximid zur Zellkultur zu einer um das 8-fache verbesserten Sensitivität der Verozellen und somit zum verbesserten Nachweis von VT im Zelltest. Der Verozelltest wurde in verschiedenen klinischen Studien zum Nachweis von freiem VT im Stuhl eingesetzt (KARMALI et al., 1985a; RITCHIE et al., 1992). Dabei zeigte er sich auch den kulturellen Methoden überlegen (RITCHIE et al., 1992). Der Nachweis von VT über den Verozelltest, aber auch mit HeLa-Zellen, wurde im Rahmen der Evaluierung anderer phänotypischer Nachweissysteme vielfach als „Goldstandard“ angesehen (DOWNES et al., 1989; ASHKENAZI et al., 1989; KARMALI, 1989).

Andere bakterielle Toxine können ebenso einen cytotoxischen Effekt bei Verozellen hervorrufen. Auch das Cytotoxin von *Clostridium difficile* (LUZZI et al., 1992) kann cytopathische Effekte in Verozellen hervorrufen und somit zu falsch-positiven Ergebnissen führen, gerade wenn die Patienten unter Antibiose stehen und in diesem Falle das Wachstum von *Clostridium difficile* im Darm begünstigt wird. Insofern ist es in jedem Falle notwendig, daß die nachgewiesenen cytotoxischen Effekte durch spezifische neutralisierende Antikörper aufgehoben werden, um die Spezifität abzusichern.

2.6.1.2 Kulturelle Verfahren

Das Ziel kultureller Verfahren ist die Anzucht des gesuchten Bakteriums. Hierzu wurden in der Vergangenheit verschieden supplementierte Nährmedien für die selektive Anreicherung auf festen wie auch in flüssigen Nährmedien entwickelt. Für die präsumtive Identifizierung von *E. coli* wurde hierzu z. B. von FENG und HARTMAN (1982) ein fluorogener Assay entwickelt, der 1,4-Methyl-Umbeliferyl- β -Glucuronid (MUG) in Lauryl-Tryptose-Bouillon enthielt. Dieser Assay ermöglicht den Nachweis der β -D-Glucuronidase innerhalb von 24 Stunden. Die β -Glucuronidase wird von 92 bis 96 % aller *E. coli*-Stämme gebildet (BÜLTE und REUTER, 1989; FENG und HARTMAN, 1982; THOMPSON et al., 1990) und wurde somit als ausreichend sensitives und spezifisches Nachweissystem für *E. coli* angesehen.

Der Nachweis β -Glucuronidase-negativer Stämme von *E. coli* des Serovars O157 ist in Verbindung mit der fehlenden Sorbitfermentierung möglich. SZABO et al. (1986) setzten für die Untersuchung auf *E. coli* O157-Stämme einen solchen Sorbitol- und MUG-haltigen Nährboden ein. Sie supplementierten das Medium überdies mit Gallosalzen zur Unterdrückung unerwünschter Begleitflora. Durch Zusatz von NaCl konnte eine höhere Temperaturtoleranz für die gesuchten Spezies erreicht werden. Des weiteren setzten sie Tryptophan zu, um durch die für *E. coli* spezifische Indol-Reaktion eine weitere schnelle Bestätigung zu erhalten. Hierdurch erreichten SZABO und Mitarbeiter ohne Anreicherung aus 10 g Probenmaterial bei einem Inokulum von ca. 10^2 KbE/g eine Wiederfindung von über 90 %.

HARRIS et al. (1985) setzten einen mit Sorbitol supplementierten Selektiv-Nährboden ein, um das „Screening“ auf *E. coli* O157:H7 zu erleichtern. MARCH und RATNAM (1986) verfolgten einen ähnlichen Ansatz, indem sie dem herkömmlichen MacConkey-Agar statt Laktose 1 % D-Sorbitol zusetzten. Sie ermittelten in einer Feldstudie, daß der Sorbitol-MacConkey-Agar (SMAC) eine Spezifität von 100 % und eine Sensivität von 85 % aufweist. Damit war er für die Untersuchung auf *E. coli* O157 dem herkömmlichen MacConkey-Agar deutlich überlegen, da dort eine wesentlich größere Zahl verschiedener Spezies eine *E. coli* vergleichbare Koloniemorphologie aufwiesen. OKREND et al. (1990a) setzten den gleichen Agar zur Untersuchung von Rindfleisch auf *E. coli* O157 ein, führten jedoch zuvor eine Anreicherung mit 25 g Fleisch in modifizierter E. coli Bouillon mit Novobiocin (mEC + N) durch, wobei sie nach einer

Anreicherungszeit von 24 Stunden mit der immunomagnetischen Separation (IMS) eine Nachweisgrenze von bis zu 0,6 Zellen/g Lebensmittel erreichen.

HALDANE et al. (1986) postulierten als weitere biochemische Marker Ornithin und Lysin, die beide von den pathogenen Serovaren *E. coli* O157:H7 und *E. coli* O157:H-decarboxyliert werden. Die Spezifität konnte so nochmals um 33,6 % gesteigert werden. Als weitere Modifikation des SMAC setzten CHAPMAN et al. (1991) zusätzlich zu Sorbitol auch Rhamnose als weiteren Zucker zu und Cefixim zur Unterdrückung anderer Sorbitol-negativer Spezies wie *Proteus* spp. Sie konnten damit die Zahl weiter zu untersuchender Proben auf weniger als die Hälfte reduzieren. ZADIK et al. (1993) setzten SMAC neben Cefixim auch Kalium-Tellurit (CT-SMAC) zu, um eine weitere Reduktion der Begleitflora zu erreichen. Sie konnten in einer Feldstudie mit Hilfe dieses Agars 26 Isolate von *E. coli* O157 bestätigen, im Vergleich zum SMAC, mit Hilfe dessen nur 9 Stämme isoliert werden konnten. Auch der Zusatz von Salicin und 4-Methylumbelliferyl- β -D-Galaktopyranosid zum SMAC für den Nachweis der β -Galactosidase ergab eine höhere Selektivität bei der Untersuchung von Radieschensprossen auf *E. coli* O157 als der CT-SMAC (FUJISAWA et al., 2000).

Der spezifische Nachweis von *E. coli* O157 über fehlende Sorbit-Fermentation und/oder β -Glucuronidase-Aktivität wird jedoch dadurch erschwert, daß es auch innerhalb des Serovars O157 Stämme gibt, die Sorbit und/oder MUG fermentieren können (KARCH et al., 1990 und 1993; AMMON et al., 1999).

Eine weitere Variante zum Nachweis der β -Glucuronidase-Aktivität wurde von OKREND et al. (1990a) beschrieben, indem sie SMAC als weiteres Substrat 5-Bromo-4-Chloro-3-Indoxyl- β -D-Glucuronid (BCIG) zusetzten. Durch dieses chromogene Nährmedium war es ihnen möglich, die Zahl der falsch positiv identifizierten Kolonien im Vergleich zum SMAC um 36 % zu reduzieren. Auch sie setzten als Anreicherung mEC + N mit anschließender IMS ein und konnten somit eine Nachweisgrenze von 0,7 *E. coli* O157:H7/g Lebensmittel erreichen. Die Eignung eines weiteren chromogenen Nährbodens wurde von BETTELHEIM (1998) evaluiert, indem er verschiedene Serovare von *E. coli* auf ihre Koloniemorphologie und Farbreaktion auf dem CHROMagar® O157 prüfte. Er konnte zeigen, daß EHEC O157 mit typischem Farbumschlag wuchsen, während die anderen EHEC-Serovare nicht von denen der VT-negativen zu unterscheiden waren. Die Eignung des BCM® O157:H7 prüften RESTAINO et al. (1999). Sie wiesen sowohl aus gespikten Proben als auch aus Feldproben bei Ansatz aus der gleichen Anreicherung in mit anschließender IMS die

Überlegenheit des BCM[®] O157:H7 gegenüber dem SMAC mit BCIG nach. Dem BCM[®] O157:H7 wurde ein chromogenes Substrat für die β -Galactosidase zugesetzt. Es wurde ein um das dreifache niedrigerer Anteil falsch positiver Kolonien ermittelt.

Einschränkend auf die Sensivität von Nährmedien kann sich der Zusatz von Cefixim- und/oder Kalium-Tellurit auswirken. MACRAE et al. (1997) konnten bei der Prüfung von 60 verschiedenen *E. coli* O157-Isolaten zeigen, daß mehrere Stämme empfindlich gegenüber beiden Zusätzen waren. Die Empfindlichkeiten lagen bei den Stämmen unabhängig voneinander vor, so daß bei Zusatz beider Hemmstoffe zu einem Nährmedium (z. B. CT-SMAC) mehrere Stämme in ihrem Wachstum gehemmt worden wären. Dies könnte nach Aussage der Autoren der Grund für die geringen Isolierungsraten dieses Serovars aus Lebensmitteln sein, da hier die Bakterien durch den Herstellungsprozeß zusätzlich geschädigt sein können. Als weiteres Hemmnis bei der Isolierung von *E. coli* O157 aus Lebensmitteln hat sich eine vorhergehende Erhitzung des Lebensmittels ergeben. So wachsen hitzegeschädigte Zellen auf SMAC mit Novobiocin-Zusatz (MSMA) wesentlich schlechter an, als auf nicht selektiven Nährmedien. Auch andere Selektivnährmedien wirkten sich nachteilig auf die Wiederfindungsrate aus, jedoch nicht in dem Maße wie SMAC mit Novobiocin-Zusatz (CLAVERO et al., 1995). Eine Methode zur besseren Isolierung hitze- und kältegeschädigter Zellen beschrieben McCLEERY und ROWE (1995), die eine 2-stündige Inkubation der Probe auf Tryptose-Soja-Agar mit anschließender Überschichtung mit MSMA durchführten und so eine signifikant bessere Wiederfindungsrate nach Erhitzung der Zellen (42°C/60 Min) ermittelten. Auch der Zusatz von 1000 U Katalase zum Tryptose-Soja-Agar verbesserte die Wiederfindung. BLACKBURN und McCARTHY (2000) empfehlen sogar eine weitere nicht selektive Voranreicherung, die über eine Revitalisierung der Zellen zu einem um das 10-fache verbesserten Nachweis für *E. coli* O157 führen soll. Eine Möglichkeit, Verotoxin-positive Stämme von Verotoxin-negativen Stämmen aufgrund biochemischer Indikator-Reaktionen unterscheiden zu können, sahen THOMPSON et al. (1990) im Nachweis Sorbitol-negativer und MUG-positiver *E. coli* O157. Dies konnte jedoch aufgrund weiterer erhobener Daten aus Feldstudien nicht von anderen Autoren bestätigt werden (GUNZER et al., 1992; SCOTLAND et al.; 1991; HAYES et al., 1995).

Grundsätzlich ist festzuhalten, daß es bei dem Einsatz von Nährmedien, die eine präsumtive Erfassung fraglicher Stämme aufgrund ihrer biochemischen Eigenschaften erlauben, zu einer Untersuchung auf das O157-Antigen kommen muß. In verschiedenen Studien wurde gezeigt, daß auch andere *Enterobacteriaceae* wie z. B.

Hafnia alvei oder *Proteus vulgaris* auf diesen Nährböden mit einer vergleichbaren Koloniemorphologie wachsen können. Zur Überprüfung eignen sich sowohl kommerziell erhältliche polyklonale Seren gegen das O157-Antigen, als auch mit Antikörpern beschichtete Latexpartikel (CHAPMAN, 1989; MARCH und RATNAM, 1989; SOWERS et al., 1996). Bei der Untersuchung auf das O157-Oberflächenantigen mit Hilfe polyklonaler Antikörper wurden jedoch Kreuzreaktionen mit verschiedenen anderen Bakterien wie z. B. *Escherichia hermannii*, *E. coli* O7, *E. coli* O116, *Brucella* spp. oder auch *Citrobacter freundii* (BORCZYK et al., 1987, LIOR et al., 1987; ALEKSIC et al., 1992, STUART et al., 1992; BETTELHEIM et al., 1993) nachgewiesen. Maskierte Oberflächenantigene können durch Aufkochen der Bakterien bzw. der Bakteriensuspension freigesetzt werden, um so falsch positiven Reaktionen durch Autagglutination vorzubeugen, jedoch erscheint dies im Zuge der Routinediagnostik als zeitlich zu aufwendig. Bei der Serotypisierung, wie sie näher in Kapitel 2.8.1.1 beschrieben ist, sollte dies in jedem Fall durchgeführt werden.

Einen anderen Ansatz wählten BEUTIN et al. (1994a und 1996a), indem sie die Fähigkeit pathogener EHEC zur Bildung von Enterohämolysin nutzten, um unabhängig vom Serovar die pathogenen Stämme von den apathogenen unterscheiden zu können. Dies ging auf die Feststellung zurück, daß die Fähigkeit der VT-Bildung eng assoziiert ist mit der Produktion von Enterohämolysin (BEUTIN et al., 1989). Mit Hilfe des Merkmals Enterohämolysin-Produktion konnten BEUTIN et al. (1994a) über 90 % der VTEC einschließlich der des Serovars O157 isolieren. Aufgrund dieser Ergebnisse bewerteten sie den Enterohämolysin-Agar für die Untersuchung auf VTEC gegenüber den Sorbitol-haltigen Nährböden als überlegen, die lediglich für ein Serovar geeignet sind. In Kombination mit dem VTEC-RPLA (s. dazu Kapitel 2.5.1.3) erwies sich der Enterohämolysin-Agar als geeignete Screening-Methode mit einer Bestätigung innerhalb von 72 bis 96 Stunden (BEUTIN et al., 1996a).

2.6.1.3 Immunoassays

Der Einsatz immunologischer Nachweisverfahren bietet die Möglichkeit, in kurzer Zeit große Probenmengen spezifisch auf Erreger zu untersuchen. Als Antigene können verschiedene Stoffwechselprodukte wie Toxine oder Oberflächenantigene eingesetzt werden. Eine weitere Möglichkeit, die allerdings bei der Untersuchung von Lebensmitteln keine Bedeutung hat, ist der Nachweis von Antikörpern in Körperflüssigkeiten von Patienten. Bei der Untersuchung von Lebensmitteln sind der „Sandwich-ELISA“ und der kompetitive ELISA die gebräuchlichsten Konfigurationen. Im

Rahmen der Untersuchung auf VTEC/EHEC bzw. freies VT wurden in der Vergangenheit verschiedene Nachweissysteme etabliert.

Zum Nachweis der Antigene werden die Mikrotiterplatten beim „Sandwich-ELISA“ mit spezifischen monoklonalen oder polyklonalen Antikörpern der Klasse IgG beschichtet, die nach Inkubation das nachzuweisende Antigen binden. Im Falle von Toxinen können ebenso für das nachzuweisende Toxin spezifische Rezeptoren als Beschichtung gewählt werden. Die Detektion des Antigens erfolgt über einen polyklonalen oder monoklonalen Antikörper, der für ein weiteres Epitop des Antigens spezifisch ist. Sichtbar wird dieser Antigen-Antikörper-Komplex durch eine enzymatische Reaktion, die einen Farbumschlag bewirkt. Das Enzym ist entweder an den detektierenden Antikörper oder auch im „Anti-Spezies-Konjugat“ an den Anti-Spezies-Antikörper gekoppelt. Die Auswertung beim qualitativen Nachweis kann sowohl visuell als auch photometrisch erfolgen, beim quantitativen Nachweis gelingt sie in der Regel nur photometrisch.

Ausgehend von der Produktion spezifischer monoklonaler Antikörper wurden verschiedene **Verfahren zum Nachweis des Verotoxins** entwickelt. Einige monoklonale Antikörper zum Nachweis des VT sind in Tabelle 10 aufgeführt.

Tabelle 10 Monoklonale Antikörper gegen Verotoxine

Bezeichnung	Isotyp	VT	Untereinheit	Quelle
4 D 3	IgG 1	Shiga/1(?)	B	DONOHUE-ROLFE et al., 1984
13 C 4	IgG 1	1	B	STROCKBINE et al., 1985
16 E 6	IgG 1	1	B	
19 G 8	IgG 1	1	k. Angaben	
11 F 11	IgM	2	A	
11 G 10	IgM	2	A	PERERA et al., 1988
2 E 1	IgM	2	A	
10 E 10	IgM	2	A	
11 E 10	IgG 1	2/2v	A	
BC5 BB12	IgG 1	2	B	
DC1 EH5	IgG 1	2	A/A ₁	DOWNES et al., 1988
EA5 BA3	IgG 1	2	B	
ED5 DF3	IgG 1	2	B	
GB6 BA4	IgG 1	2	A/A ₁	
4 D 1	IgG 1	Shiga/2	B	
2 B 1	IgG2b	2	B	DONOHUE-ROLFE et al., 1989
3 D 1	IgM	Shiga/2	A	
4 D 5	IgM	Shiga/2	A	
ICT7	IgG	Shiga/1	k. Angaben	
				QADRI et al., 1996

Auch wurden verschiedene polyklonale Antikörper zum Nachweis des VT beschrieben, wobei zur Antiserengewinnung meist Kaninchen immunisiert wurden (DOWNES et al., 1988, DOWNES et al., 1989, KARMALI, 1989). Mit Hilfe dieser für VT1 und/oder VT2 spezifischen Antikörper wurden sowohl Rezeptor-spezifische Enzyme-linked Immunosorbent Assays (RELISA) als auch „Sandwich-ELISAs“ entwickelt. Weiterhin wurden die beschriebenen monoklonalen Antikörper auch zur Isolierung von VTEC eingesetzt, indem sie sezerniertes Verotoxin auf Membranen detektierten, beispielsweise bei Verfahren wie dem Immunoblot (HULL et al., 1993; TIMM et al., 1996). Eine Auswahl der beschriebenen Nachweis- und Isolierungssysteme ist in Tabelle 11 dargestellt.

Tabelle 11 Immunologische Nachweis- und Isolierungssysteme für VTEC

Bezeichnung	Nachweis von	Beschichtung	Detektion	Konjugat	Sens.	Spez.	Proben ¹	Quelle
Colony ELISA mit Polymyxin B-Extraktion	VT1	Kolonien auf NC-Membran	mAk 13C4	POD-goat-anti-mouse IgG + IgM		100 %		PERERA et al., 1988
	VT2		mAk 11E10			100 %		
	VT2		mAk 2E1			100 %		
Sandwich-ELISA	VT1	mAk 13C4	pAk R174	AP-goat-anti-rabbit IgG	200 pg	100 %		DOWNES et al., 1989
	VT2	mAk BC5 BB12	pAk TB-6/24		75 pg	100 %		
Gb ₃ ELISA	ST	Gb ₃	mAk 13C4	POD-rabbit-anti-mouse IgG	200 pg	100 %		ASHKENAZI et al., 1989
	VT1					100 %		
RELISA	VT1	Lyso-Gb ₃	pAk anti VT1 (IgG-Frakt.)	POD-anti-rabbit IgG	5 pg	98 %		BASTA et al., 1989
			mAk 13C4	POD-anti-mouse IgG				
RELISA	ST	P ₁ gp	pAk rb anti VT1 (IgG-Frakt.)	AP-goat-anti-rabbit IgG	80 pg	100 %		ACHESON et al., 1990
		mAk 4D3	pAk rb anti VT1 (IgG-Frakt.)	AP-goat-anti-rabbit IgG	38 pg	100 %		
	VT2	P ₁ gp	pAk ms anti VT1 (IgG-Frakt.)	AP-goat-anti-mouse IgG	132 pg	100 %		

Tabelle 11 Immunologische Nachweis- und Isolierungssysteme für VTEC (Fortsetzung)

Bezeichnung	Nachweis von	Beschichtung	Detektion	Konjugat	Sens.	Spez.	Proben ¹	Quelle
RELISA	VT1/VT2	P ₁ gp	pAk rb anti VT1/VT2 (IgG-Frakt.)	AP-goat-anti-rabbit IgG	160 pg	100 %		LAW et al., 1992
Colony ELISA mit Polymyxin B-Extraktion	VT1	HGMF(Wachstum) und IMAV (VT-Bindung)	mAk 11E10 mAk 11F11	POD-anti-mouse IgG	2x10 ² CD ₅₀			MILLEY und SEKLA, 1993
	VT2		mAk 13C4		2x10 ³ CD ₅₀			
Colony Blot Immunoassay	VT1	NC-Membran (VT-Bindung)	mAk 4D1/ anti VT rb pAk	AP-goat-anti-mouse/rabbit IgG	88 %	89 %	S	HULL et al., 1993
	VT2							
Sandwich ELISA	VT1	mAk 13C4	biotinylierter mAk 13C4		> 100 %	-	K	BALL et al., 1994
	VT2	mAk 11F11	biotinylierter mAk 11E10			-		
Sandwich ELISA (n. LAW et al., 1992)	VT1	P ₁ gp	pAk rb anti VT1/VT2 (IgG-Frakt.)	AP-goat-anti-rabbit IgG	100 %	99,7 %	S, S _a	LAW et al., 1994
	VT2	P ₁ gp/mAk 2B1						
Sandwich ELISA (n. BALL et al., 1994)	VT1	mAk 13C4	biotinylierter mAk 13C4				S	BALL et al., 1996
	VT2	mAk 11F11	biotinylierter mAk 11E10					
Sandwich ELISA (Premier EHEC)	VT1	mAk 4D1(?) ²	pAk rabbit	POD-anti-rabbit-IgG ²	7 pg ²	99,9 % ²	LM _a	ACHESON et al., 1996
	VT2		anti VT ²		15 pg ²			

Tabelle 11 Immunologische Nachweis- und Isolierungssysteme für VTEC (Fortsetzung)

Bezeichnung	Nachweis von	Beschichtung	Detektion	Konjugat	Sens.	Spez.	Proben ¹	Quelle
Sandwich ELISA (Premier EHEC)	VT1/VT2	s.o.	s.o.	s.o.	30 %	98,4 %	S (EIA)/ S _a	GERRITZEN et al., 1996
Sandwich ELISA (Alexon, Virotech)	VT1/VT2				40 %	98,6 %	(VZT)	(Standard war Verozelltest)
Immunoblot BgVV Dessau	VT1	NC-Membran	mAk 13C4	AP-goat-anti- mouse IgG			S/S _a /	TIMM et al., 1996
	VT2		mAk 11E10				LM _a	
Sandwich ELISA (n. BALL et al., 1994)	VT1	mAk 13C4	biotinylierter mAk 13C4		76,7 %	91,9 %	K _a (F.- Proben)	RANDALL et al., 1997 (Standard war Verozelltest)
					81,5 %	90,7 %	K _a (Inf- Vers)	
	VT2	mAk 11F11	biotinylierter mAk 11E10		100 %	100 %	LM _a	
Sandwich ELISA (Novitec™-ELISA)	VT1/VT2				80,9 %	98,9 %	S	PARK et al., 1997 (Standard war HISS EIA)
					100 %	100 %	S _a	
Sandwich ELISA (Alexon, Virotech)	VT1/VT2				30,0 %	-	S	GERRITZEN et al., 1998 (Standard war Verozelltest)
					73,3 %	-	S _a	

Tabelle 11 Immunologische Nachweis- und Isolierungssysteme für VTEC (Fortsetzung)

Bezeichnung	Nachweis von	Beschichtung	Detektion	Konjugat	Sens.	Spez.	Proben ¹	Quelle
Sandwich ELISA (Premier EHEC)	VT1/VT2	s.o.	s.o.	s.o.	100 %	99,7 %	S _a	KEHL et al., 1997 (Vgl. zu SMAC)
RELISA	VT1/VT2	Gb ₃ /Gb ₄	mAk 11E10 u. 13C4	POD-anti-mouse IgG			K _a /LM _a	TIMM et al., 1998
Sandwich ELISA	ST/VT1	mAk ICT7	rb pAk	?	100 pg	-	S	QADRI et al., 1996

¹ S= Nachweis aus Stuhlproben K= Nachweis aus Kotproben

LM= Nachweis aus Lebensmittelproben

?_a=? Nachweis jeweils nach Anreicherung

² Daten nach den Angabe des Herstellers Meridian Diagnostics, Inc.

Der Einsatz dieser immunologischen Nachweis- und Isolierungssysteme ermöglicht die Untersuchung auf alle Verotoxin-bildenden Bakterien. Dies läßt ihren Einsatz insbesondere in Deutschland, aufgrund der Prävalenz verschiedener Serovare bei VTEC/EHEC-assoziierten Erkrankungen, als eine Methode der Wahl erscheinen. In vergleichenden Untersuchungen konnte der Einsatz verschiedener ELISA's gegenüber der Standardmethode, dem Verozelltest, bestehen und führte zu vergleichbaren Ergebnissen (GERRITZEN et al., 1996; GERRITZEN et al., 1998; RANDALL et al., 1997). Die Untersuchung auf Stämme mit geringer Toxin-Expression mittels immunologischer Nachweisverfahren fällt jedoch nicht selten falsch negativ aus, da die gebildete Verotoxin-Menge zu gering ist, um in ELISA oder Immunoblot detektiert werden zu können. Eine Möglichkeit, die Bildung von Verotoxin zu induzieren, ist der Zusatz von Mitomycin C zur Anreicherungsbouillon bzw. Nährboden (AL-JUMAJJI et al., 1992, LAW et al., 1992, HULL et al., 1993). Der Zusatz von Mitomycin C führte bis zu einer 100-fach stärkeren Toxinexpression. Problematisch ist der Zusatz dieses „Enhancers“, da er aus toxikologischer Sicht nicht unproblematisch ist.

Eine weitere Methode, die freigesetzte Toxinmenge für den Nachweis zu erhöhen ist, die vegetativen Zellen mit Polymyxin B zu lysieren und so das im Cytoplasma befindliche VT freizusetzen (KARMALI et al., 1985b). Auch der Zusatz subinhibitorischer Konzentrationen eines Trimethoprim-Sulfamethoxazol-Gemisches führte im HeLa-Zelltest zu einer erhöhten Toxin-Expression (KARCH et al., 1986). Diese Verfahren erreichten jedoch nicht die Verstärkung der Expression wie der Zusatz von Mitomycin C. Nach STAHL und BÜLTE (2000) scheint Carbadox als alternativer Enhancer vergleichbar induzierende Eigenschaften wie das Mitomycin C zu haben.

Daneben wurden jedoch auch diverse **Serovar-spezifische Nachweisverfahren für *E. coli* O157** entwickelt. Das Prinzip dieser phänotypischen Nachweissysteme, insbesondere für *E. coli* O157, basierte sowohl auf serologischen als auch kulturellen Eigenschaften der Mikroorganismen. Der Nachweis einzelner Serovare mit Hilfe der Immunomagnetischen Separation (IMS), die insbesondere die Isolierung über die kulturellen Eigenschaften ermöglicht, wird gesondert in Kapitel 2.7.1.4 beschrieben. Diese Methode ist ebenso den Serovar-spezifischen Nachweisverfahren zuzuordnen. Tabelle 12 enthält eine Übersicht über einige Nachweissysteme für *E. coli* O157. Diese basieren auf monoklonalen Antikörpern gegen *E. coli* O157 (z. B. PADHYE und DOYLE, 1991a) oder das O111-Antigen (z. B. RIVERA-BETANCOURT und KEEN, 2000)

Tabelle 12 Übersicht über publizierte Nachweissysteme für *E. coli* O157 sowie die mit ihnen untersuchten Probenmaterialien

Bezeichnung	Nachweis von	Nachweis durch	Probenmaterial	Referenz
O157 MAb	O157-Antigen	-	-	TODD et al., 1988
HGMF ³ -Enzyme-Labeled-Antibody Procedure	<i>E. coli</i> O157	O157 mAk	Fleisch und Fleischsaft	
Direkter Blot ELISA ⁴ 3M Petrifilm TM Test Kit HEC	<i>E. coli</i> O157	?	Fleisch	OKREND et al., 1990
ELISA	<i>E. coli</i> O157	mAk 4E8C12	Hackfleisch, Rohmilch, pasteurisierte Milch, fettarme Milch, Cheddar, Schweizer Käse, Bruchkäse	PADHYE und DOYLE, 1991
Dipstick Immunoassay	<i>E. coli</i> O157	?	Hackfleisch	KIM und DOYLE, 1992
Direct Immunofluorescence stain	<i>E. coli</i> O157	Schaf pAk ² gegen O157	Stuhl	PARK et al., 1994
ELISA „EHEC-Tek”	<i>E. coli</i> O157	mAk 4E8C12	Fleisch	JOHNSON et al., 1995
ELISA, LMD Laboratories	<i>E. coli</i> O157	mAk gegen O157-Antigen	Stuhl	DYLLA et al., 1995
Dipstick Immunoassay AMPCOR Dipstick <i>E. coli</i> O157:H7 Kit	<i>E. coli</i> O157	?	Hamburger Patties, Fleisch, Wischproben	JOHNSON et al., 1995b (Standard war 3M Petrifilm TM Test Kit HEC)

Tabelle 12 Übersicht über publizierte Nachweissysteme für *E. coli* O157 sowie die mit ihnen untersuchten Probenmaterialien (Fortsetzung)

Bezeichnung	Nachweis von	Nachweis durch	Probenmaterial	Referenz
ELISA, LMD Laboratories	<i>E. coli</i> O157	mAk gegen O157-Antigen	Stuhl	PARK et al., 1996
ELISA EHEC-Tek	<i>E. coli</i> O157	?	Hackfleisch	CHAPMAN und SIDDONS, 1996
„solid phase fluorescent capillary immunoassay“	<i>E. coli</i> O157	anti- <i>E. coli</i> O157:H7 pAk	Fleisch, Apfel Zider	CZAJKA und BATT, 1996
<i>E. coli</i> O157 Visual EIA, Tecra Diagnostics	<i>E. coli</i> O157	?	Rinderkotproben	CHAPMAN et al., 1997
Immunocapture System, Tecra Diagnostics				
VIDAS TM <i>E. coli</i> O157	<i>E. coli</i> O157	Anti- <i>E. coli</i> O157 Antikörper	Rohmilchkäse, Geflügel, Rohwurst, Fleisch	VERNOZY-ROZAND et al., 1997
Automatisierter ELISA EiaFoss	<i>E. coli</i> O157	?	Rohes Hackfleisch	SCHALCH und STOLLE, 2000
Durchflußzytometrie	<i>E. coli</i> O157	anti- <i>E. coli</i> O157:H7 pAk	Nachweis aus Reinkulturen	KUSUNOKI et al., 2000

¹: monoklonaler Antikörper

²: polyklonaler Antikörper

³: Hydrophobic Grid Membrane Filter

⁴: Enzyme Linked Immunosorbentassay

Der Einsatz monoklonaler Antikörper eröffnete eine Vielzahl methodischer Ansätze zum Nachweis und zur Isolierung von *E. coli* O157. Zum einen ist durch die Entwicklung spezifischer Sandwich-ELISAs der spezifische Nachweis z. B. des O157-Antigens möglich (PADHYE und DOYLE, 1991b; PARK et al., 1996; RIVERA-BETANCOURT und KEEN, 2000). Zum anderen wurde der direkte mikroskopische Nachweis vegetativer Zellen (PARK et al., 1994) ermöglicht. Der Nachweis und die direkt anschließende Isolierung wurde von JOHNSON et al. (1995b) mit dem PetrifilmTMKit HEC durchgeführt. Ebenso wurden auch automatisierbare Nachweissysteme wie das „VIDASTM *E. coli* O157“-System (VERNOZY-ROZAND et al., 1997) oder das EiaFoss System (SCHALCH und STOLLE, 2000) entwickelt. Den Nachweis innerhalb von 20 Minuten ermöglicht z. B. der Singlepath[®] *E. coli* O157 als „Gold Labeled Immunosorbent Assay-“ (GLISA-) Schnelltest. Durch den Einsatz immunologischer Nachweissysteme wurde die Untersuchung großer Probenmengen wesentlich vereinfacht und die Automatisierung gefördert.

Der Einsatz dieser Methoden war sowohl für die Untersuchung von Kot- und Stuhlproben geeignet (DYLLA et al., 1995; CHAPMAN et al., 1997), als auch zum Nachweis von *E. coli* O157 in Fleisch, fermentierten Fleischerzeugnissen, Milch und Milchprodukten und auch pflanzlichen Lebensmitteln wie Petersilie und Apfel-Zider (PADHYE und DOYLE, 1991b; JOHNSON et al., 1995a; CHAPMAN und SIDDONS, 1996; CZAJKA und BATT, 1996; VERNOZY-ROZAND et al., 1997, BLACKBURN und McCARTHY, 2000). Die Nachweisgrenze lag abhängig vom untersuchten Lebensmittel und dem verwendeten Anreicherungsmedium bei einer Zelle/g Lebensmittel bis hin zu 2 KBE/10 g Lebensmittel bzw. ein bis achtzig Zellen pro 25 g Lebensmittel.

Grundsätzlich ist es für den Nachweis von *E. coli* O157 aus Lebensmitteln notwendig, einen Anreicherungsschritt vorzuschalten. Der direkte Nachweis aus dem Lebensmittel erscheint vor dem Hintergrund der sehr geringen infektiösen Dosis wenig sinnvoll, da die Nachweisgrenze ohne Anreicherung nicht ausreichend ist (DOYLE und SCHOENI, 1987; TODD et al., 1988; PADHYE und DOYLE, 1991; VERNOZY-ROZAND, 1997). Darüber hinaus konnten BLACKBURN und McCARTHY (2000) beim Vergleich verschiedener Methoden zur Isolierung von *E. coli* O157:H7 nachweisen, daß durch die Vorschaltung einer nicht selektiven Anreicherung die Nachweisgrenze wesentlich zu steigern ist. Dies zeigt sich insbesondere dann, wenn es um den Nachweis von *E. coli* O157 aus fermentierten oder gesäuerten Lebensmitteln ging, da hier von einer Schädigung der Bakterienzellen durch den Fermentations- oder Säuerungsprozeß

auszugehen ist. Dadurch seien in diesen Produkten bei direkter Selektivanreicherung falsch negative Ergebnisse zu erwarten.

Für die Untersuchung von Proben vom nordamerikanischen Kontinent wie auch der britischen Insel erscheinen diese Nachweismethoden für den Einsatz in der Routinediagnostik geeignet, da dort das vorherrschende Serovar *E. coli* O157 ist. Auf dem europäischen Kontinent, insbesondere in Deutschland, tritt jedoch eine Vielzahl verschiedener Serovare bei humanen Erkrankungen auf. Somit wäre für Deutschland mittels dieser Nachweissysteme nur ein Teil der Infektionsursachen nachweisbar, so daß diese Methoden als alleiniges Diagnostikum nicht ausreichend sind (KARCH et al., 1996).

2.6.1.4 Immunomagnetische Separation

Im Bereich der Lebensmitteldiagnostik wird die Immunomagnetische Separation (IMS) bisher zum schnellen Nachweis von Lebensmittelinfektionserregern wie *E. coli* O157, Listerien oder Salmonellen eingesetzt. Grundsätzlich wird vorher ein Anreicherungsschritt durchgeführt. Für den Nachweis von EHEC stehen kommerziell erhältliche Testsysteme wie z. B. die Dynabeads[®] anti-*E. coli* O157 der Firma Dynal (Norwegen) zur Verfügung. Für den Nachweis anderer Serogruppen müssen die paramagnetischen Partikel („beads“) selbst hergestellt werden. Bei diesen „beads“ handelt es sich um uniforme superparamagnetische Polymere, die im Durchmesser ca. 2,8 µm groß sind. Auf der gesamten Oberfläche sind diese Kügelchen mit einer magnetischen Schicht aus $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ und Fe_3O_4 versehen. Auf dieser befindet sich eine polymere Schicht, die eine gleichmäßige Beschickung der Oberfläche mit O157-Antikörpern möglich macht. Weiterhin bewirkt eine hydrophobe Eigenschaft, daß sich Bakterien, die sich in einem flüssigen bzw. wäßrigen Medium befinden, leichter an die Antikörper auf den „beads“ binden können. Die superparamagnetische Eigenschaft bewirkt, daß die „beads“ nur magnetische Eigenschaften ausprägen, wenn sie einem magnetischen Feld ausgesetzt sind. Da durch ein „bead“ aber mehrere Bakterien gebunden werden können, eignet sich die IMS nicht für den quantitativen Nachweis von *E. coli* O157. Es handelt sich hierbei um ein rein qualitatives Nachweisverfahren im Sinne eines „presence/absence“-Test.

Der prinzipielle Ablauf der IMS besteht darin, daß die nach einem Inkubationsschritt an die Magnetpartikel gebundenen Bakterien einem magnetischen Feld ausgesetzt werden. Dadurch werden die zunächst homogen in der Anreicherungsbouillon verteilten Bakterien-Magnetpartikel-Komplexe an einer durch das magnetische Feld bestimmten

Fläche angesammelt. Im Folgenden kann durch Waschschritte die Aufreinigung erfolgen. Im Ergebnis erreicht man dadurch keine Reinkultur, sondern lediglich eine Aufkonzentrierung der Bakterien, die das gesuchte Antigen aufweisen. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, daß es durch die hydrophoben Eigenschaften der „beads“ zu einer weitgehenden Abscheidung fettiger Bestandteile, z. B. des untersuchten Lebensmittels kommt. Die IMS führt zu einer deutlichen Reduzierung der Begleitflora. Im Vergleich zu anderen kulturellen Methoden erreicht man mit der IMS eine Reduktion der Nachweisgrenze bis zum Faktor 100. Dies bedeutet, daß auch sehr geringe Zellzahlen nachgewiesen werden können (WRIGHT et al., 1994; WEGANT et al., 1995). Nach sechsstündiger Anreicherung und IMS mit anschließender Subkultivierung können *E. coli* O157 bereits innerhalb von 24 Stunden präsumptiv nachgewiesen werden. In verschiedenen Vergleichsstudien wurde von diversen Autoren die Zuverlässigkeit der Dynabeads® anti-*E. coli* O157 als auch die Eignung der IMS zum Nachweis von *E. coli* O157 aus Lebensmitteln belegt (FRATAMICO et al., 1992; MORTLOCK, 1994; BENNETT et al., 1996a und b). Der große Vorteil der IMS liegt in der Möglichkeit, verschiedene Methoden mit ihr zu kombinieren. Eine Übersicht zu den kulturellen, immunologischen und molekularbiologischen Nachweismethoden, die einen erfolgreichen Nachweis von *E. coli* O157 erbrachten, enthält Tabelle 13.

Tabelle 13 Nachweis von *E. coli* O157 in Lebensmittel mit der immunomagnetischen Separation (IMS) und deren Kombination mit kulturellen, immunologischen und molekularbiologischen Methoden

Anreiche- rungsmedium (Akronym)	Inkubations- temperatur (°C)	Inkuba- tionszeit (h)	Nachweissystem/ Subkultivie- rungsmedium	Quelle
mEC + N ¹	37	6/24	SMAC ²	OKREND et al., 1990a; OKREND et al., 1992
BPW-VCC ³	37	6	CT-SMAC ⁴	CHAPMAN et al., 1994
mTSB ⁵	42	18	SMAC	MORTLOCK, 1994
BPW-VCC	37	6	CT-SMAC ⁴	WRIGHT et al., 1994
EEB ⁶	37	6	CT-SMAC ⁴	WEAGANT et al., 1995
mEC + N	37	ü. N.	EHEC Tek (Organon Teknika)	JOHNSON et al., 1995b
mTSB	42	6	CT-SMAC	BOLTON et al., 1995
mEC + N	37	6	SMAC, CT-SMAC	BENNETT et al., 1996a
mTSB + N ⁷	42	6	CT-SMAC	BOLTON et al., 1995
mTSB + N	37	7	“Solid phase fluorescent immunoassay”	CZAJKA und BATT, 1996
mEC + N	37	6	CT-SMAC	CHAPMAN und SIDDONS, 1996
mEC + N	42	18	CT-SMAC	FUKUSHIMA und GOMOYODA, 1999
mEC+N/ TSB+A ⁸	37/37	6/18	EHEC Tek (Organon Teknika)	OKREND et al., 1990b

Tabelle 13 Nachweis von *E. coli* O157 in Lebensmittel mit der immunomagnetischen Separation (IMS) und deren Kombination mit kulturellen, immunologischen und molekularbiologischen Methoden (Fortsetzung)

Anreicherungsmedium (Akronym)	Inkubations- temperatur (°C)	Inkuba- tionszeit (h)	Nachweissystem/ Subkultivie- rungsmedium	Quelle
mEC + N	37	24	Tecra <i>E. coli</i> O157 visual immunoassay/ EHEC Tek (Organon Teknika)	BENNETT et al., 1996b
-	-	-	Elektrochemi- lumineszenz	YU und BRUNO, 1996
TSB ⁹ /BRILA ¹⁰	37	6	CT-SMAC/HC- Medium ¹¹	HECKÖTTER et al., 1997a und 1997b
mEC + N	42	24	<i>E. coli</i> O157 Rapotest TM	BLAIS et al., 1997
mBPW ¹²	42	5	Direkte Epifluoreszenz Mikroskopie	RESTAINO et al., 1997

¹: modifizierte *E. coli*-Bouillon mit Novobiocin

²: Sorbitol-MacConkey-Agar

³: „Buffered Peptone Water“ (gepuffertes Peptonwasser) mit Vancomycin, Cefixim und Cefsulfodin

⁴: Cefixim-Tellurit- Sorbitol-MacConkey-Agar

⁵: modifizierte Trypton-Soja-Bouillon

⁶: „EHEC Enrichment Broth“

⁷: modifizierte Trypton-Soja-Bouillon mit Novobiocin

⁸: Trypton-Soja-Bouillon mit Acriflavin

⁹: Trypton-Soja-Bouillon

¹⁰: Brilliantgrün-Galle-Lactose-Bouillon

¹¹: „Hemorrhagic Colitis“ Medium nach Szabo

¹²: „modified buffered peptone water“ (modifiziertes gepuffertes Peptonwasser)

Der Vorteil der IMS zeigte sich vor allem bei der Untersuchung von Proben mit einem hohen Fettanteil, wie z. B. Stuhlproben. KARCH et al. (1996) verglichen PCR, Koloniehybridisierung und kulturelle Nachweisverfahren mit dem Nachweis von *E. coli* O157-Stämmen über IMS nach Anreicherung in „GN Broth Hajna“. Die Isolierung erfolgte über SMAC und CT-SMAC. Hierbei erwies sich die IMS sogar als sensitiver gegenüber der PCR und ließ bei einer coliformen Hintergrundflora von 10^7 KbE/g Stuhl den Nachweis eines um fünf Zehnerpotenzen niedriger liegenden *E. coli* O157-Gehaltes zu.

Ein wesentliches Ziel bei der Untersuchung von Lebensmitteln aber auch Stuhlproben ist es, eine Selektion der gesuchten Bakterien zu erlangen und gleichzeitig störende Einflüsse des Probenmaterials, die die Spezifität und die Sensivität des Nachweissystems beeinträchtigen können, weitestgehend zu reduzieren. Sowohl der Nachweis spezifischer Gensequenzen über PCR als auch immunologische Nachweisverfahren sind hier besonders anfällig, insbesondere wenn es sich z. B. um sehr fettreiche Lebensmittel oder auch solche mit extremen pH-Werten handelt. Hier bietet die IMS eine effektive Möglichkeit, eine Aufkonzentrierung der Zielzellen zu erlangen und gleichzeitig störende Einflüsse des Lebensmittelhomogenates zu verringern bzw. aufzuheben (JINNEMAN et al., 1995). Die IMS bietet die Möglichkeit, wenige Zellen pro 25 g Lebensmittel nachzuweisen (BENNETT et al., 1996a, WEAGNAT et al., 1995).

Ein weiterer großer Vorteil der IMS liegt in ihrer vielfältigen Kombinationsmöglichkeit mit anderen Nachweistechiken, die nicht den Nachweis über Selektivnährböden beinhalten. Es wurden sowohl Methoden wie die PCR, die DNA-Hybridisierung (CHEN et al., 1998), ein ELISA (JOHNSON et al., 1995b; CHAPMAN und SIDDONS, 1996;), der PetrifilmTM Test-Kit HEC (BENNETT et al., 1996b), der *E. coli* O157 RapotestTM (BLAIS et al., 1997) oder auch die Elektrochemilumineszenz (ECL, YU und BRUNO, 1996) erfolgreich mit der IMS kombiniert. Die „Bakterien-beads“-Komplexe können hierzu direkt den jeweiligen Testsystemen zugesetzt werden, da sie das Nachweisverfahren nicht beeinflussen (CUDJOE et al., 1993). Die IMS ist sowohl als „screening“-Methode als auch zur Isolierung präsumptiver *E. coli* O157-Kolonien geeignet. Liegt nach Durchführung eines Verfahrens, das keine Isolierung ermöglicht - beispielsweise ein ELISA -, ein positives Ergebnis vor, so kann trotzdem über das Konzentrat nach IMS, aus dem das „screening“ durchgeführt wurde, eine Isolierung mittels kultureller Methoden erfolgen. Eine Bestätigung der Ergebnisse der „screening“-Methoden ist danach in jedem Fall über eine Isolierung des Stammes möglich, zudem

noch aus dem gleichen Ansatz, aus dem die ersten Untersuchungen durchgeführt wurden (CHAPMAN und SIDDONS, 1996; RESTAINO et al., 1997).

2.6.2 Genotypische Nachweisverfahren

Im Unterschied zu den phänotypischen Nachweisverfahren basiert das Prinzip der genotypischen Nachweisverfahren auf der Identifizierung und Isolierung der gesuchten Pathovaren anhand der Detektion spezifischer Genloci. Die beiden am häufigsten eingesetzten Methoden sind die Polymerase-Kettenreaktion und die DNA-Hybridisierung. Sie sind für die gesamte Gruppe der VTEC einschließlich der EHEC gleichermaßen einsetzbar. Während diese Methoden früher vornehmlich zur weiteren Charakterisierung bereits isolierter Stämme eingesetzt wurden, kommen sie in der Lebensmittelmikrobiologie und –hygiene in zunehmendem Maße als Schnellmethoden zum Nachweis und zur Identifizierung zum Einsatz (SCHUY et al., 1998; GALLIEN et al., 1997b und 1998). Grundsätzlich läuft der Nachweis nach einem Anreicherungs- bzw. Kultivierungsschritt ab, um eine ausreichende Sensivität zu gewährleisten.

2.6.2.1 DNA-Sonden-Technik

Bei dieser Nachweismethode werden einzelne Genabschnitte mit DNA-Sonden bekannter Nukleotidsequenz hybridisiert. Diese DNA-Sonden sind mit einem Farbstoff oder radioaktiven Isotopen markiert und können dann durch Farbreaktion oder mit Hilfe von Röntgenfilmen den spezifischen Nachweis sichtbar machen. Grundsätzlich ist bei der Wahl der Gensonden zwischen Polynukleotiden und Oligonukleotiden zu unterscheiden. Durch Restriktionsverdau eines Referenzstammes entstandene Nukleotid-Sequenzen von einigen hundert bp Länge entstehen sogenannte Polynukleotide, von denen synthetisch hergestellte Oligonukleotiden von etwa 20 bp Länge unterschieden werden. Polynukleotide können auch bei unbekannter DNA-Sequenz eingesetzt werden, um Homologien verschiedener Bakterienstämme vergleichen zu können, oder, soweit das mittels dieses Polynukleotids produzierte Toxin oder Protein durch Klonierungsversuche bekannt ist, auch zum Nachweis spezifischer Gensequenzen. Die Synthese von Oligonukleotiden setzt die Kenntnis des Zielgens voraus, um dann mittels eines für dieses Gen spezifischen Abschnittes dasselbe nachweisen zu können. Diese Technik wurde zunächst als Koloniehybridisierungsverfahren zur Detektion für VTEC spezifischer Sequenzen eingesetzt, wobei zunächst die genaue Nukleotidsequenz des Zielgens nicht bekannt war. Diese Technik wurde ebenso im Rahmen von Versuchen eingesetzt, die zum Ziel

hatten, einzelne Gene in Vektoren zu transformieren und eine erneute Expression des VT zu erlangen (HUANG et al., 1986; NEWLAND et al., 1985; WILLSHAW et al., 1987). In diesen Fällen wurde die Hybridisierung zunächst zur Bestätigung der Transformation in den Vektor eingesetzt. In der Folge wurden die so entwickelten Polynukleotide, sofern sie spezifisch für die nachzuweisende Sequenz waren, im Rahmen der Diagnostik eingesetzt. So konnten LEVINE et al. (1987) mit Hilfe eines 3,4 kbp großen Fragmentes aus dem 60 MDa-Plasmid von *E. coli* O157:H7 Stamm EDL933 eine für die untersuchten EHEC-Stämme spezifische DNA-Sonde namens CVD 419 herstellen. Den Einsatz von Polynukleotiden im Rahmen der Routinediagnostik zeigten SCOTLAND et al. (1988), indem sie die von WILLHAW et al. (1985) für VT1 hergestellte 750 bp lange DNA-Sonde und für VT2 die von der gleichen Arbeitsgruppe publizierte 850 bp lange DNA-Sonde (WILLSHAW et al., 1987) verwendeten. Sie konnten eine gute Übereinstimmung der Ergebnisse zwischen VT-Expression im Verozelltest und dem Nachweis des VT-Gens in der DNA-Sonden-Technik nachweisen. Andere Restriktionsfragmente setzten NEWLAND und NEILL (1988) ein. Auch sie konnten eine sehr gute Übereinstimmung mit der phänotypischen Expression nachweisen, wobei sie zudem die hohe Spezifität dieser Methode durch Untersuchung weiterer Bakterienspezies, die keine VT-Expression hatten, demonstrierten. Diese von diesen Arbeitsgruppen publizierten Polynukleotide wurden in der Folge von weiteren Arbeitsgruppen zur Diagnostik eingesetzt. Sie fanden Anwendung in der Stuhldiagnostik (SERIWATA et al., 1988; SMITH et al., 1991; RAMOTAR et al., 1995) oder bei der Untersuchung von Lebensmitteln wie auch Kotproben von Rindern (SAMADPOUR et al., 1990; BÜLTE, 1991).

In einem weiteren Schritt wurden auf Basis der bekannten Sequenzen der Verotoxine sowie derer Subtypen Oligonukleotide synthetisiert (KARCH und MEYER, 1989a; THOMAS et al., 1990). Diese zeichneten sich durch eine ebensolche Spezifität und ein ebensolches breites Einsatzfeld aus, wie die ursprünglich verwandten Polynukleotide. Auch sie wurden zunächst anhand von Referenzstämmen evaluiert, in der Folge für die Untersuchung verschiedenster Fragestellungen, wie die Verifizierung von Isolaten aus Stuhlproben (GUNZER et al., 1992), aber auch zur Differenzierung einzelner Subtypen des VT2 (THOMAS et al., 1993) eingesetzt.

Der Einsatz dieser Technik wurde im Bereich der VTEC auch zur Diagnostik der weiteren Virulenzfaktoren wie des *eae*-Gens eingesetzt, wobei sowohl die gesamte Gruppe der verschiedenen Subtypen nachweisbar war (JERSE et al., 1990), oder auch einzelne Subtypen (BEEBAKHEE et al., 1992).

Eine weitere wichtige Indikation war die Bestätigung der durch PCR gewonnenen Amplifikate hinsichtlich ihrer Spezifität. Dies erscheint insbesondere wichtig, wenn durch niedrige Annealing-Temperaturen die Gefahr besteht, durch Mis-Priming Amplifikate zu erhalten, die positive Ergebnisse durch gleiche Länge und damit Position in der Gelelektrophorese vortäuschen. In diesem Fall können die Amplifikate nach Southern Blot auf Membranen gedottet und mit kurzen DNA-Sonden, die innerhalb des Amplifikates liegen, hybridisiert werden, um so die Diagnose weiter abzusichern (KARCH und MEYER, 1989a; SCHMIDT et al., 1994; FRATAMICO et al., 1995) oder auch um eine weitere Differenzierung zu ermöglichen (PATON et al., 1993).

2.6.2.2 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ist ein in vitro-Verfahren, mit dem eine gesuchte DNA-Sequenz amplifiziert, d. h. enzymatisch vervielfältigt werden kann. Dazu werden spezifische Primer (Oligonukleotide) benötigt, die das zu amplifizierende DNA-Stück flankieren. Sie funktionieren als Startsignal für eine Taq-Polymerase, ein DNA-synthetisierendes Enzym. Im ersten Schritt der PCR erfolgt eine Denaturierung der doppelsträngigen DNA, um nachfolgend die Anlagerung der Primer an den komplementären DNA-Strang in der Annealing-Phase zu ermöglichen. Diese angelagerten Primer dienen der Taq-Polymerase als Erkennungssequenz, so daß sie den so markierten Genabschnitt in der nun folgenden Elongation verlängert und wieder eine doppelsträngige DNA entsteht. Diese drei Schritte werden 30 bis 40 mal wiederholt, wodurch eine exponentielle Vermehrung der gesuchten DNA-Sequenz erreicht wird. Die amplifizierten DNA-Sequenzen können anschließend gelelektrophoretisch sichtbar gemacht werden. Die Spezifität der PCR kann durch Überprüfung der PCR-Produkte mittels Hybridisierung mit entsprechenden Gensonden oder auch deren Restriktionsverdau mit spezifischen Restriktionsenzymen bestätigt werden.

Es wurden von KARCH und MEYER (1989b) degenerierte Primer entwickelt, die über den Nachweis hochkonservierter DNA-Regionen Verotoxin-Gensequenzen nachweisen, die bei allen Verotoxin-Typen vorkommen. Diese Primer wiesen eine über 90%ige Homologie zur nachzuweisenden Zielsequenz auf. Den Unterschieden in den DNA-Sequenzen mußte allerdings durch eine Herabsetzung der Annealing-Temperatur auf 43°C Rechnung getragen werden. Die Überprüfung der PCR führten sie mit Hilfe einer Gensondenhybridisierung mit zwei für *stxI* A und *stxII* A spezifischen DNA-Sonden durch, die innerhalb des Amplifikates lagen. Dieser Tatsache trugen PATON et al. (1993) Rechnung, indem sie vier Primer basierend auf den Ergebnissen von KARCH

und MEYER (1989b) synthetisierten. Sie gaben beide Primerpaare einem PCR-Ansatz zu, und konnten durch die Erhöhung der Annealing-Temperatur auf 47°C eine spezifischere Amplifikation erreichen und falsch positive Ergebnisse bei der Untersuchung von Rinderkotproben weitestgehend ausschließen. Im weiteren wurden auch von anderen Arbeitsgruppen verschiedene Primer entwickelt, die sowohl den Nachweis einzelner Subtypen der VTs ermöglichten, als auch den Nachweis ganzer Gruppen. Auch der Nachweis weiterer Virulenzfaktoren wie das *eae*-Gen, das das Intimin kodiert, der Nachweis des Enterohämolysins, der bifunktionalen Katalase-Peroxidase, der Serin-Protease oder auch des EAST1 mittels PCR wurden in der Folge beschrieben. Grundsätzlich muß bei der Wahl eines Primerpaares immer darauf geachtet werden, daß zum einen alle gesuchten Sequenzen nachgewiesen werden können, zum anderen aber nicht ungewollte Sequenzen amplifiziert werden. Tabelle 14 enthält eine Übersicht über einige publizierte genotypische Nachweisverfahren für die einzelnen Virulenzfaktoren mittels PCR.

Tabelle 14 Auswahl publizierter Primer für Nachweisverfahren der Verotoxine sowie weiterer Virulenzfaktoren von verotoxinogenen *E. coli* (VTEC) mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Bezeichnung des Primers	Position im Zielgen	Nachweis von	Referenz
MK 1/ MK 2	311 – 320 515 – 535 (<i>stx A</i>)	Stx, <i>stx1</i> , <i>stx2</i>	KARCH und MEYER (1989b)
VT1a/ VT1b	1191 – 1210 1301 – 1320	<i>stx1</i>	POLLARD et al. (1990)
VT2a / VT2b	426 – 445 752 – 771	<i>stx2</i>	
VTe-a / VTe-b	217 – 236 427 – 446	<i>stx2e</i>	JOHNSON et al. (1990)
SLT I-1 SLT I-2 SLT I-3	288 – 307 744 – 763 1156 – 1176	<i>stx1</i>	OLSVIK et al. (1991)
SLT II-1 SLT II-2 SLT II-3	288 – 307 747 – 766 1130 – 1151	<i>stx2</i>	
GK 1 / GK 2		<i>stx2</i> , <i>stx2vhc</i> (A-Unterein)	
GK 3/ GK 4		<i>stx2</i> , <i>stx2vhc</i> (B-Unterein)	GUNZER et al., 1992
ES 151 / ES 149	611 – 631 912 – 933	Stx, <i>stx1</i> , <i>stx2</i> , <i>stx2e</i>	READ et al. (1992)
5'I 3'I	691 – 715 1033 – 1057	<i>stx1</i>	BRIAN et al. (1992)
5'II 3'II	691 – 715 950 – 973	<i>stx2</i>	

Tabelle 14 Auswahl publizierter Primer für Nachweisverfahren der Verotoxine sowie weiterer Virulenzfaktoren von verotoxinogenen *E. coli* (VTEC) mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Fortsetzung)

Bezeichnung des Primers	Position im Zielgen	Nachweis von	Referenz
SLT I-F SLT I-R	938 – 957 1539 – 1520	stx1	GANNON et al. (1992)
SLT II-F SLT II-R	624 – 644 1403 – 1384	stx2, stx2e, stx2c, stx21ha, stx2hb, stx2va	
SK 1 SK 2		EPEC-eae, EHEC-eae	
LP 1 LP 2		EPEC-eae	
LP 1 LP 3		EHEC-eae	SCHMIDT et al. (1994)
KS 7 KS 8		stxIB	
GK 5 GK 6		stxIIB	
PT-2 PT-3		uidA	
MFS1F MFS1R		60-Mda Plasmid	FRATAMICO et al. (1995)
SZ I SZ II		5'-Region des eae-Gens und strangaufwärts gelegene 688 bp einschl. eines unbekannten Gens	MENG et al. (1996)

Tabelle 14 Auswahl publizierter Primer für Nachweisverfahren der Verotoxine sowie weiterer Virulenzfaktoren von verotoxinogenen *E. coli* (VTEC) mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Fortsetzung)

Bezeichnung des Primers	Position im Zielgen	Nachweis von	Referenz
SLT I-F SLT I-R		stx1	MENG et al. (1997)
SLT II-F SLT II-R		stx2	
SLT I-3 SLT I-5	723 – 744 1312 – 1291	Stx, stx1	TSEN und JIAN (1998)
SLT II-3 SLT II-5	618 – 641 1311 - 1287	stx2, stx2e, stx2c, stx21ha, stx2hb, stx2va	
RfbF RfbR		rfbE	HU et al. (1999)
IntF IntR		3' Ende des O157-eae-Gens	

Theoretisch ist mit der PCR ein einziger Mikroorganismus bzw. ein einziges Ziel-DNA-Molekül in einem PCR-Ansatz nachweisbar. In der Praxis beeinflussen jedoch eine Reihe von Faktoren den Nachweis von Gensequenzen mit der PCR. Der Einsatz der PCR zur Differenzierung bereits isolierter verdächtiger *E. coli*-Kolonien ist problemlos möglich, jedoch können z. B. beim „Screening“ auf VTEC direkt aus dem Lebensmittel vermehrt inhibitorische Substanzen auftreten, die einen Nachweis problematisch machen. So läßt sich ein sicherer Nachweis einzelner Gensequenzen aus dem Lebensmittel mit der PCR nur mit Hilfe einer vorgeschalteten Anreicherung führen, eine vorherige Verdünnung führt meist zu einem deutlichen Verlust der Sensivität, der aufgrund der niedrigen infektiösen Dosis somit keine ausreichend sichere Aussage im Hinblick auf die Sicherheit des Lebensmittels ergäbe. So kann mit Anreicherung und anschließender PCR eine Nachweisgrenze von bis zu einer Koloniebildenden Einheit/g Lebensmittel erreicht werden (GANNON et al., 1992). JINNEMAN et al. (1995) konnten durch Aufkonzentrierung von 10 ml Anreicherungsbouillon auf 1 ml und anschließende Immunomagnetische Separation eine Nachweisgrenze von einer Zelle pro Gramm Lebensmittel erreichen. Einen vergleichbaren Ansatz fanden CHEN et al. (1998), indem

sie neben einer Anreicherung mit spezifischen Gensonden markierte paramagnetische Partikel einsetzten, um eine weitere Aufkonzentrierung zu erreichen. Sie konnten dadurch 10^0 KbE/g Lebensmittel nachweisen, wobei sie eine nicht-selektive Anreicherung einsetzten.

Eine Modifikation der klassischen PCR-Technik stellt 5'-Nuklease-Fluoreszenztest dar, bei dem im PCR-Ansatz neben den spezifischen Primern eine fluoreszenzmarkierte Oligonukleotid-Sonde enthalten ist, die innerhalb des gewünschten Genabschnittes hybridisiert. Diese Sonde wird im Verlauf der Amplifikation durch die Exonukleaseaktivität der Polymerase hydrolysiert und die vorher gebundenen Fluoreszenzfarbstoffe werden frei und emittieren bei 518 nm, so daß im Verlauf der Amplifikation mit einer Zunahme der Fluoreszenz zu rechnen ist und somit hierüber eine automatisierte Ablesung möglich wird. WHITTAM et al. (1996) setzten diese Technik erstmals für den Nachweis des *stx I* –Gens ein und konnten so ebenfalls nach vorheriger Anreicherung eine Nachweisgrenze von 0,5 Koloniebildenden Einheiten/g Lebensmittel erreichen. MENG et al. (1996) publizierten eine für *E. coli* O157:H7 spezifische Sequenz zwischen dem 5'-Ende des *eae*-Gens und weitere 688 bp strangaufwärts. Indem sie eine innerhalb der Zielsequenz liegende DNA-Sonde entwickelten, stellten sie eine Methode vor, die für den schnellen und automatisierbaren Nachweis von *E. coli* O157:H7 aus Lebensmittelproben geeignet sein könnte. Diesen Ansatz wählten auch BÜRK und Mitarbeiter (2000), um ein automatisiertes System zur Detektion von VTEC aus Lebensmitteln zu entwickeln.

Durch eine hohe Begleitflora kann die Sensitivität reduziert werden. Bei einer Höhe der Begleitflora von 10^9 KbE/g geht die Sensitivität um bis zu drei Zehnerpotenzen zurück (WEAVER und ROWE, 1997).

Eine jüngere Applikation der PCR-Technik ist die der sog. Multiplex-PCR, bei der mehrere Primerpaare für verschiedene Genabschnitte dem PCR-Ansatz zugegeben werden, um in einem PCR-Ansatz gleichzeitig mehrere Eigenschaften nachweisen zu können. Diese wurde zum Beispiel von MENG et al. (1997) eingesetzt, um VT1 und VT2 neben einer für *E. coli* O157 spezifischen Sequenz (MENG et al. 1996) nachweisen zu können. Eine weitere Verfeinerung des genotypischen Nachweises von *E. coli* O157:H7 stellten HU et al. (1998) vor, indem sie folgende Gene in einer PCR amplifizierten: Das für das somatische Antigen O157 kodierende *rfbE*-Gen, das für das Geißelantigen H7 kodierende *fliC*-Gen, einen Teil im Bereich des 3'-Endes des *eae*-Gens, der für *E. coli* O157:H7 spezifisch ist neben zwei Primerpaaren, die den Nachweis von *stx I* und *stx II* ermöglichten. Sie konnten mit Hilfe dieser PCR sowohl die

phänotypisch nachgewiesenen Serotypen bestätigen, als auch die Spezifität des von ihnen gewählten Primers für das *eae*-Gen für das Serovar O157:H7 nachweisen. Diese Multiplex-PCR ermöglicht in einem Schritt den sicheren Nachweis von *E. coli* O157:H7 einschließlich seines VT-Typs. Ebenso ist der Nachweis von VTEC anderer Serovare möglich. Der Nachweis des nonO157-*eae*-Gens ist bei Unterschieden in der Sequenz jedoch nicht möglich. Einen anderen Ansatz wählten TSEN et al. (1998), die eine Multiplex-PCR zum Nachweis von ETEC und VTEC aus Wasserproben entwickelten. Dies erlaubte den Nachweis von bis zu 10^0 KbE/100 ml Wasser. Trotz der genannten Vorteile einer Multiplex-PCR muß doch darauf hingewiesen werden, daß insbesondere kleinere Abschnitte nicht immer in dem Maße amplifiziert werden, und es somit durchaus zu einem Verlust der Sensivität kommen kann, was bedeutet, daß es bei geringen Kontaminationsraten zu falsch negativen Ergebnissen kommen kann (WEAVER et al., 1997).

Einen Verlust der Sensitivität mußten auch GALLIEN et al. (2000a) hinnehmen, als sie versuchten, eine interne Qualitätskontrolle im PCR-Ansatz jeder Probe mitzuführen. Beim Zusatz von 20 pg Kontroll-DNA konnte bereits kein Amplifikationsprodukt mehr nachgewiesen werden. Hinzu kommt, daß derartige interne Kontrollen einer sehr genauen Abstimmung bedürfen, um keine störende Wirkung auf die Amplifikation der Ziel-DNA zu haben. Daher hielt es diese Arbeitsgruppe für besser, neben den Positiv-Negativ- und Reagenzienleerwert-Kontrollen, eine externe Kontrolle in einem zweiten Ansatz der gleichen Proben mitzuführen. Dadurch können falsch negative Ergebnisse aufgrund hemmender Wirkungen der Probenmatrix weitgehend ausgeschlossen werden.

2.7 Subtypisierung / Feintypisierung

In der Vergangenheit wurden verschiedene Methoden zur Differenzierung bzw. Charakterisierung isolierter Bakterienspezies eingesetzt. Hierbei wurden zunächst phänotypische später auch genotypische Methoden verwandt. Molekulare Techniken ermöglichen auf der einen Seite eine Einordnung im Sinne der numerischen Taxonomie zur hierarchischen Klassifikation nach phylogenetischer Verwandtschaft. Diese Methoden werden auf der anderen Seite zunehmend zur Feintypisierung bakterieller Isolate als sog. „Fingerprint-Techniken“ herangezogen. Hierbei liegt der Nutzen sowohl in der Aufklärung möglicher epidemiologischer Zusammenhänge z. B. im Zusammenhang mit Lebensmittelinfektionen wie auch im Nachweis klonaler bzw. genetischer Änderungen aus epidemiologischer Sicht. Grundsätzlich sollte zwischen Methoden zur Subtypisierung, die eine Charakterisierung unterhalb der Speziesebene erlauben, und den Methoden zur Feintypisierung, die zudem eine Differenzierung gleicher Subtypen erlauben, unterschieden werden (STROCKBINE et al., 1998). Eine Übersicht der zur Subtypisierung/Feintypisierung von VTEC eingesetzten Methoden ist im folgenden wie auch in Tabelle 15 aufgeführt.

Tabelle 15 Eignung phänotypischer und genotypischer Methoden zur Subtypisierung und Feintypisierung von verotoxinogenen *Escherichia coli* (VTEC)

	Subtypisierung	Feintypisierung
Phänotypische Methoden		
Serotypisierung	+	-
Phagentypisierung/Lysotypie	+	+
Biotypisierung	+	-
VT-Phänotyp	+	-
Antibiotikaresistenztestung	+	-
Multilocus Enzyme Electrophoresis (MEE)	-	+
Genotypische Methoden		
Plasmidtypisierung	+	+/-*
Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)	-	+
Ribotypisierung und Modifikationen (z.B. RFLP)	-	+
VT-Genotyp/Subtypisierung einzelner Gene	+	+/-*
PCR-basierte Methoden und Modifikationen (z.B. RAPD-PCR, AFLP)	-	+
DNA-Sequenzanalysen	-	+

+ = geeignet +/- = bedingt geeignet - = nicht geeignet

* = nur gemeinsam mit weiteren Methoden zur Feintypisierung

2.7.1 Phänotypische Tests

Einzelne exprimierte Merkmale eines Bakteriums bilden in der Summe den sog. Phänotyp. Die Charakterisierung einzelner Merkmale aus dem Phänotyp erlaubt nach Differenzierung bis zur Speziesebene einen Vergleich der Stämme, der im Idealfall eine Typisierung erlaubt und somit für epidemiologische Fragestellungen nutzbar ist. Bei VTEC werden neben serologischen und biochemischen Methoden auch exprimierte Virulenzfaktoren eingesetzt.

2.7.1.1 Serotypisierung

Aus Untersuchungsmaterial isolierte Mikroorganismen können durch die Bestimmung ihres Serovars vorläufig identifiziert werden. Hierzu werden mit Hilfe bekannter Bakterienspezies hergestellte monovalente Antiseren eingesetzt, die z. B. auf somatische Antigene (O-Antigene) oder gegen auf den Geißeln befindliche Antigene (H-Antigene) gerichtet sind (BRÜCKLER et al., 1991). Die Bestimmung des O157-Antigens in Untersuchungseinrichtungen mittels kommerziell erhältlicher Testkits zur schnellen Identifizierung ist unbedingt getrennt von der Serotypisierung zu sehen. Die Serotypisierung wird im Mikrotiterverfahren nach Erhitzung der vermehrungsfähigen Zelle zur Freisetzung des hitzebeständigen O-Antigens durchgeführt. Zur Serotypisierung von VTEC werden sowohl O- als auch H-Antigene eingesetzt. Dies ermöglicht eine erste Aussage über wichtige epidemiologische Zusammenhänge. Hierdurch wurde sowohl das Serovar O157:H7 als auch O157:H- als ehemals neuer, hochvirulenter Serotyp im Zusammenhang mit HC (RILEY et al., 1983), als auch weitere häufig mit HC, HUS oder TTP assoziierte Serovare wie O111, O26, O103, O22 und O145 identifiziert. Darüber hinaus wurden noch weitere Serovare im Zusammenhang mit humanen Erkrankungen nachgewiesen. Dies ermöglichte im Zuge der Untersuchungen zum Vorkommen von VTEC bei Tieren und in Lebensmitteln eine Einschätzung des Gefährdungspotentials isolierter VTEC für den Menschen sowie die Einstufung dieses Pathovars als Zoonoseerreger (MOHAMMED et al., 1986; MONTENEGRO et al., 1990; CAPRIOLI und TOZZI, 1998). Auch die Aufklärung epidemiologischer Zusammenhänge bei Infektionen des Menschen kann durch eine Serotypisierung erleichtert werden. Bei regional gehäuft vertretenen Serovaren, wie dem Serovar O157, ermöglicht die Serotypisierung jedoch nur eine vorsichtige Aussage über epidemiologische Zusammenhänge. Hier ist eine ausreichende Differenzierung der Isolate nur durch den Einsatz weiterer Methoden möglich.

TAMURA et al. (1996) konnten durch Serotypisierung sämtlicher in Asien zwischen 1958 und 1992 eingesandter *E. coli* eine Kategorisierung in einzelne Pathogruppen vornehmen. Anders jedoch als bei den ETEC oder auch weiten Teils bei den EPEC ließ sich eine endgültige Einordnung in die Gruppe der VTEC bzw. EHEC nur durch Bestimmung der Virulenzfaktoren VT oder das das Intimin kodierende *eae*-Gen vornehmen. Eine eindeutige Korrelation des Serotyps mit der Pathogruppe ließ sich nur bei den „klassischen“ EHEC-Serovaren O157:H7 und O157:H⁻ nachweisen. Einschränkend ist hierzu jedoch zu bemerken, daß auch zur Gruppe der EPEC gehörende Serovare wie O157:H39 bei dieser Gruppierung zur Gruppe der EHEC gezählt werden müßten.

Es ist aus epidemiologischer Sicht eine serologische Bestätigung und gegebenenfalls Feindifferenzierung anzustreben (BÜLTE et al., 1998). Diese so erhobenen Daten geben wichtige Hinweise auf die anzuwendende Diagnostik. So ist es beispielsweise in Nordamerika, Großbritannien wie auch im asiatischen Raum möglich, bei der Untersuchung auf das Serovar O157 einen überwiegenden Teil der Krankheitserreger zu erfassen (GRIFFIN, 1998; SPIKA et al., 1998; SMITH et al., 1998). Anders stellt sich die Situation in Kontinentaleuropa und speziell in Deutschland dar, wo das Serovar O157 bei den HUS-Fällen in den letzten Jahren zwar noch eine erhebliche Rolle spielte, jedoch bei den Enteritis-Fällen unabhängig von der Schwere des Verlaufs einen prozentual immer geringeren Anteil ausmachte (BOCKEMÜHL et al., 1996, 1997 und 1998; BEUTIN et al., 1994b und 1996b). Hier kann die Bestimmung des Serovars allein bereits wichtige Zusammenhänge aufklären, insbesondere wenn es sich um selten vorkommende handelt. Grundsätzlich kann die Serotypisierung allein nur schwerlich als maßgebliche Methode zur Subtypisierung gewertet werden.

2.7.1.2 Phagentypisierung / Lysotypie

Die Lysotypie basiert auf dem Prinzip, daß Bakteriophagen durch strenge Wirtsspezifität und mit einer hohen Reproduzierbarkeit definierte Wirtszellen infizieren und somit in Kultur zur Lyse bringen. Durch den Einsatz verschiedener definierter Bakteriophagen kann eine Differenzierung der Isolate vorgenommen werden. AHMED et al. (1987) beschrieben ein Schema zur Typisierung von *E. coli* O157:H7 basierend auf 16 verschiedenen Bakteriophagen, das eine Differenzierung in 14 verschiedene Lysotypen erlaubte. Dieses Schema wurde in der Folge zur Differenzierung auf 62 verschiedene Lysotypen ausgedehnt (KHAKHRIA et al., 1990). Nach neueren Daten beläuft sich die Zahl der verschiedenen Lysotypen auf 82 (WILLSHAW et al., 1997; STROCKBINE et al., 1998).

Diese Methode wurde zur Aufklärung verschiedener Lebensmittelinfektionen mit VTEC/EHEC eingesetzt (u. a. REIDA et al. 1994; CDC, 1994; BARRETT et al., 1994; GALLIEN et al. 1997a), wobei sie z.T. den molekularbiologischen Methoden überlegen war (CDC, 1994). Auch im Rahmen epidemiologischer Surveillance-Studien konnten klonale Zusammenhänge bestätigt werden (FROST et al., 1989; FROST et al., 1993). KRAUSE et al. (1996) wiesen bei der Untersuchung von 124 *E. coli* O157:H7-Stämmen nach, daß die Lysotypie im Vergleich zur PFGE eine geringere Diskriminierung aufwies. LIESEGANG et al. (2000) werten die Lysotypie neben der Makrorestriktionsanalyse mit Pulsfeldgelelektrophorese und dem P-Gen Profil als eine weitere hilfreiche Methode für eine erste Einordnung der Isolate, die jedoch für eine ausgedehnte epidemiologische Surveillance nicht genügend differenziere. Sie bewerteten die Lysotypie als hilfreiche Methode zur Analyse der Isolate aufgrund ihrer einfachen und schnellen Durchführbarkeit, die gerade bei Untersuchungen im Zusammenhang mit Erkrankungen eine schnelle erste Einordnung erhobener Befunde erlaube. Problematisch wird die Interpretation beim Nachweis häufig auftretender Lysotypen, wie z. B. des Phagentyps 2 im Vereinigten Königreich (WILLSHAW et al., 1997; FROST et al., 1989 und 1993) oder des Phagentyps 14 in Kanada (STROCKBINE et al., 1998). Hier war der Einsatz weiter diskriminierender Methoden wie z. B. der RFLP oder der PFGE notwendig, um klonale Zusammenhänge basierend auf den erhobenen Daten nachweisen zu können.

2.7.1.3 Biotypisierung

Das Prinzip der Biotypisierung ist die Klassifizierung einzelner Stämme einer Spezies nach definierten biochemischen Mustern, gekennzeichnet durch die Fähigkeit oder das Unvermögen, Kohlenhydrate zu verstoffwechseln. Zudem kann bei Bakterien, wie *Enterobacteriaceae* das Vermögen, die Kohlenhydrate aerob oder anaerob umzusetzen, differenziert werden. ALEKSIC et al. (1992) erarbeiteten anhand von 39 *E. coli* O157-Stämmen, ein Schema zur Biotypisierung. Hierbei bewerteten sie β -Glucuronidase-Aktivität sowie das Fermentationsverhalten von Sorbitol, Dulcitol, Rhamnose, Raffinose und Saccharose. Dies ergab eine Differenzierung in 11 verschiedene Bioare innerhalb des Serovars O157. Solche Unterschiede im Fermentationsverhalten von *E. coli* O157:H7-Stämmen konnten RATNAM et al. (1988) nicht feststellen. In ihren Untersuchungen waren 174 Stämme zu 100 % in der Lage, Rhamnose und Dulcitol zu fermentieren. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu der Gruppe der non-O157:H7-Stämme, die typisch für *E. coli* in allen biochemischen Reaktionen waren. BOCKEMÜHL et al. (1992) konnten für die Gruppe der non-O157-Stämme nicht die Ergebnisse von ALEKSIC et al. bestätigen, bei der Untersuchung von 64 Stämmen wurde nur in einem Fall das Unvermögen, Sorbitol zu fermentieren, festgestellt. Die Möglichkeit zur Differenzierung isolierter O157-Stämme anhand ihrer biochemischen Charakteristika wurde in der Vergangenheit nur vereinzelt bei der Untersuchung lebensmittelbedingter Infektionen genutzt (KRISHNAN et al., 1987; REIDA et al., 1994; GALLIEN et al., 1997a). Sie stellt nach CHAPMAN (1994) eine zusätzliche Differenzierungsmöglichkeit bei epidemiologischen Untersuchungen dar.

2.7.1.4 VT-Phänotyp

Die Untersuchung auf phänotypische Expression der Subtypen der Verotoxine (Typ 1 und 2) stellte sehr frühzeitig eine schnelle und einfach durchzuführende Methode zur ersten Charakterisierung der Isolate dar. Neben der VT-Neutralisation im Verozelltest, kann diese Subtypisierung auch von Routinelaboratorien mit verschiedenen immunologischen Methoden wie ELISA, Immunoblot oder VTEC-RPLA durchgeführt werden. Sie liefert gemeinsam mit anderen Methoden wichtige zusätzliche Informationen (STROCKBINE et al., 1998). Limitiert ist ihr Einsatz als alleinige Technik zur Subtypisierung allerdings durch den Nachweis drei möglicher VT-Phänotypen VT1, VT2 oder VT1/VT2. Der Nachweis der einzelnen Verotoxine gibt im Rahmen

epidemiologischer Studien Aufschluß über die Häufigkeit des Auftretens der einzelnen VT-Genotypen und läßt eine mögliche Risikoabschätzung für den Verbraucher zu (BOCKEMÜHL et al., 1998).

Die Subtypisierung der VT2-Gruppen kann ein sehr brauchbarer Marker sein (WILLSHAW et al., 1997), jedoch ist hierfür nach derzeitigem Stand der Technik der Einsatz molekularbiologischer Methoden notwendig.

2.7.2 Genotypische Differenzierungsverfahren

Im Unterschied zu den phänotypischen Methoden basieren die genotypischen auf dem Nachweis von Variationen im genetischen Code chromosomaler wie auch extrachromosomaler Sequenzen.

2.7.2.1 Plasmidtypisierung

Plasmide stellen extrachromosomale DNA-Abschnitte dar, die unabhängig vom Genom der Zelle frei im Cytoplasma vorliegen. Sie können Gensequenzen für Virulenzfaktoren, wie z. B. das Enterohämolysin-Gen, enthalten oder auch für Antibiotika-Resistenzen. Die Genom-unabhängige Vermehrung erlaubt zum einen das Vorhandensein einer Vielzahl von Kopien innerhalb einer Zelle, ermöglicht aber auch den Austausch dieser Plasmide unter den einzelnen Bakterienzellen durch Konjugation oder im Rahmen der Vermehrung der Bakterienzelle (PÜHLER et al., 1999). Die verschiedenen Plasmidtypen können sich entweder gegenseitig hemmen, sie werden dann als inkompatibel bewertet, oder auch nebeneinander innerhalb derselben Zelle existieren. Dieses Phänomen kann zur Typisierung eingesetzt werden, da das Vorhandensein einzelner Plasmide nicht kontinuierlich innerhalb einer Bakterienspezies ist, und auch im Zuge der Weiterentwicklung eines Klons wieder verloren gehen kann. Im Rahmen der Typisierung der VTEC wurde auch das Plasmidprofil, d. h. der elektrophoretische Nachweis in der Zelle vorhandener Plasmide, bestimmt und zur Differenzierung bzw. zum Vergleich einzelner Stämme herangezogen. So wiesen z. B. TIETZE und TSCHÄPE (1983) die Eignung der Plasmidmuster-Analyse für *E. coli* anhand von 55 Isolaten aus Stuhlproben an Diarrhoe erkrankter Neugeborener nach. Sämtliche Isolate waren vom Serovar O111:H2 und dadurch mittels Serotypisierung nicht eindeutig zu differenzieren. Wie bei anderen Spezies der Familie der *Enterobacteriaceae* wiesen sie auch hier das Vorkommen unterschiedlicher Plasmide bei unterschiedlichen Isolaten eines Serovars nach. Den Plasmiden konnten nach Transfektionsversuchen mit *E. coli* K12 bestimmte Phänotypen zugeordnet werden. Die

Autoren schlossen daraus, daß es sich hier um eine nützliche und sensitive epidemiologische Labormethode handelt. Die Analyse des Plasmidprofils wurde in verschiedenen Untersuchungen sowohl als Vergleichsmethode zur Evaluierung anderer Methoden als auch zur Charakterisierung einzelner Stämme im Rahmen epidemiologischer Studien eingesetzt. So evaluierten AHMED et al. (1987) ein Schema zur Phagentypisierung von *E. coli* O157:H7 anhand der Plasmidprofil-Analyse. Sie wiesen eine Übereinstimmung der Methoden von 91,4 % bei 35 Stämmen aus Gruppenerkrankungen auf. Ausgehend von den epidemiologischen Erhebungen schien die Phagentypisierung die verlässlichere Methode zur Typisierung zu sein, da es im Rahmen von Ausbrüchen eher zum Verlust von Plasmiden kommen kann, als zur Änderung des Phagentyps. Ebenso setzten TSCHÄPE et al. (1992) die Analyse des Plasmidprofils neben weiteren molekularbiologischen Methoden wie PFGE und RFLP bei veterinärmedizinisch pathogenen *E. coli* O139:K82:H1 mit guter Übereinstimmung zu den epidemiologischen Befunden ein. Auch die Differenzierung der Isolate aus Gruppenerkrankungen mittels Plasmidtypisierung wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen erfolgreich eingesetzt (WILLSHAW et al., 1994; TSCHÄPE et al., 1995). Bei vergleichenden Untersuchungen verschiedener Isolate aus Lebensmitteln, Kotproben von Rindern und humanen Stuhlproben konnten durch die Bestimmung des Plasmidprofils gemeinsam mit anderen Typisierungsmethoden Übertragungswege bei Erkrankungen wie auch klonale Zusammenhänge nachgewiesen werden, wie z. B. der Nachweis, daß VTEC und EHEC als Zoonoseerreger einzuordnen sind (OSTROFF et al., 1989; PAROS et al., 1993; MENG et al., 1995). Der Einsatz der Plasmidtypisierung als alleinige Methode zur Aufklärung epidemiologischer wie auch klonaler Zusammenhänge war jedoch nicht möglich, da die Sensitivität gegenüber anderen Methoden wie der RFLP oder der PFGE nicht ausreicht (PAROS et al., 1993; LIESEGANG et al., 2000). Die Plasmidtypisierung kann als sinnvolle Ergänzung zu anderen Methoden der Typisierung bewertet werden (CHAPMAN et al., 1994). Der Nachweis verschiedener Plasmidprofile wurde daher auch zur Charakterisierung einzelner Serovare wie O157:H7 (RATNAM et al., 1988) oder auch O157:H⁻ (KARCH et al., 1993) eingesetzt.

2.7.2.2 Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)

Der Phänotyp eines Bakteriums ist durch die Basenfolge im Genom kodiert. Da jedoch einzelne Aminosäuren durch verschiedene Basenfolgen innerhalb des Codons kodiert sein können, ist die Variation innerhalb einer Spezies auf genetischer Ebene höher als auf der Ebene des Phänotyps. Setzt man nun Restriktionsenzyme ein, die das Genom an definierten, meist 4 bis 8 bp langen Stellen, zerschneiden, ist es möglich, Unterschiede auf genetischer Ebene darzustellen. Nach Restriktionsverdau des bakteriellen Chromosoms mit selten schneidenden Restriktionsenzymen, meist an einer etwa 6 bp langen Erkennungssequenz, entstehen spezifische DNA-Restriktionsfragmente unterschiedlicher Länge. Die Auftrennung der größeren Fragmente erfolgt in der Pulsfeldgelelektrophorese, wobei ein elektrisches Spannungsfeld angelegt wird. Dieses Spannungsfeld wechselt periodisch um einen definierten Winkel aus zwei verschiedenen Richtungen (PÜHLER et al., 1999). Nach der Elektrophorese werden die Restriktionsfragmente, z. B. mit Ethidiumbromid, sichtbar gemacht und können mit denen anderer Stämme verglichen werden. Die Bandenmuster können mit Hilfe Computer-gestützter Programme ausgewertet werden. Die Verwandtschaftsverhältnisse der untersuchten Stämme untereinander werden, z. B. in Form von Dendrogrammen aufgezeigt.

BÖHM und KARCH (1992) entwickelten einen „DNA-Fingerprint“ mittels PFGE nach Restriktionsverdau für *E. coli* O157:H7. Nach Überprüfung vier verschiedener Restriktionsenzyme (*Xba*I, *Not*I, *Sfi*I und *Pac*I) erzielten die Autoren die beste Diskriminierung der Isolate mit *Xba*I. Mit dieser Methode war es möglich, apathogene von pathogenen Stämmen zu unterscheiden. Nicht möglich war z. T. die Unterscheidung von Stämmen, die in keinem epidemiologischen Zusammenhang standen, auch wenn *Not*I als weiteres Restriktionsenzym eingesetzt wurde. Dies zeige die Grenzen des Verfahrens, wodurch die Notwendigkeit weiterer zusätzlicher Typisierungsmethoden erforderlich wurde. Zu einem vergleichbaren Schluß kamen HARSONO et al. (1993), als sie mittels PFGE 22 verschiedene Isolate von *E. coli* O157:H7 nach Restriktionsverdau mit *Xba*I und *Sfi*I verglichen und versuchten, die Gesamtgröße des Genoms zu bestimmen. Der Vergleich der Ergebnisse der beiden Restriktionsenzyme konnte bezüglich der Genomgröße nicht geführt werden, da durch mögliche Fehlerquellen bei der Nutzung von *Sfi*I, die Differenzen zu groß waren. Bei Berechnung nach *Xba*I-Verdau konnte die mittlere Größe des Genoms auf

4,7 Megabasenpaare (Mbp) berechnet werden. Als einen Grund für die nachgewiesenen unterschiedlichen Ergebnisse diskutierten sie die Anwesenheit verschiedener Plasmide. Davon unabhängig kamen sie zu dem Schluß, daß der Einsatz eines Restriktionsenzym allein nicht ausreiche, um eine ausreichende Diskriminierung zu erlangen. So konnten sie mittels *Xba*I-Verdau nicht zu unterscheidende Stämme mittels *Sfi*I-Verdau voneinander differenzieren, ebenso traten umgekehrte Ergebnisse auf. Die Lage der Plasmide im PFGE-Muster konnten IZUMIYA et al. (1997) durch Hybridisierung der vorher durch *Xba*I verdauten DNA-Restriktionsfragmente mit den fixierten Plasmiden im Southern Blot nachweisen. Der Vergleich mehrerer Sorbitol-fermentierender *E. coli* O157:H⁻-Stämme ergab einen engen klonalen Zusammenhang der Stämme untereinander, wobei auf der anderen Seite deutliche Unterschiede zu den DNA-Restriktionsfragmenten klassischer EHEC-Serovare, den non-Sorbitol-fermentierenden *E. coli* O157:H7 und O157:H⁻ nachgewiesen wurden (KARCH et al., 1993). Beim Vergleich verschiedener Methoden zur epidemiologischen Charakterisierung einzelner Isolate erwies sich die PFGE in Verbindung mit der Phagentypisierung gegenüber der Ribotypisierung (MARTIN et al., 1996) und der Plasmidtypisierung als überlegen (MENG et al., 1995).

Auch im Rahmen von Surveillance-Studien konnten durch Typisierung mit der PFGE bereits durch Befragungen ermittelte epidemiologische Zusammenhänge bestätigt werden (IZUMIYA et al., 1997). Sogar ursprünglich als sporadische, nicht zusammenhängende Erkrankungen konnten nach Typisierung der Isolate mittels PFGE als Gruppenerkrankung aufgedeckt werden (BENDER et al., 1997). Ebenso wurden die Übertragungsmechanismen bei verschiedenen Gruppenerkrankungen in der Vergangenheit durch PFGE nach Restriktionsverdau mit *Xba*I aufgeklärt (u. a. BARRETT et al., 1994; TSCHÄPE et al., 1995; KEENE et al., 1997; CHALMERS et al., 1997; GALLIEN et al., 1997a). Gemeinsam mit weiteren genotypischen „Fingerprint-Methoden“ wie der z. B. Phagentypisierung (MARTIN et al., 1996) oder der Bestimmung des P-Gen-Profiles (LIESEGANG et al., 2000) kann durch die PFGE eine umfassende epidemiologische Surveillance für *E. coli* O157:H7/H⁻ durchgeführt werden.

2.7.2.3 Ribotypisierung und Modifikationen wie „Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis“ (RFLP)

Im Unterschied zur PFGE werden bei der RFLP häufig schneidende Restriktionsenzyme wie z. B. *EcoRI* zum Verdau der DNA eingesetzt, um eine höhere Auftrennung der DNA zu erlangen (Erkennungssequenz bis 4 bp). Im weiteren werden durch Hybridisierung der DNA-Fragmente mit Gensonden und anschließendem Southern-Blot einzelne Fragmente sichtbar gemacht. Diese können dann Aufschluß über die Lage einzelner Gene innerhalb des Genoms geben, oder auch die Verteilung häufig vorkommender – repetitiver – Sequenzen nachweisen. Die Differenzierung mittels RFLP ist also eine Form der Genkartierung, die je nach Einsatz selten oder häufiger im Genom vorkommender DNA-Sonden mit einem oder mehreren Restriktionsfragmenten aus dem Verdau hybridisiert. Im Idealfall entstehen unterschiedliche Muster, die eine Differenzierung bzw. Zuordnung der einzelnen Isolate in epidemiologische oder genetische Gruppen erlauben.

Die RFLP wurde für VTEC/EHEC nach Verdau der DNA mit *EcoRI* oder auch nach PFGE mit *XbaI*-Verdau mittels verschiedener DNA-Sonden durchgeführt. KARCH und BÖHM (1992) führten nach der zuvor beschriebenen PFGE mit *XbaI*-Verdau einen Southern Blot durch und hybridisierten die fixierte DNA mit einem 230 bp langen DNA-Fragment, das mittels der Primer MK1-MK2 aus *E. coli* C600 Stamm 933W hergestellt wurde. Sie konnten durch diesen Southern Blot verschiedene RFLP-Muster nachweisen, in einem Fall sogar das Vorhandensein zweier verwandter Gene. Auch die Differenzierung einzelner in der PFGE nicht unterscheidbarer Stämme konnte durch den zusätzlichen Einsatz der RFLP vorgenommen werden. Diese Methodik setzten KARCH et al. (1993) auch zum Vergleich Sorbitol-fermentierender *E. coli* O157:H⁻ - Stämme ein, wodurch sie spezifisch den Nachweis des VT2-Gens innerhalb des Genoms führen konnten.

Einen anderen methodischen Ansatz wählten PAROS und Mitarbeiter (1993), die DNA mit *EcoRI*, einem häufig schneidenden Restriktionsenzym, verdauten und die geblotteten DNA-Fragmente mit DNA eines λ -Bakteriophagen hybridisierten. Sie konnten aus 22 bovinen und 50 humanen Isolaten 23 verschiedene RFLP-Profile identifizieren, andererseits wurden lediglich vier VT-Genotypen und acht Plasmid-Profile nachgewiesen. Bei der Bewertung von Plasmid-Profil und λ -RFLP konnten sie die 72 Stämme in 36 Gruppen einteilen, bei zusätzlicher Einbeziehung des VT-

Genotyps in 43 Gruppen. Auch wenn durch die Auswertung verschiedener Methoden eine gute Differenzierung der Isolate möglich war, so konnte doch erst durch den Einsatz der λ -RFLP ein hohes Maß an Diskriminierung der Isolate erreicht werden, wodurch die λ -RFLP als valide Methode zur Identifizierung von Klonen bewertet wurde. Einen ähnlichen Ansatz fanden DATZ et al. (1996), indem sie als DNA-Sonde das für λ -Bakteriophagen spezifische *p*-Gen einsetzten, um die Häufigkeit bzw. die Verteilung von λ -Bakteriophagen-Genomen in EHEC zu ermitteln. Sie konnten in dieser Untersuchung nachweisen, daß das *p*-Gen mit dem VT1- oder VT2-Gen vergesellschaftet war. Sie wiesen durch die RFLP zudem unterschiedliche Restriktionsmuster nach, die sich in der Folge als brauchbare Methode zur Feintypisierung im Rahmen der epidemiologischen Surveillance erwiesen (LIESEGANG et al., 2000).

Die Eignung des „Ribotyping“ zur Differenzierung von *E. coli* O157-Stämmen konnte auch bei vergleichendem Einsatz verschiedener Restriktionsenzyme nicht nachgewiesen werden. Die Hybridisierung der durch *Nco*I, *Bam*HI, *Hind*III oder *Eco*RI verdauten DNA mit dem *rnnB* RNA Operon von *E. coli* ergab keine ausreichende Diskriminierung (MARTIN et al., 1996).

WILLSHAW et al. (1997) setzten nach *Eco*RI-Verdau der DNA eine 759 bp lange DNA-Sonde spezifisch für VT2, ein *Hinc*II-Fragment aus *E. coli* E32511 (WILLSHAW et al., 1985), zur Detektion ein. Die Diskriminierung war zwar nach PFGE zwischen den Stämmen höher als durch den RFLP, jedoch konnten erst durch den Einsatz beider Methoden die einzelnen Isolate zweifelsfrei den einzelnen Ausbrüchen zugeordnet und unterschieden werden. Die RFLP wurde im Rahmen von Untersuchungen nach Ausbrüchen von verschiedenen Arbeitsgruppen eingesetzt und konnte so epidemiologisch erhobene Zusammenhänge absichern (PARRY et al., 1995; CDC, 1995; TSCHÄPE et al., 1995; PATON et al., 1996; CHALMERS et al., 1997).

2.7.2.4 Genotypisierung / Subtypisierung einzelner Gene

Der genotypische Nachweis einzelner Virulenzfaktoren oder der seiner Subtypen bietet eine schnelle und sichere Möglichkeit zur Differenzierung und Typisierung einzelner Isolate. Hierzu wurde zunächst der genotypische Nachweis der VT1-/VT2-Gene mit spezifischen DNA-Sonden erbracht. Auch weitere assoziierte Virulenzfaktoren konnten entweder durch DNA-Sonden oder auch mittels PCR identifiziert werden. Der erste Schritt zur Genotypisierung wurde durch die Möglichkeit geschaffen, VT1 und VT2 mittels DNA-Sonden zu unterscheiden. In der Folge wurden auch verschiedene PCR-

Methoden zum Nachweis der VT-Gene entwickelt (vgl. Kapitel 2.6.2.2). Dies erbrachte wichtige Informationen zur Prävalenz der VT-Typen in unterschiedlichen Habitaten und konnte gemeinsam mit anderen Methoden zur Feintypisierung beitragen. Die VT-Genotypisierung wurde in der Vergangenheit nach Entwicklung entsprechender Methoden bei allen Studien zur näheren Charakterisierung der Isolate vorgenommen und bildet seitdem eine Grundvoraussetzung zur Bewertung der Isolate hinsichtlich ihrer gesundheitlichen Relevanz für den Menschen.

Ein weiterer Schritt war die Erkenntnis, daß weitere Virulenzfaktoren wie das durch das *eae*-Gen kodierte Intimin eine Rolle im Krankheitsgeschehen spielen können. Insbesondere das Intimin scheint ein wichtiger zusätzlicher Virulenzfaktor im Krankheitsgeschehen zu sein, da es vornehmlich bei den Isolaten nachgewiesen wurde, die mit den schwereren Krankheitsverläufen assoziiert waren. Die Rolle des EHEC-Hämolysins (EHEC-*hly*) im Krankheitsgeschehen ist nach neueren Erkenntnissen nicht eindeutig geklärt. In der Folge wurden weitere chromosomal wie auch plasmidal kodierte Virulenzfaktoren nachgewiesen, so daß sich mittlerweile die Möglichkeit ergibt, eine Typisierung der Isolate anhand des Nachweises verschiedener Virulenzfaktoren und deren assoziierter Gensequenzen durchzuführen (GALLIEN et al., 1998; GALLIEN et al., 1999a und b). Eine systematische Erfassung des Pathogenitätspotentials kann nur mittels PCR-Amplifikation zuverlässig erfolgen, da für den phänotypischen Nachweis der weiteren Virulenzfaktoren kaum routinefähige Verfahren zur Verfügung stehen. Zur Einschätzung des Pathogenitätspotentials ist nach derzeitigen Erkenntnisstand zumindest die Untersuchung auf VT, *eae*-Gen und EHEC-*hly* erforderlich (BÜLTE et al., 1998).

Eine weitere Möglichkeit bietet sich durch die Subtypisierung einzelner Virulenzfaktoren, wie sie für das VT2 und auch die Familie der Intimine möglich ist. Zur Subtypisierung der VT2-Varianten kommen sowohl spezifische Primer zum Einsatz, wie bei VT2c, VT2d, VT2e und VT2f, teilweise muß anschließend ein Restriktionsverdau des Amplifikates mit *HaeIII* vorgenommen werden wie bei VT2c (GALLIEN et al., 1999b; SCHMIDT et al., 1994). Diese Art des Nachweises wird auch als PCR-RFLP bezeichnet. Um eine weitere Differenzierung von VT2c und VT2d vornehmen zu können, muß vergleichbar wie für den Nachweis von VT2c nach der Amplifikation ein Verdau mit verschiedenen Restriktionsenzymen vorgenommen werden. Durch den Verdau des Amplifikates mit *HaeIII* und *PvuII* kann VT2d in VT2d-Ount und VT2d-OX3a differenziert werden. Der Nachweis des VT2d-O111 erscheint derzeit nur durch Sequenzierung des Gens möglich (PIÉRARD et al., 1998). Eine Übersicht der z. Zt.

bekannten Subtypen von VT2 sowie ausgewählter Nachweismethoden ist in Tabelle 16 dargestellt. Neben dem Nachweis, daß VT2e zum überwiegenden Teil nur für Schweine pathogen ist, konnte durch Untersuchungen zur Prävalenz der VT2-Subtypen nachgewiesen werden, daß VT2d nicht mit dem Auftreten schwerer Erkrankungen wie HUS korreliert zu sein scheint (PIÉRARD et al., 1998, BÜLTE und HECKÖTTER, 1999; STEPHAN und HOELZLE, 2000).

Tabelle 16 Ausgewählte Nachweismethoden zur Differenzierung der VT2-Subtypen
(nach PIÉRARD et al., 1998 und GALLIEN et al., 1999b)

Subtyp	Differenzierung möglich mit	Referenz
VT2	PCR	CEBULA et al., 1994
VT2c	PCR-RFLP	SCHMIDT et al., 1994
VT2vh-a	PCR-RFLP	TYLER et al., 1991
VT2vh-b	PCR-RFLP	
VT2d	PCR	ABDULMAWJOOD und BÜLTE, 2000
VT2d-Ount	PCR-RFLP	PIÉRARD et al., 1998
VT2d-OX3a	PCR-RFLP	
VT2d-O111	Sequenzierung	
VT2e	PCR	JOHNSON et al., 1990
VT2f	PCR	GALLIEN et al., 1999b

Die Subtypisierung des *eae*-Gens, das je nach Gruppenzugehörigkeit unterschiedliche Intimine kodiert, ist bei den derzeit bekannten Subtypen α -, β -, γ -, δ - und ε -*eae* durch PCR möglich (GALLIEN et al., 2000b). Auch besteht die Möglichkeit, die Insertion der Pathogenitätsinsel LEE einschließlich des *eae*-Gens in das Genom der Stämme zu prüfen. Nach Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen bestehen durchaus Unterschiede in der Prävalenz des *eae*-Subtyps abhängig vom Serovar. So konnten GALLIEN et al. (2000b) z. B. ein gehäuftes Auftreten des γ -*eae* bei *E. coli* O157:H7 und O157:H⁻ nachweisen, ebenso wie ein bevorzugtes Vorkommen des β -*eae* bei der Serogruppe O26. Diese Unterschiede im *eae*-Subtyp könnten nach weiteren Untersuchungen für die Einschätzung der Pathogenität wichtige Hinweise geben. Ebenso könnten Unterschiede der Insertion des LEE in das Genom zusätzliche Möglichkeiten zur Gruppierung der EHEC-Stämme geben. So wird nach WIELER et al. (1997) der LEE bei EHEC der Gruppe 1 (Serovar O157) in *sel C* integriert, während es

bei der EHEC der Gruppe 2 nicht zu einer derartigen Insertion kommt. Grundsätzlich ist festzuhalten, daß durch Subtypisierung einzelner Virulenzfaktoren Korrelationen zum Entstehen bestimmter Erkrankungen aufgezeigt werden können.

2.7.2.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Modifikationen wie „Random Amplified Polymorphic DNA“ (RAPD), „Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction“ (AP-PCR)

Im Unterschied zur PCR-RFLP basiert das Prinzip der RAPD-PCR auf der Amplifikation einzelner Abschnitte des Genoms mit randomisierten Primern ohne die Sequenz der Amplifikate oder des Genoms zu kennen. Die RAPD-PCR ist somit nicht nur Spezies-bezogen bei bekannter DNA-Sequenz einsetzbar. Unter niedrig stringenten Bedingungen kommt es zum Annealing der Primer an verschiedenen Genloci, was die Amplifikation verschieden langer DNA-Fragmente bewirkt. Das Ziel ist es, mit Hilfe der erhaltenen Bandenmuster eine Differenzierung der untersuchten Stämme auf molekularer Ebene zu ermöglichen. Ebenso wird der Begriff „Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction“ (AP-PCR) für diese Methode ebenfalls verwandt. Im Unterschied zu anderen Methoden zur Feintypisierung wie der PFGE oder dem RFLP kann für eine Differenzierung mittels RAPD-PCR ein deutlich geringerer Zeiteinsatz veranschlagt werden (SWAMINATHAN et al., 1995).

Eine weitere von der RAPD-PCR abzugrenzende Feintypisierungsmethode ist die REP-PCR und die ERIC-PCR. Damit ist die Amplifikation häufig vorkommender Genabschnitte möglich. Es wurden spezifische Primer für „repetitive extragenic palindromic (REP) elements“ oder auch „enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) sequences“ im Rahmen der REP-PCR bzw. ERIC-PCR eingesetzt. Diese Methoden haben den Vorteil, daß sie spezifisch für die repetitiven Sequenzen sind und somit eine PCR unter stringenteren Bedingungen erlauben. Diese Verfahren wurden jedoch für die Gruppe der EHEC bisher nicht in größerem Umfang eingesetzt.

Speziell für EHEC wurde von den Amplifikations-bezogenen Methoden meist die RAPD-PCR zur Differenzierung eingesetzt. Ausgehend von ersten Untersuchungen zur Eignung der RAPD-PCR von WANG et al. (1993) verglichen MADICO et al. (1995) verschiedene DNA-Aufbereitungsmethoden hinsichtlich ihrer Durchführbarkeit und Wiederholbarkeit für die RAPD-PCR. Sie fanden heraus, daß die Erhitzung von Kulturen in der stationären Wachstumsphase reproduzierbare Ergebnisse für eine Differenzierung ergab. Sie werteten diese Methode insbesondere geeignet für größere

epidemiologische Studien, bei denen eine größere Anzahl von Stämmen zu untersuchen ist. Diese Ergebnisse zur Reproduzierbarkeit stehen im Gegensatz zu den Ergebnissen von TYLER et al. (1997), die nicht nur durch Einflüsse bei der DNA-Präparation, sondern auch bei der Menge der eingesetzten Primer, dem Primer/Template-Verhältnis, der Wahl der *Taq*-Polymerase, der $MgCl_2$ -Konzentration wie auch der genutzten Geräte viele Einflüsse sehen, die sich negativ auf die Wiederholbarkeit auswirken können. Die Nutzbarkeit der RAPD-PCR als Methode zur Typisierung konnten BIRCH et al. (1996) nach vergleichenden Untersuchungen mit 6 verschiedenen Primern an 27 Isolaten nachweisen. Zwei der verwandten Primer differenzierten die Stämme in 13 RAPD-Profile, ausgehend von der An- bzw. Abwesenheit einzelner Banden. Die Intensität der Amplifikate ließen sie wie auch andere Arbeitsgruppen unberücksichtigt. Eine Differenzierung in 4 verschiedene RAPD-Profile von 50 *E. coli* O157-Stämmen konnten HEUVELINK et al. (1995) nachweisen. Eine ausreichende Diskriminierung war nur mit dem Primer 1247 möglich, wenngleich 13 verschiedene Primer getestet wurden. Die geringen Unterschiede bei den humanen Isolaten führten zu dem Schluß, daß innerhalb des Serovars O157 ein sehr enger klonaler Zusammenhang besteht, dieser Klon auf der anderen Seite aber auch sehr weit verbreitet ist. Die Untersuchung weiterer Isolate aus Lebensmitteln, wie z. B. Sorbitol- und β -Glucuronidase-positive O157-Stämme neben Stämmen anderer Serovare, zeigte eine ausreichende Heterogenität in den RAPD-Profilen. Lediglich die O157-Stämme E32511 und EDL933 (EHEC-Referenzstämme) mußten dem gleichen RAPD-Profil zugeordnet werden wie die humanen Isolate. Im Rahmen epidemiologischer Untersuchungen eines Ausbruches konnte auch für non-O157-Stämme übereinstimmend mit den Ergebnissen aus PFGE, Sero-, Bio- und Phagentypisierung eine Übertragung vom Tier auf den Menschen nachgewiesen werden. Bei der Untersuchung von 12 *E. coli* O157-Isolaten aus Fleischproben konnten RADU et al. (1998) übereinstimmend mit den Ergebnissen aus Genotypisierung (VT1, VT2 und *eae*-Gen) und Antibiotikaresistenztestung eine gute Differenzierung der Isolate vornehmen sowie das Auftreten verschiedener Stämme nachweisen. Nach diesen Untersuchungen ließ sich nicht das vermehrte Auftreten eines einzelnen Phäno- oder Genotyps nachweisen, vielmehr konnte mit Hilfe der eingesetzten Methoden sowohl eine hohe phänotypische wie auch genotypische Variabilität nachgewiesen werden. Die RAPD-PCR als eine Methode zur Untersuchung des Genoms ergab vergleichbare diskriminierende Ergebnisse wie die eingesetzten phänotypischen Methoden.

2.7.2.6 DNA-Sequenzanalysen

Die Sequenzierung des Genoms eines Bakteriums ermöglicht nicht nur den Vergleich mit anderen Stämmen der gleichen Spezies, sondern kann auch über die Zahl und das Vorkommen von Genen bzw. Genabschnitten innerhalb des Genoms Aufschluß geben. Mit den derzeit zur Verfügung stehenden Möglichkeiten ist nicht in jedem Fall eine Sequenzierung des gesamten Genoms durchführbar. Möglich, zumindest für Referenz-Laboratorien, ist jedoch die Sequenzierung einzelner Gene, um daraus Verwandtschaftsgrade einzelner Isolate vergleichen zu können. Erste Daten zu den Sequenzen der Verotoxine wurden von CALDERWOOD et al. (1987) sowie auch von GANNON et al. (1990) veröffentlicht, die sowohl die Existenz verschiedener VT-Typen nachwiesen, als auch die Verwandtschaft des VT zum pflanzlichen Toxin Ricin nachweisen konnten. Die Sequenzierung des VT2-Gens ist zugleich im Rahmen der Typisierung einsetzbar, da z. B. der Subtyp VT2d-O111 nur so von den anderen VT2d-Subtypen unterscheidbar ist (PIÉRARD et al., 1998). Ebenso können Daten aus Sequenzanalysen das Auftreten verschiedener VT-Subtypen innerhalb verschiedener Serovare ermitteln. So konnten RÜSSMANN et al. (1995) bei der Untersuchung von non-O157-Stämmen nachweisen, daß Varianten des VT2 offenbar bei diesen nur sehr selten auftreten.

Um das von VTEC gebildete Enterohämolysin zu charakterisieren, sequenzierten STROEHER et al. (1993) ein Fragment des Enterohämolysin assoziierten Plasmids. Sie konnten zeigen, daß es offenbar unterschiedliche Enterohämolysine gibt, eine Hypothese, die sie durch die Sequenzierung eines Phagen-kodierten Enterohämolysins aus O26-Stämmen bestätigen konnten (BEUTIN et al., 1993). Die Sequenzierung des *hlyA*-Gens von O111-Stämmen konnte eine Homologie zum *hlyA*-Gen eines O157-Referenzstammes von 99,4 % nachweisen (SCHMIDT und KARCH, 1996).

Durch diese und vergleichbare Untersuchungen konnten auf molekularer Ebene Verwandtschaftsgrade der einzelnen Virulenzfaktoren bestimmt werden, wie auch eine Charakterisierung ihrer Typen und Subtypen erfolgen. Diese Daten ermöglichen die Entwicklung spezifischer Nachweissysteme wie PCR oder PCR-RFLP zum Nachweis dieser Subtypen. Des weiteren bieten sie eine Grundlage zur Bewertung der Ergebnisse, die mittels molekularer Techniken erhoben wurden.

3 EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1 Material

3.1.1 Referenz- und Sammlungsstämmen

In Tabelle 17 sind die in den Untersuchungen eingesetzten Referenzstämmen von *E. coli* aufgelistet. Sie gibt Auskunft über die Virulenzfaktoren der einzelnen Stämme, sowie deren Herkunft.

Für den Immunoblot nach TIMM et al. (1996) wurden die laufenden Nummern 1 bis 3 als Referenzstämmen eingesetzt. Es handelt sich hierbei um *E. coli* K 12 (C 600), die mit Hilfe von Lambda-Bakteriophagen mit den Virulenzfaktoren Verotoxin 1 (C 600 J 1) bzw. Verotoxin 2 (C600 W 34) infiziert wurden. Die Stämme wurden freundlicherweise vom Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV) Dessau bereitgestellt.

Als Referenzstämmen für die phänotypische Expression des EHEC-Hämolysins wurden die laufenden Nummern 4 bis 6 eingesetzt. Die Stämme der laufenden Nummer 4 bis 7 wurden freundlicherweise vom Zentralen Institut des Sanitätsdienstes der Bundeswehr Berlin (ZInstSanBw BER).

Tabelle 17 Virulenzfaktoren und Herkunft verwendeter Referenzstämmen

Lfd. Nr.	Stamm-bezeichnung	Virulenzfaktoren					Freundlicherweise bereitgestellt von
		Verotoxin		<i>eae</i> ¹	<i>Ehly</i> ²	<i>α-hly</i> ³	
		1	2				
1	C 600	-	-	-	-	-	BgVV Dessau
2	C 600 J 1	+	-	-	-	-	BgVV Dessau
3	C 600 W 34	-	+	-	-	-	BgVV Dessau
4	E 32511	-	+	+	+	-	ZInstSanBw BER
5	U 4 - 41	-	-	-	-	+	ZInstSanBw BER
6	KK 7/1	-	-	-	-	-	ZInstSanBw BER
7	DSM 8579	-	+	+	+	-	ZInstSanBw BER

¹ „*E. coli* attaching and effacing“-Gen ² EHEC-Hämolysin-Gen ³ Alpha-Hämolysin-Gen

3.1.2 Gesamtprobenaufkommen und Anzahl der Verpflegungs- und Betreuungsteilnehmer

Die Anzahl der an die regional zuständigen ZInstSanBw einzusendenden Proben richtet sich nach der Zahl der Verpflegungs- sowie Betreuungsteilnehmer. Die Verpflegungs- sowie Betreuungsteilnehmerzahl werden jeweils für das Folgejahr durch jede Standortverwaltung am Ende eines jeden Jahres an das ZInstSanBw Kiel gemeldet. Hier wird auf Grundlage des Erlasses BMVg-InSan I 7- Az 42-21-30 vom 01.09.1999 (VMBl. S. 357) die Zahl der einzusendenden Proben sowie deren Verteilung auf die einzelnen Lebensmittelgruppen berechnet. Dieses bildet das Gesamtprobenaufkommen des ZInstSanBw Kiel eines jeden Jahres. Innerhalb der Lebensmittelgruppe „Fleisch- und Fleischerzeugnisse“, die 20 % der Probenmenge einer jeden Standortverwaltung ausmachen, werden, je nach den in den Verpflegungseinrichtungen vorgefundenen Lebensmitteln, zum Teil auch Rohwürste eingesandt. Hieraus wurden, basierend auf der institutseigenen Registrierung, die eingesandten streichfähigen und schnittfesten Rohwürste ausgezählt und als Gesamtprobenaufkommen der Berechnung des notwendigen Stichprobenumfanges zugrunde gelegt.

Die über den Zeitraum von 1997 bis 1999 je Standortverwaltung gemeldete Anzahl der Verpflegungs- und Betreuungsteilnehmer wurde für die Charakterisierung der Population herangezogen. Für die Verteilung der Population innerhalb des untersuchten Gebietes standen Zahlen über die mit der Beschaffung von Lebensmitteln beauftragten Standortverwaltungen bzw. Krankenhausverwaltungen zur Verfügung. Des weiteren wurde die Zahl der Truppenküchen bzw. Betreuungseinrichtungen mit Stand vom August 2000 zur Berechnung der Zahl der Verpflegungs- bzw. Betreuungsteilnehmer je Truppenküche bzw. Betreuungseinrichtung zugrunde gelegt. Im weiteren wird die Zahl der Betreuungsteilnehmer der Zahl der „Soldaten“ je Standortverwaltung gleichgesetzt, Truppenküchen und Betreuungseinrichtungen werden zusammenfassend als „Verpflegungseinrichtungen“ bezeichnet.

3.1.3 Probenmaterial

Es sollten in einem definierten Zeitraum $n=224$ Proben von den für die Bundeswehr in Schleswig-Holstein/Hamburg und Niedersachsen/Bremen produzierenden Betrieben untersucht werden.

Hierbei war zu beachten, daß die Bundeswehr für die jeweiligen Standorte jeweils nur einen Liefervertrag ausschreibt und nicht einen Herstellungsvertrag. Dies bedeutet, daß die Vertragsnehmer nicht verpflichtet sind, Fleischerzeugnisse aus eigener Produktion bereitzustellen, sondern lediglich eine gewisse Warenmenge zu einem bestimmten Zeitpunkt zu liefern haben, was ihnen die Möglichkeit bietet, Fleischerzeugnisse auch im Rahmen des eigenen Einkaufs zu beziehen. Es konnte somit nicht in jedem Fall die genaue Zuordnung zu einem Hersteller erfolgen. Sämtliche beprobten Betriebe werden im Folgenden als „Lieferbetriebe“ bezeichnet. Die Proben wurden von 33 Standortverwaltungen und einer Bundeswehrkrankenhaus-Verwaltung eingesandt. Jede Standortverwaltung sendet pro Quartal eine vorgegebene Anzahl an Proben ein. Diese werden sowohl in Truppenküchen als auch in Betreuungseinrichtungen der Bundeswehr gezogen.

In das Probenaufkommen eingeschlossen waren 78 streichfähige und schnittfeste Rohwürste, die von der Landwirtschaftlichen Untersuchungs- und Forschungsanstalt - Institut für Tiergesundheit und Lebensmittelqualität (LUFA-ITL) Kiel bezogen werden konnten. Diese Proben waren hinsichtlich ihres Lieferanten anonymisiert und konnten nur nach ihrer Betriebsgröße zugeordnet werden. In die Aufteilung der Lieferbetriebe wurden die Proben des LUFA-ITL Kiel nicht einbezogen. Lieferanten, deren Betriebsgröße der eines mittelständischen Unternehmens bzw. der eines Großbetriebes/Industriebetriebes entsprach, konnten aufgrund ihrer Kapazität als potentielle Lieferbetriebe der Bundeswehr eingestuft werden.

Das Probenmaterial wurde entweder über einen Zeitraum von bis zu 3 Tagen im Kühlschrank bei $+4^{\circ}\text{C}$ oder in einer Kühltruhe bei -20°C bis zu einem Monat gelagert. Die tiefgekühlten Proben wurden über Nacht zur Untersuchung im Kühlschrank aufgetaut; die Rückstellmuster anschließend erneut bei -20°C tiefgefroren.

Die Einwaage für die Untersuchung erfolgte entweder auf Waagen (Sartorius Werke AG Präzisionswaage Typ 2203) oder im BioFlow-System (BIOSYS Bioflow, Kiestra Typ Synerga Ser.Nr. 10085) mit Analysenwaage (Sartorius Werke AG BP 1200-OCEV1).

Die Homogenisierung der Proben im Anreicherungsmedium erfolgte im Laboratory Blender Stomacher 400 (Fa. Seward Medical London). Die Anreicherungen wurden im Schüttelinkubator (GFL 3030) oder im Schüttelwasserbad (Julabo sw 1-P/3) bei 37°C und die Subkultivierungsmedien im Brutschrank (Memmert Schwabach Modell 800 oder Heraeus Typ B 5060E) inkubiert.

3.1.4 Nähr- und Testmedien

3.1.4.1 Flüssige Nährmedien

Für die Anreicherung zum Nachweis von *E. coli* O157 wurden Brillantgrün-Galle-Laktose-Bouillon (BRILA, Oxoid CM 813) und modifizierte Tryptose-Soja-Bouillon mit Novobiocin (mTSB + N, Merck 1.09205) eingesetzt.

Die Voranreicherung für den Nachweis des Verotoxin-Bildungsvermögens erfolgte in mTSB+N und die Anreicherung in modifizierter Tryptose-Soja-Bouillon (Merck 1.09205) mit 50 µg/l Mitomycin C (Sigma M0503) (mTSB+M).

Die Voranreicherung auf *Salmonella* spp. erfolgte in gepuffertem Peptonwasser (Merck 1.07228), die Selektivanreicherung in Magnesiumchlorid-Malachitgrün-Medium nach Rappaport-Vassiliadis (Rappaport-Vassiliadis-Medium; Lösung A: 6,0 g Pepton aus Casein; Merck 1.07216; 1,5 g Pepton aus Sojabohnenmehl, Merck 1.07212; 12,0 g NaCl, Merck 1.06494 auf 1,5 Liter; Lösung B: 400 g MgCl₂ x 6 H₂O, Merck 5833 auf 1 Liter.; Lösung C: 1,2 g Malachitgrün-Oxalat, Merck 1398 auf 150 ml/ 1500 ml Lösung A + 150 ml Lösung B + 15 ml Lösung C pH 5,0).

Zur Herstellung der entsprechenden Verdünnungsstufen für die Beimpfung der festen Nährmedien zur Bestimmung der Keimzahl der *Enterobacteriaceae* und Hefen wurden die Proben mit NaCl-Peptonwasser (0,85 % NaCl, Merck 1.06404; 0,1 % Pepton aus Casein, Merck 1.07216 auf 1 Liter) im Verhältnis 1:10 aufgefüllt und 2 Minuten gewalkt. Die Anzucht der Isolate für die genotypische Differenzierung erfolgte in Luria-Bertani-Medium (LB-Medium, Difco 1.10285.0500/5000).

Für die Lyophilisierung wurde Brain-Heart-Infusion-Broth (BHIB) (Merck 1.10493) mit Zusatz von hitzeinaktiviertem Pferdenormalserum (Oxoid SR 035 C) verwendet.

3.1.4.2 Feste Nähr- und Testmedien

Die Kultivierung nach Immunomagnetischer Separation nach 6 bzw. 24 Stunden erfolgte auf Hemorrhagic-Colitis-Medium (HC-Medium, SZABO et al. 1986) (Sifin Nr. TN 1223) und auf Cefixim-Tellurit-Sorbitol-MacConkey-Agar (CT-SMAC, ZADIK et al.,

1993) (Oxoid CM 813, Dynal Hamburg 1740.01). Abweichend von der bei ZADIK et al. genannten Menge von 0,1 g 1,4 Methyl-Umbiliferyl- β -D-Glucuronid (MUG)/l waren 0,05 g MUG/l Nährboden zugesetzt. Für die Beurteilung der Fluoreszenz wurde eine UV-Lampe (Typ UVL 12, Laborgeräte Vetter GmbH Wiesloch) eingesetzt.

Für den Immunoblot gem. BgVV Dessau wurde der Syncase-Agar mit Mitomycin C (pro Liter Nährmedium: 15 g Noble Agar (Difco 0142-15-2), 10 g Casamino Acids (Difco 0230-01-1), 1,17 g NH_4Cl (Merck 1.01145), 5 g KH_2PO_4 (Merck 4873), 12,61 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$ (Merck 6576), 1 ml Salzmischung aus 5 % $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ (Merck 5886) und 0,5 % MnCl_2 (Merck 5934) in 0,001 n H_2SO_4 (Merck 1.00731), 2 g Glukose (Merck 1.08342), 0,02 g Nikotinsäure (Merck 818714), 0,04 g DL-Tryptophan (Merck 8375), 25 μg Mitomycin C (Sigma M0503), pH 8,0) verwendet.

Die Subkultivierung für die Untersuchung auf Salmonellen erfolgte auf BPLS-Agar (Merck 1.07237) und XLD-Agar (Merck 1.05287). Für die Untersuchung auf *Enterobacteriaceae* wurde Violet-Red-Bile-Dextrose-Agar (VRBD-Agar, Merck 1.10275) und für die Untersuchung auf Hefen YGC-Agar (Merck 1.16000) eingesetzt.

Zur Überprüfung der Reinheit der Referenzstämmen und der Feldstämmen wurden die Stämme auf Blut-Agar (3,0 g NaCl, Merck 1.06404; 5,0 g Hefeextrakt, Oxoid L 21; 3,0 g Fleischextrakt, Oxoid L 29; 15,0 g Pepton aus Casein, Merck 1.07216; 14,35 g Agar Agar, Oxoid L 11; 50 ml steriles Schafblut auf 1 Liter pH $7,3 \pm 0,1$) ausgestrichen.

3.1.5 Immunomagnetische Separation

Für die Immunomagnetische Separation wurden Dynabeads[®] M-280 anti *E. coli* O157 (Deutsche Dynal[®], Hamburg 710.04) verwendet. Die Inkubation des Gemisches aus Dynabeads[®] und Anreicherung erfolgte im Dynal[®] Sample-Mixer (Deutsche Dynal[®], Hamburg 159.02) mit Rotor (Deutsche Dynal[®], Hamburg 159.05), passend für Magnethalterungen (Deutsche Dynal[®], Hamburg 120.09) für 10 Reaktionsgefäße 1,5 ml (Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH 0030 120.086). Die MPC[®] M Magnethalterung wurde ebenfalls von Dynal (Deutsche Dynal[®], Hamburg 120.09) bezogen. Als Waschpuffer wurde PBS Tween[®] (0,55 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, Merck 1.06370; 2,85 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$, Merck 1.06580; 8,75 g NaCl, Merck 1.06494; 1,0 ml Tween[®] 20, Merck 822 184 auf 1 Liter pH 7,2) verwendet.

Die Identifizierung von *E. coli* O157-Stämmen erfolgte in der Objektträgeragglutination mit Anti-O157 Serum (Fa. Behring, OQMH 05). Zur Bestätigung wurden die Isolate zusätzlich mit der Latex-Agglutination O157 (Oxoid DR 620M) agglutiniert.

3.1.6 Isolierung von VT 1- und VT 2-bildenden *E. coli*-Stämmen

Das Screening auf VT-bildende Stämme erfolgte nach vorheriger Anreicherung mit Hilfe des Premier EHEC-Testes, HISS Diagnostics (Enzym-Immunoassay zum Nachweis von enterohämorrhagischen *E. coli* Toxinen in humanen Stuhlproben und Kulturoisolate, Kat.Nr. 608096, Zul.-Nr. 49a/96). Es handelt sich hierbei um einen in vitro-Mikrotiter-EIA, der den Nachweis von Verotoxinen 1 und 2 mit Hilfe monoklonaler anti-Shiga-like Toxin-Antikörper ermöglicht (DONOHUE-ROLFE et al., 1989).

Das Schütteln zwischen den einzelnen Arbeitsschritten erfolgte im Mikrotiter Varishaker-Inkubator (Dynatech Cat.No. AM89A) und die photometrische Auswertung im Mikroplattenreader MR 5000 (Dynatech).

Für die Isolierung bei positivem Ergebnis des Premier EHEC mit Hilfe des Immunoblot wurden folgende Materialien verwendet:

- Syncase-Agar (s.o.)
- Nitrocellulose-Membran Optipran BA-S 85/20, 0,45 µm, Ø 82 mm (Schleicher/Schüll 439 900)
- Celluloseacetat-Membran OE 67/20, 0,45 µm, Ø 82 mm (Schleicher/Schüll 19 404 088)
- Monoklonale Antikörper (mAk): Zellkulturüberstände der Hybridomazelllinien 13C4 (ATCC CRL-1794) = anti-VT1 und 11E10 (ATCC CRL-1907) = anti-VT2 (vor dem Gebrauch 1:20 bzw. 1:80 in Blocklösung verdünnt)
- PBS/Tween: 0,98 mmol NaH₂PO₄ (Merck 6346), 5,6 mmol Na₂HPO₄ x 7 H₂O (Merck 6578), 86 mmol NaCl (Merck 1.06404), 0,5 % Tween 20 (Merck 822 184), pH 7,5
- Blocklösung: 0,6 % Magermilchpulver (Oxoid L 31) in PBS/Tween
- Konjugat: Goat-Anti-Mouse-IgG1-AP (human absorbed) (Serva 1070-04) zum Gebrauch 1:3000 verdünnt in Blocklösung
- Farbreagenz: 3,3 mg 4-Nitro-Blautetrazolium-Chlorid (NBT) (Roth 4421) und 1,65 mg 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat (BCIP) (Roth A155) in 10 ml 0,1 M Trispuffer (Merck 1.08382), pH 9,5
- Stopplösung: 20 mM EDTA-Na₂ (Merck 8413 oder Serva 11280) in PBS

3.1.7 Phänotypische Differenzierung

Die Fähigkeit der Isolate, Sorbitol zu fermentieren, wurde auf dem CT-SMAC sowie dem HC-Medium nach SZABO et al. (1987), die β -Glucuronidaseaktivität zusätzlich auf dem HC-Medium geprüft. Für die biochemische Identifizierung der Isolate wurde das BBL[®] Enterotube[™] II (Becton Dickinson, 4373176) mit Hilfe von Indol-Reagenz nach Kovacs (Merck 1.09203.0100) und Voges-Proskauer 1 und 2 (BioMérieux 70420 und BioMérieux 70430) eingesetzt. Darüber hinaus wurden zweifelhafte Ergebnisse im Api[®] 20E-System überprüft.

Die biochemische Differenzierung Cytochromoxidase-positiver, Katalase-positiver GRAM-negativer Stäbchenbakterien erfolgte mittels BBL[®] OxiFermtube[™] (Becton Dickinson), zweifelhafte Ergebnisse wurden im Api[®] 20NE überprüft.

Die Fähigkeit zur Bildung von Cytochromoxidase wurde mit Bactident[®] Oxidase (Merck, 1.13300) geprüft. Katalase-Bildung wurde mit 3%iger H₂O₂-Lösung (Merck 1.08597) nachgewiesen.

Zur Differenzierung der Geißel-Antigene (H-Phasen) bei *Salmonella* spp. wurde ein Schwärmagar verwendet (3 g NaCl, Merck 1.06 H 04; 5 g Hefeextrakt, Oxoid L 21; 3 g Fleischextrakt, Oxoid L 29; 15 g Pepton aus Casein, Merck 1.07216; 4 g Agar Agar, Oxoid L 11 auf 1 Liter pH 7,3 $\pm$ 0,1).

3.1.8 Genotypische Differenzierung

3.1.8.1 Primer für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

In Tabelle 18 sind die für die Bestimmung der Virulenzfaktoren eingesetzten Primer-Paare mit ihren Sequenzen und der Angabe der Literaturstelle, aus der die Sequenzen entnommen wurden, aufgelistet.

Die Herstellung der Primer-Paare erfolgte durch das TIB MolBiol Syntheselabor Berlin.

Tabelle 18 Bezeichnung der eingesetzten Primer mit Sequenz und Literaturangabe

Primer Bezeichnung	Virulenz-Gene	Länge der PCR- Produkte	Primersequenzen	Literatur
KS 7/ KS 8	<i>vtx1</i> (Verotoxin 1) Referenzstamm C600 (H19J)	282 bp	5'CCC GGA TCC ATG AAA AAA ACA TTA TTA ATA GC 5'CCC GAA TTA AGC TAT TCT GAG TCA ACG	SCHMIDT et al. (1994)
GK5 / GK6	<i>vtx2</i> (Verotoxin 2) Referenzstamm C600 (933W)	270 bp	5'ATG AAG AAG ATG TTT ATG GCG 5'TCA GTC ATT ATT AAA CTG CAC	
eae 1 / eae 2	<i>eae</i> (<i>E. coli</i> attaching-and- effacing-Gen) Referenzstamm O157 : H7 EDL 933	628 bp	5'TGC GGC ACA ACA GGC GGC GA 5'CGG TCG CCG CAC CAG GAT TC	
hlyA 1 / hlyA 4	<i>EhlyA</i> (EHEC- Hämolysin) Referenzstamm O157 : H7 EDL 933	1551 bp	5'GGT GCA GCA GAA AAA GTT GTA 5'TCT CGC CTG ATA CTG TTT GGT A	SCHMIDT et al. (1995)

3.1.8.2 Medien zur Amplifizierung

Zur Amplifikation der gesuchten Gensequenzen wurde GenAmp 10xPCR Buffer (Perkin Elmer, N808-0129) und PCR-Wasser (Invitrogen, 46-0360), dNTP's (Invitrogen, 10 mM dNTP's) und die Taq DNA-Polymerase der Firma Boehringer Mannheim (Cat.-No. 1146 173) eingesetzt. Das Paraffinöl zur Übersichtung des PCR-Ansatzes stammte von Perkin Elmer (NUJOC Mineral Oil Part.No. 0186-2302). Als Reaktionsgefäße wurden Gene Amp[®] Reaction Tubes von Perkin Elmer (Part No. N801-0180) sowie, je nach Thermocycler, Biozym PCR tubes 0,2 ml, ultradünn (Art.Nr. 710905) verwendet. Für die PCR- ebenso wie für die RAPD-Untersuchungen wurde das GeneAmp[®] PCR System 2400 (Perkin Elmer Applied Biosystems, Part.-No. N8030002) eingesetzt.

3.1.8.3 Random Amplified Polymorphic DNA-Analyse (RAPD)

Es wurde ein Fertigtestkit der Fa. Amersham Pharmacia Biotech Inc. (Ready To Go[™] RAPD Analysis Beads, 27-9502-01, Amersham Pharmacia Biotech Inc.) verwendet. Die Anzucht der Reinkulturen erfolgte in 2 ml LB-Medium im Incubator Shaker Modell G25 (Fa. New Brunswick Scientific Co.INC, Labotect Göttingen).

Das Testkit enthielt die nachfolgend aufgeführten Primer mit Sequenzangabe:

- Primer 1 5'-[GGT GCG GGA A]-3'
- Primer 2 5'-[GTT TCG CTC C] -3'
- Primer 3 5'-[GTA GAC CCG T] -3'
- Primer 4 5'-[AAG AGC CCG T] -3'
- Primer 5 5'-[AAC GCG CAA C] -3'
- Primer 6 5'-[CCC GTC AGC A] -3'

Der Primer 4 entsprach der Sequenz des von HEUVELINK und Mitarbeitern (1995) eingesetzten Primers 1247 für die RAPD-PCR von VTEC-Stämmen. Die Primer wurden in einer Endkonzentration von 5 pmol/µl eingesetzt.

3.1.8.4 Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)

Die Bebrütung der Bakterienstämme erfolgte in einem Standardinkubator bei 37°C, die Inkubationsschritte im Wasserbad im Zuge der Aufbereitung der DNA im Wasserbad 3041 der Firma Köttermann sowie Wasserbad GFL 1002 (Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel). Als Gießform für die Herstellung der Agaroseblöcke wurde der Disposable Plug Mold (BioRad, Best.-Nr. 170-3713) genutzt, die Einstellung der

Bakteriendichte erfolgte im Hitachi U-2000 Spectrophotometer (Best.-Nr. 121-0005 und 121-0120).

Für die Anzucht der Bakterienstämme sowie die Präparation der DNA und deren Verdau wurden nachfolgend in Tabelle 19 aufgeführte Nährmedien und Reagenzien verwendet (Protokoll mod. nach MIRANDA et al., 1991).

Tabelle 19 Nährmedien und Reagenzien für die Anzucht, DNA-Präparation und den Restriktionsverdau der Bakterienisolate zur Feintypisierung mittels Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)

Bezeichnung	Verwendung	Zusammensetzung
Tryptic Soy Broth (TSB)	Anzucht des Isolates	
TE-Pufferlösung (pH 7,6)	Reinigung der Bakteriensuspension	10 mM Tris-HCl (Carl Roth GmbH & Co., 48552) 1 mM EDTA (III) ad 1 l (Ethylendinitrotetraessigsäure Dinatriumsalz-Dihydrat für die Molekularbiologie, Tritiplex III, Fa. Merck, Darmstadt, 112029)
1.5 %ige InCert Agarose (BioWhittaker Molecular Applications, Rockland, 04841)	Aufnahme der Bakteriensuspension	15 mg InCert Agarose in 1 ml TE-Puffer
Lysispuffer	Lysis der in Agarose eingegossenen Bakterien	1 M NaCl 5 mm Tris 100 mM EDTA (Tritiplex III) 0,5 % Brij (Polyoxyethylenlaurylether) (Fa. Merck, 801962) 0,5 % Laurylsarkosin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, L5777) 0,2 % Desoxycholat ad 500 ml Aqua bidest.
Proteinase K-Lösung	Deproteinisierung	15,6 mg/ml Proteinase K (Roche Diagnostics, Mannheim, 1373 196)
PMSF-Lösung	Inhibierung der Proteinase K	100 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)
Restriktionspuffer	Restriktase-Verdau mit XbaI	20 µl XbaI Universalpuffer 10x (SuRE/Cut Buffer H for Restriction Enzymes, Roche Diagnostics, Mannheim, 1417 991)) 5 µl Restriktionsendonuclease XbaI (10 U/µl) (Roche Diagnostics, Mannheim, 1417 991) 175 µl Aqua bidest

3.1.8.5 Medien zur Darstellung der Amplifikate

Zur Darstellung der Amplifikate aus der PCR sowie der RAPD-PCR wurde ein 2 %iges TAE-Agarosegel (4 g Agarose (SeaKem ME, Biozym Hameln, Best.-Nr. 840014) in 200 ml TAE-Puffer (40 mM TRIS (Boehringer Mannheim, Best.-Nr. 127434), 20 mM Natriumazetat (Merck, Best.-Nr. 101539), 2 mM EDTA (Boehringer Mannheim, Best.-Nr. 808261), pH 8 mit konz. Essigsäure) mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid (Boehringer Mannheim, Best.-Nr. 200271) verwendet. Zur Reduktion der Hintergrundfluoreszenz wurden die gefärbten TAE-Agarosegele im Bedarfsfall in TAE-Puffer gewässert. Das TAE-Agarosegel wurde für die Bestimmung der Virulenzfaktoren in eine Horizon 58 Mini-Gelkammer (Gibco, Eggenstein), für die Auswertung der RAPD in eine BioRAD Sub-Cell[®] GT gegossen und mit etwa 200 ml bzw. 1000 ml TAE-Puffer bedeckt. Als Spannungsquelle diente ein Powerpac 300 (BioRad München). Zur Beschickung der Kavitäten des TAE-Agarosegels mit den Amplifikaten wurde TBE Sample Buffer (6x) (Novex, Frankfurt am Main, Best.-Nr. LC6676) verwendet.

Als Marker für die Bestimmung der Größe der Amplifikate wurde der AmpliSize[™] Molecular Ruler 50-2000 bp Ladder von Bio-Rad (Cat.No. 170-8200 250 µl 10 ng/band/µl) eingesetzt, zusätzlich zur Auswertung der RAPD-PCR der BRL 1 kb DNA Ladder (Bethesda Research Laboratories Life Technologies, Inc. 5615SA/SB, 1,04 µg/µl)

Die Dokumentation der Gele der **RAPD-PCR** erfolgte mit der Software Quantity One Version 4.2.1 (BioRAD, München). Damit war ebenso die zusätzliche rechnergestützte Auswertung der Bandenmuster möglich.

Die Elektrophorese nach **Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)** wurde in 1,1 %iger Pulsed Field Certified Agarose, ultra pure DNA Grade Agarose (BioRad, Best.-Nr. 162-0137) (1,32 g Pulsed Field Certified Agarose in 120 ml 0,5x TBE-Puffer, 0,5 M TRIS-(hydroxymethyl) aminomethan, 0,5 M Borat und 10 mM EDTA Tritriplex II) im CHEF-DR.TM II System (BioRad Labs, Richmond, CA, USA, Best.-Nr. 170-3612-3729) durchgeführt. Als Marker wurden sowohl der Lambda Ladder PFGE Marker (New England Biolabs, Best.-Nr. N1340S) als auch der Low Range PFGE Marker (New England Biolabs, Best.-Nr. N0350S) eingesetzt. Die rechnergestützte Auswertung erfolgte mit der Auswerte-Software GelCompare 4.0 (Fa. Applied Maths, Kortijk, Belgien).

3.2 Methodik

3.2.1 Aufbewahrung und Anzuchtung von Referenz- und Sammlungsstämmen sowie Isolaten aus Feldproben

Die Referenzstämmen sowie O157-positive bzw. VT-positive Stämme wurden auf Blut-Agar bei 37°C für 16-18 h aerob bebrütet. Anschließend wurden die Kolonien mit einem sterilen Tupfer abgenommen und in 18 ml BHIB suspendiert. Die Suspension wurde mit 4 ml hitzeinaktiviertem Pferdenormalserum versetzt und zu je 1 ml in Ampullen mit Rollrand und Gummistopfen aliquotiert. Der erste Gefrierschritt erfolgte bei –20°C, daraufhin wurde die Lyophilisation bei einem Druck von $5,0 \times 10^{-1}$ bar und etwa –27°C bei gleichzeitiger Temperatur von + 24°C in der Heizplatte durchgeführt. Zur Kontrolle wurde eines der Lyophilisate daraufhin resuspendiert und auf Reinheit und die phänotypische Expression der vorher festgestellten biochemischen Merkmale und Virulenzfaktoren überprüft. Die Lagerung der Lyophilisate erfolgte bei +4°C. Die Gebrauchskulturen wurden auf Blut-Agar ausgestrichen und bei 37°C über Nacht inkubiert und anschließend bei +4°C gelagert.

O157-positive bzw. VT-positive Stämme wurden zusätzlich im Mikrobanksystem (Mast Diagnostica 291604) bei –20°C gelagert. Die entsprechenden Arbeiten erfolgten nach den Vorgaben des Herstellers sowie nach Anzuchtung der Stämme auf Blutagar bei 37°C für 16-18 h.

Die Arbeiten zur Lagerung und Aufbewahrung der Referenz- und Feldstämmen erfolgten an einer Köttermann Sterilwerkbank 8511.

3.2.2 Einteilung der Lieferbetriebe

Die Einteilung der Lieferbetriebe in Großbetriebe/Industriebetriebe erfolgte auf der Grundlage des Mitgliederverzeichnisses des Verbandes der Deutschen Fleischwarenindustrie e.V. mit Stand 03.11.1999. Die übrigen Lieferbetriebe wurden als mittelständische Betriebe eingeordnet. Aufgrund der großen Mengen, die an jede Standortverwaltung zu liefern sind, werden Kleinbetriebe/Handwerksbetriebe nur in Ausnahmefällen unter Vertrag genommen.

Zusätzlich erfolgte eine Einteilung in EU-zugelassene bzw. registrierte Fleischverarbeitungsbetriebe. Die Klassifizierung der Lieferbetriebe in EU-zugelassene Betriebe erfolgte auf Grundlage der „Bekanntmachung der zugelassenen Fleischverarbeitungsbetriebe in der Bundesrepublik Deutschland vom 07. Juli 1998“.

Im weiteren wurden die eingesandten Proben je Lieferbetrieb sowie je Quartal erhoben; zugleich wurde die Verteilung der Lieferbetriebe und der Proben auf die Kategorien „Betriebsgröße“ und „EU-Zulassung“ vorgenommen.

Die Anzahl der von 1997 bis 1999 untersuchten Rohwürste wurde der Anzahl der an das ZInstSanBw Kiel eingesandten Rohwürste in ihrer prozentualen Verteilung auf die Standortverwaltungen umgelegt; ebenso wurde die prozentuale Verteilung der Soldaten auf die Standortverwaltungen vorgenommen. Des weiteren erfolgte die Darstellung der zu verpflegenden Soldatenzahlen im Bereich Schleswig-Holstein/Hamburg sowie Niedersachsen/Bremen auf Grundlage der von den betreffenden Standortverwaltungen gemeldeten Zahlen im Mittel aus den Jahren 1997 bis 1999. Die Gesamtzahl der Betreuungsteilnehmer im Bereich einer Standortverwaltung wurde der Anzahl der Soldaten gleichgesetzt, die Zahl der Verpflegungsteilnehmer (Teilnehmer an der Gemeinschaftsverpflegung) je Standortverwaltung wurde ebenfalls im Mittel über den Untersuchungszeitraum angegeben. Die Anzahl der Gruppenerkrankungen in den Jahren 1997 bis 1999 wurde zusammenfassend vor dem Hintergrund dargestellt, ob Infektionen mit VTEC/EHEC oder *Salmonella* spp. auftraten.

3.2.3 Sensorische Untersuchung

Die sensorische Untersuchung der Feldproben wurde als einfach beschreibende sensorische Prüfung mit Skale vorgenommen, wobei die Bewertung der erhobenen Befunde nach dem „Prüfschema für Rohwurst“ der Deutschen Landwirtschaftsgesellschaft e.V. (DLG) Stand 1997 erfolgte. Der pH-Wert wurde mit der pH-Wert-Meßsonde (Fa. WTW pH 530) bestimmt.

3.2.4 Mikrobiologische Untersuchungen auf *Enterobacteriaceae*, Hefen und *Salmonella* spp.

Für den Nachweis von Salmonellen wurden 25 g des Probenmaterials in 225 ml gepuffertes Peptonwasser im Stomacherbeutel (Stomacher® Lab System Modell 400 Bags 6041) eingewogen und für 2 Minuten gewalkt. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurde 1 ml aus der Voranreicherung in 10 ml Rappaport-Vassiliadis-Medium überimpft und für weitere 48 h bei 42°C inkubiert. Der Ausstrich erfolgte auf BPLS- und XLD-Agar (nach L 00.00 20 der amtlichen Sammlung für Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG). Fragliche sowie charakteristische Kolonien wurden auf XLD-Agar und Blut-Agar subkultiviert und gem. Kap. 4.2.8 differenziert.

Die quantitative Bestimmung der *Enterobacteriaceae* erfolgte nach den Vorgaben L 08.00 29 der amtlichen Sammlung für Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG. Für die Erstverdünnung wurden 10 g der Probe in 90 ml NaCl-Peptonwasser im Stomacherbeutel (Bagsystem®Line Bagfilter®) eingewogen und 2 Minuten gewalkt. Die weiteren Dezimalverdünnungen wurden nach L 06.00 16 der amtlichen Sammlung für Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG mit NaCl-Peptonwasser angesetzt. Im Doppelansatz wurde auf VRBD-Agar ausgespatelt, die Berechnung der Koloniebildenden Einheiten je Gramm (KbE/g) erfolgte als gewichtetes arithmetisches Mittel.

Die quantitative Bestimmung der Hefen erfolgte in Anlehnung an L 01.00 37 der amtlichen Sammlung für Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG nach Herstellung der Dezimalverdünnungen wie bereits beschrieben (siehe quantitative Bestimmung der *Enterobacteriaceae*) auf YGC-Agar ebenfalls als gewichtetes arithmetisches Mittel aus dem Doppelansatz.

3.2.5 Nachweis von *E. coli* O157-Stämmen

Für den Nachweis wurden jeweils 25 g des Probenmaterials in Stomacherbeutel eingewogen und mit mTSB+N bzw. BRILA aufgefüllt. Daraufhin wurden sie 2 Minuten gewalkt und sodann in einen 500 ml Erlmeyerkolben umgefüllt. Die Bebrütung im Schüttelinkubator erfolgte bei 37°C und 100 U/min über 24 Stunden.

3.2.5.1 Immunomagnetische Separation

Sie basiert auf dem Prinzip, paramagnetische Polystyrolpartikel (Dynabeads®) mit spezifischen Antikörpern zu markieren, um dann über mehrere Waschungen zu einer Aufreinigung und Anreicherung zu kommen. Für die kulturelle Anreicherung wurden jeweils 2 x 25 g in Stomacherbeutel (Stomacher® Lab System Modell 400 Bags 6041) eingewogen und mit je 225 ml BRILA bzw. mTSB+N aufgefüllt. Daraufhin wurden sie 2 Minuten gewalkt und sodann in einen 500 ml Erlenmeyerkolben umgefüllt. Die Bebrütung im Schüttelinkubator erfolgte bei 37°C und 100 U/min (DIN 10167) über 24 Stunden.

Die IMS wurde sowohl nach sechs als auch nach 24 h durchgeführt. 20 µl Dynabeads wurden jeweils in Reaktionsgefäße 1,5 ml (Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH 0030 120.086) vorgelegt, sodann 1 ml aus der Bouillon (BRILA bzw. mTSB+N) zugegeben. Es erfolgte nun ein 10 Minuten langes Durchmischen der Aliquote mit dem Sample Mixer, während der sich die spezifischen Antigen-Antikörperbindungen ausbildeten. Danach wurde der Magnetstreifen in die Halterung geschoben, der Magnetstreifen einmal geschwenkt und 3 Minuten inkubiert. Der Überstand wurde bis auf einen Rest von etwa 30 µl mit Pasteurpipetten (Fortuna® 3.525) abgesaugt, nach Herausnehmen des Magnetstreifens in 1 ml PBS-Tween resuspendiert und durch dreimaliges Schwenken erneut resuspendiert. Dieser Waschvorgang wurde noch zweimal wiederholt. Nach dem letzten Waschvorgang wurde der Überstand vollständig abgesaugt und dann in 100 µl PBS-Tween aufgenommen.

Nach erneutem Resuspendieren des Eluates mit dem Laborschüttler (Heidolph Elektro KG Typ Reax1) wurden jeweils 50 µl des Eluates auf HC-Medium und CT-SMAC aufgebracht, indem sie im oberen Drittel des Nährbodens mit einem sterilen Wattebausch verteilt wurden, um dann in engen Ausstrichen auf dem Nährboden verteilt zu werden. Die Nährböden wurden daraufhin für 18-24 Stunden bei 37°C (CT-SMAC) bzw. bei 41°C (HC-Medium) bebrütet und am darauffolgenden Tag ausgewertet.

3.2.5.2 Identifizierung und Bestätigung

Auf HC-Medium typisch wachsende Kolonien sind farblos bzw. bläulich, da die Farbe des Nährbodens durchscheint (Sorbitol-Verwertung: negativ). Sie haben einen Durchmesser von mehr als 1 bis max. 2 mm und zeigen bei Betrachtung unter langwelligem UV-Licht (Wellenlänge 366 nm) keine Fluoreszenz (MUG-negativ).

Auf CT-SMAC-Nährboden erscheinen typische Kolonien entsprechend der Farbe des Nährbodens durchscheinend bräunlich mit einem Durchmesser von 1 bis 2 mm.

Die Untersuchung auf das Oberflächenantigen O157 erfolgte mit der Objektträgeragglutination (BRÜCKLER et al. 1991, MÜLLER, 1992) an bis zu zehn typischen Kolonien. Im Falle zweifelhafter und positiver Ergebnisse wurde auf Blut-Agar subkultiviert und nach Bebrütung über Nacht bei 37°C erneut auf das Serovar O157 mit Antiserum und Latexagglutination untersucht.

3.2.6 Nachweis von verotoxinogenen *E. coli*-Stämmen

Für den Nachweis der VTEC wurden jeweils 25 g des Probenmaterials in Stomacherbeutel eingewogen und mit mTSB + N aufgefüllt. Zusätzlich wurden weitere 25 g Probenmaterial in 225 ml BRILA eingewogen. Daraufhin wurden sie 2 Minuten gewalkt und sodann in einen 500 ml Erlmeyerkolben umgefüllt. Die Bebrütung im Schüttelinkubator erfolgte bei 37°C und 100 U/min über 6 Std.. Für den Nachweis verotoxinogener *E. coli* mit dem Premier EHEC-Test wurden nach 6 Std. Anreicherung aus der mTSB+N 1 ml entnommen und in 4 ml mTSB+M in ein Reagenzglas überführt wurden. Dies wurde daraufhin für 16 bis 24 Std. im Schüttelwasserbad bei 37°C und 180 U/min bebrütet (BÜLTE et al., 1996; KLIE et al., 1997).

Nach 6 und nach 24 Stunden Anreicherung wurde je Anreicherungsmedium 1 ml entnommen und zurückgestellt, um gegebenenfalls bei positivem Ergebnis des ELISA eine Isolierung über den Immunoblot vornehmen zu können (vgl. Kap. 3.2.6.2).

3.2.6.1 Screening mit Enzym-Immunoassay

Es wurden je 50 µl aus mTSB+M und aus BRILA in 200 µl Probenverdünner pipettiert und auf dem Vortex 15 Sekunden gemischt. Nun wurden jeweils 100 µl der Suspension in die mit monoklonalen Antikörpern beschichteten Kavitäten pipettiert, 30 Sekunden im Mikroplattenschüttler durchmischt und sodann 60 Minuten bei 21 bis 23 °C inkubiert. Darauf folgte 5 x das manuelle Waschen der Kavitäten mit dem im Testkit enthaltenen Waschpuffer. Die Kavitäten wurden jeweils auf Papierhandtüchern ausgeklopft. Nach Zugabe von 50 µl des detektierenden Antikörpers erfolgte eine 30 minütige Inkubation mit anschließendem Waschen nach dem oben beschriebenen Schema. Nun wurden 50 µl des Konjugates zugegeben und erneut nach 30 Minuten Inkubation gewaschen. Der Zugabe von 50 µl des Farbreagens folgte nach 10 Minuten Inkubation die Zugabe von 50 µl Stopreagenz. Nach erneutem Schütteln im Mikroplattenschüttler für 30 Sekunden wurde ausgewertet.

Die photometrische Auswertung erfolgte monochromatisch bei einer Wellenlänge von 450 nm im Mikroplattenreader. Der Mikroplattenreader wurde gegen Luft auf Null geeicht.

Entgegen den Angaben des Herstellers wurden als positiv bereits Extinktionswerte von $\geq 0,150$ und nicht erst von $\geq 0,180$ angegeben.

3.2.6.2 Isolierung mit dem Immunoblot-Verfahren

Mit dem EIA als VT-positiv bewertete Proben wurden zur Bestätigung des Ergebnisses und zur Isolierung der Stämme mit dem Immunoblot weiter untersucht (nach HULL et al., 1993 und TIMM et al., 1996).

Dazu wurde aus der Voranreicherung nach 6 Std. und nach 24 Std. je 1 ml als Aliquot aus der mTSB+N bzw. aus der BRILA bei + 4°C über Nacht gelagert.

Zunächst wurde auf den Syncase-Agar die NC-Membran luftblasenfrei aufgespatelt. Darauf wurde die CA-Membran so auf die NC-Membran gelegt, daß die Raster der beiden Membranen genau deckungsgleich waren. Zum Abschluß erfolgte nochmals ein Glätten der Membranen mit dem abgeflammt Glasspatel und die Beschriftung der Membranen.

Nun wurden aus den zurückgestellten Aliquoten der Anreicherungen 100 µl im Bereich der ersten drei Kästchenreihen aufgetragen. Mit einem Glasstab wurde die Flüssigkeit mit kreisförmigen Bewegungen im Bereich der ersten drei Kästchenreihen verteilt, bis sie gleichmäßig eingezogen war. Daraufhin erfolgte ein sehr enger, paralleler Ausstrich mit einem Glasstab über die gesamte Fläche der Membran, immer ausgehend von dem zuerst beimpften Bereich, um das Probenmaterial gleichmäßig zu verteilen. Als Kontrollen wurden auf einer Extraplatte auf einem eigenen Membranteil die 3 Kontrollstämme gedotet. Die so beimpften Nährböden wurden bei 37°C für 16-18 Std. bebrütet.

Am darauffolgenden Tag wurde die CA-Membran abgehoben, die NC-Membran in eine Glaspetrischale gelegt und die CA-Membran wieder auf den Syncase-Agar gelegt und in den Kühlschrank gestellt. Sämtliche weiteren Arbeitsschritte erfolgten -offen- in der Glaspetrischale unter ständiger Bewegung auf der Diffusions-Entfärb-Apparatur (Desaga GmbH Typ 146340).

Für die Detektion des in die NC-Membran diffundierten Verotoxins wurde die Membran 3 x 5 min mit PBS/Tween gewaschen, für 1 Stunde frisch angesetzte Blocklösung hinzugegeben und anschließend für 2 Stunden für VT1 bzw. VT2 spezifische monoklonale Antikörper zur Detektion des gebundenen Verotoxins zugefügt (1:20 bzw. 1:80 in Blocklösung verdünnt). Daraufhin wurde erneut 4 x 5 min mit PBS/Tween gewaschen und dann für 1 Std. Konjugat hinzugegeben (1:3000 in Blocklösung verdünnt). Währenddessen wurde das Farbreagenz angesetzt. Jetzt wurde erneut 5 x 5 min gewaschen, für 10-15 min Farbreagenz hinzugegeben und danach für 30-60 min Stopplösung. Die Membran wurde auf einer Glasplatte getrocknet. Das Verotoxin war nun durch eine Farbreaktion sichtbar und durch den Vergleich der Raster der NC- und der CA-Membran konnte das VT-Bildungsvermögen einer bestimmten Kolonie zugeordnet werden. Die betreffende Kolonie konnte auf eine Blutplatte überimpft werden.

3.2.7 Phänotypische Differenzierung der Isolate

3.2.7.1 Biochemische Differenzierung der Isolate

***E. coli*-Stämme**

Von verdächtigen Kolonien wurde neben Prüfung auf Cytochromoxidase ein BBL® Enterotube™ II nach den Vorgaben des Herstellers angelegt. Des weiteren wurden die fraglichen Isolate auf HC-Medium, CT-SMAC und Blut-Agar subkultiviert, um Sorbitol-Fermentation, β -Glucuronidaseaktivität, EHEC-Hämolysin-Bildung und auf Kalium-Tellurit-Empfindlichkeit zu prüfen.

Der Nachweis der Verotoxin-Bildung bei Isolaten erfolgte mittels des bereits zuvor beschriebenen ELISA's sowie mit Hilfe des VTEC-RPLA (Oxoid) nach den Angaben des Herstellers.

Die Differenzierung Cytochromoxidase-positiver Isolate erfolgte bei Gram-negativen, Katalase-positiven Stäbchenbakterien mit Hilfe des BBL® OxiFermtube™ nach den Vorgaben der Hersteller.

***Salmonella*-Stämme**

Präsumtiv verdächtige *Salmonella*-Kolonien wurden mit Hilfe des BBL® Enterotube™ II biochemisch differenziert. Zugleich erfolgte die serologische Bestätigung mit omnivalentem Antiserum (L 00.00-20 der amtlichen Sammlung für Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG) (Omnivalentes Testreagens Anti-Salmonella Dade Behring 09430 OORMV 10) sowie mit polyvalenten Seren (Salmonella Testserum Polyvalent I, Dade Behring 09430 OORMT 10; Salmonella Testserum Polyvalent II, Dade Behring 09430 OORMU 10; Salmonella Testserum Polyvalent III, Dade Behring 09430 OORMW 10) in der Objektträgeragglutination (J. BRÜCKLER et al. 1991, MÜLLER, 1992).

Die Bestätigung bei zweifelhaften Ergebnissen aus den Systemen mit den oben genannten „Bunten Reihen“ erfolgte mittels Api® 20E bzw. Api® 20NE.

3.2.7.2 Serotypisierung

***Salmonella*-Stämme**

Die Serotypisierung der *Salmonella*-Isolate wurde mit handelsüblichen Antiseren der Firmen Dade Behring und Sifin (div. Zulassungsnummern) in der Objektträgeragglutination vorgenommen. Die Bestimmung der Geißelantigene (H-Phase) wurde nach Anreicherung auf Schwärmagar vorgenommen. Nach der Bestimmung der ersten H-Phase wurden für die Bestimmung der zweiten H-Phase auf dem Schwärmagar 2-3 Tropfen des Antiserums der ersten H-Phase ausgespatelt. Die Benennung der Spezies bzw. Subspezies sowie des Serovars erfolgte nach dem Kauffmann-White-Schema (Stand 1987). Im Falle fraglicher Ergebnisse wurden die Isolate an das Nationales Referenzzentrum für Salmonellen und andere bakterielle Enteritiserreger am Robert Koch Institut (Bereich Wernigerode) gesandt und dort serotypisiert.

3.2.8 Genotypische Differenzierung der *E. coli*-Isolate

3.2.8.1 Aufbereitung der DNA

Die Reinkulturen wurden für 2-4 Stunden in 2 ml LB-Medium bei 37°C inkubiert (auf MacFarland-Standard 3). Je 500 µl einer Kultur wurde in ein Reaktionsgefäß von 1,5 ml (Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH 0030 120.086) überführt und 10 Minuten bei 3000 g zentrifugiert (Avanti™ 30 Centrifuge, Beckman Ser.Nr. NGE 96B13). Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet dann in 200 µl Lysispuffer (5 x Puffer D (PCR Optimization Kit, Invitrogen, DeShelp, Niederlande 1:5 verdünnt in Aqua dest.; mit: 0,5 % Tween 20; 2 mg/ml Proteinase K (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland). Die Inkubation zum Verdau störender Proteine erfolgte für 1 Stunde bei 56°C im Thermomixer comfort mit Aufsatz für 1,5 ml Gefäße (Eppendorf Nr. 5355 0 2752). Die Proteinase K wurde danach bei 95°C für 10 Minuten inaktiviert. Zu diesem Zeitpunkt wurde die aufbereitete DNA aliquotiert und bei – 70°C gelagert, ein Aliquot wurde auf Eis gestellt und für die Untersuchung auf die Virulenzfaktoren mit PCR eingesetzt.

3.2.8.2 PCR-Ansatz und Cyclyerbedingungen für die PCR

Die in Tabelle 18 aufgeführten Primer wurden in folgendem PCR-Ansatz auf 50 µl eingesetzt: 2,0 µl aufbereitete DNA, 5,0 µl PCR Puffer 1,5 mM (10x), 0,1 µl Taq-Polymerase (PE), 5,0 µl dNTP (10x), 36 µl H₂O. Bei PCR im Cyclyer 1 wurde das Reaktionsgemisch zudem mit Paraffinöl überschichtet. Die Arbeiten zum Ansatz des „Mastermix“ wurden an einer Sterilwerkbank Gelare BSB4 durchgeführt.

Folgende Cyclyerbedingungen wurden für die Primer KS7/KS8, GK5/GK6 sowie eae1/eae2 zur Amplifizierung vorgegeben:

Denaturierung	94°C/10 min	
Denaturierung	94°C/30 Sek	30 <u>Zyklen</u>
Annealing	52°C/60 Sek	
Elongation	72°C/40 Sek	
Elongation	72°C/10 min	

Abweichend von den genannten Bedingungen erfolgte die Amplifizierung mit dem Primerpaar hlyA1/hlyA4 nach einer initialen Denaturierung über 5 Minuten, für Annealing und Elongation waren je 90 Sekunden vorgesehen.

3.2.8.3 Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

Die *E. coli* O157-Isolate wurden mit den Referenzstämmen DSM8579 und E32511 verglichen. Hierzu wurden die DNA-Aufbereitungen mittels RAPD-PCR mit Hilfe eines Fertigtestkits verglichen.

Die Anzucht der Reinkulturen erfolgte nach Beimpfung von Blut-Agar mit einer Impföse in 2 ml LB-Medium. Die Bebrütung erfolgte etwa 2-4 Stunden bei 37°C im Schüttelinkubator bis zu einer O.D. von etwa 1,0. Dies entsprach einer Menge von etwa 10^8 Zellen/ml. Es wurde 1 ng DNA etwa 60.000 Genomäquivalenten gleichgesetzt. Die untersuchte DNA-Menge je Probe entsprach etwa 20 ng. Der weitere Untersuchungsgang erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Es wurden je Probe 25 pmol Single RAPD Primer, etwa 20 ng Proben-DNA mit Aqua dest. auf 25 µl aufgefüllt. Die übrigen Bestandteile (dNTP's, PCR-Puffer) waren in den bereits im Testkit enthaltenen 0,5 ml Reaktionsgefäßen vorgegeben.

Die Amplifizierung erfolgte wie nachfolgend aufgeführt bei niedrig stringenten Bedingungen nach den Angaben des Herstellers:

Denaturierung	95°C/5 min	
Denaturierung	95°C/1min	<u>45 Zyklen</u>
Annealing	36°C/1 min	
Elongation	72°C/2 min	
Elongation	72°C/10 min	

Zur Auswertung der Bandenmuster wurden die Amplifikate unter Sicht mit der Software GelDoc (Fa. BioRAD München) ausgewertet, um Fehler bei der Erfassung zu vermeiden. Bei unterschiedlichem Auftreten von Banden bei den Feldstämmen und den Referenzstämmen in der visuellen Auswertung wurden die Bereiche, in denen keine Banden aufgetreten waren, erneut Computer-gestützt geprüft. Es wurde in der Auswertung lediglich die Anwesenheit/Abwesenheit einer Bande berücksichtigt.

3.2.8.4 Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE)

Zur Differenzierung der Isolate wurde eine Kolonie in 5 ml TSB eingerieben und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am folgenden Tag wurden 2x2 ml der Übernachtskultur für 6 Minuten bei 10.000 rpm und 4°C zentrifugiert und anschließend in je 1,9 ml TE-Puffer aufgenommen. Dieser Schritt wurde zweimal wiederholt, danach erfolgte die Einstellung der Bakteriendichte bei 620 nm im Photometer auf eine Transmission von

5 % $\pm$ 0,2. Als Standard wurden 2 ml TE-Puffer mit einer Transmission von 100 % gesetzt. Die so eingestellte Suspension wurde entweder aliquotiert und bei -20°C eingefroren, oder unmittelbar zur Herstellung der Blöcke verwendet. 120 μl der Bakteriensuspension wurden mit 120 μl InCert Agarose in die Gießform pipettiert und 5 Minuten bei 4°C ausgehärtet.

Zur Lyse der Bakterienzellen wurden je zwei Blöcke in 400 μl Lysispuffer mit 2,3 mg Lysozym (130.000 U/mg, Boehringer Mannheim, 1243004) aufgenommen und über Nacht bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Die Deproteinisierung erfolgte durch Zugabe von 20 μl Proteinase K-Lösung zum Lysisansatz und Inkubation bei 56°C für 24 Stunden. Am folgenden Tag wurde der Lysispuffer abgenommen und jeder Block mit je 200 μl TE-Puffer zweimal für 30 Minuten bei Raumtemperatur gespült. Danach wurden zu jedem Block 200 μl TE-Puffer mit je 2 μl PMSF pipettiert und für 1 Stunde bei 56°C inkubiert. Nach Wiederholung dieses Arbeitsschrittes wurden die Blöcke erneut zweimal in je 200 μl TE-Puffer für je 30 Minuten bei Raumtemperatur gespült. Für den Restriktionsverdau wurden je Block 35 U Restriktionsendonuclease *Xba*I in 200 μl Restriktionspuffer verwendet, und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Für die Elektrophorese wurden 120 ml der Molecular Biology Certified Agarose erhitzt und bei einer Temperatur von 56°C in die Gießform gegeben. Nach Erstarren für 30 Minuten bei Raumtemperatur wurde das Gel für 10 Minuten bei 4°C ausgehärtet. 2 ml der Agarose wurden bei 56°C heiß gehalten und zum Verschließen der Taschen mit den eingesetzten Blöcken verwendet. Die Taschen des fertigen Gels wurden mit den präparierten Isolaten in ihren Blöcken befüllt und mit 2 ml Agarose verschlossen. Die Elektrophorese-Kammer wurde mit 2,5 Litern TBE-Puffer befüllt und auf 14°C eingestellt. Die Elektrophorese fand in zwei Blöcken statt. Im ersten Block wurde bei einer Pumpengeschwindigkeit von 70, 14°C Temperatur, einer Spannung von 6 V pro cm eine „Ramping time“ von 5-20 über 10 Stunden angelegt, in zweiten Block wurde die „Ramping time“ von 20-50 für einen Zeitraum von 16 Stunden eingestellt.

Zur Auswertung wurde das Gel nach der Elektrophorese für 20 Minuten mit Ethidiumbromid gefärbt und anschließend zur Reduktion der Hintergrundfluoreszenz für 30 Minuten gewässert. Nach Aufnahme des ersten Bildes wurde im Bedarfsfall erneut entfärbt und abermals photographiert. Die Auswertung mittels der Software GelCompar 4.0 erfolgte durch Vergleich der Bandenmuster als „presence/absence“, nicht im Vergleich der Intensität der einzelnen Banden.

3.2.9 Statistische Methoden

3.2.9.1 Berechnung des Stichprobenumfanges

Die Berechnung des notwendigen Stichprobenumfanges erfordert einige wesentliche Definitionen im Vorfeld. Zur Definition des Gesamtprobenaufkommens i. S. der Zielpopulation wurden sämtliche in den Jahren 1997 bis 1999 an das ZInstSanBw KIE eingesandten Rohwürste zugrunde gelegt. Die Berechnung des notwendigen Stichprobenumfanges erfolgte mit dem Modul „Population Survey“ der Software Epi Info Version 6.04d, Stand Januar 2001. Die Verteilung des Stichprobenaufkommens auf die Soldaten und Verpflegungsteilnehmer erfolgte anhand der Berechnung der Korrelation von prozentualer Verteilung der Proben auf die einzelnen Standortverwaltungen. Die Berechnung erfolgte mit Hilfe der Statistik-Software SAS, Version 4.1.

Ein Ergebnis mit $p < 0,001$ wurde als hochsignifikant, mit $p < 0,01$ als signifikant, mit $p < 0,05$ als schwach signifikant und mit $p > 0,05$ als nicht signifikant angegeben.

3.2.9.2 Darstellung der Daten

Zur Verteilung der Daten wurden die Stichprobenumfänge (n), Minima, Maxima und Streufaktoren berechnet. Die Darstellung der Ergebnisse der Untersuchungen auf *Enterobacteriaceae* und Hefen erfolgte mit Medianen, Quartilen, sowie kleinsten und größten Beobachtungen in Form von Box-and-Whisker-Plots. Die weiteren Ergebnisse wurden in Form von Säulendiagrammen unter Angabe ihrer absoluten bzw. relativen Häufigkeiten dargestellt.

3.2.9.3 Statistisch vergleichende Prüfung auf Zusammenhänge

Die statistisch vergleichende Prüfung qualitativer Ergebnisse wurde mit Hilfe des Chi-Quadrat-Testes bzw. bei kleinen Erwartungswerten mit Hilfe des exakten Testes nach Fisher bei unabhängigen Stichproben auf signifikante Zusammenhänge geprüft.

Die vergleichende Prüfung qualitativer Daten als Einflußgrößen mit normalverteilten Daten als Zielgröße wurde mit Hilfe des t-Testes für unabhängige Stichproben berechnet.

Bei der vergleichenden Berechnung normalverteilter Daten als Einflußgröße und qualitativer Daten als Zielgröße wurde ein nicht lineares Schwellenwertmodell unter Verwendung der Procedure Genmod des Programmpaketes SAS herangezogen. Die Berechnungen wurden mit Hilfe der Statistik-Software SAS, Version 4.1 vorgenommen, die freundlicherweise durch das Institut für Tierzucht und Tierhaltung der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel zur Verfügung gestellt wurde.

Grundsätzlich wurden folgende Bewertungen vorgenommen: Ein Ergebnis mit $p < 0,001$ wurde als hochsignifikant, mit $p < 0,01$ als signifikant, mit $p < 0,05$ als schwach signifikant und mit $p > 0,05$ als nicht signifikant angegeben.

3.2.9.4 Fragmentmuster nach Restriktionsverdau und Bandenmuster nach Amplifikation und Dendrogramm-Erstellung

Durch den Vergleich der Länge und der Anzahl der Fragmente einzelner Isolate können ebenso genetische Ähnlichkeiten abgeschätzt werden, wie durch den Vergleich unterschiedlicher Bandenmuster nach Amplifikation mit randomisierten Primern.

Die Kalkulation der Ähnlichkeitsmatrix der einzelnen Isolate basiert auf dem von DICE (1945) beschriebenen Ähnlichkeitsmaß. Die anschließende Erstellung der Dendrogramme erfolgte mit dem Verfahren UPGMA („Unweighted Pair Group Methode using Arithmetic Average“). Bei gleicher Gewichtung aller zu prüfenden Stämme wurden hierdurch die arithmetischen Mittelwerte der Ähnlichkeiten der einzelnen Stämme zugrunde gelegt. Die Berechnung des Ähnlichkeitsmaßes sowie die Erstellung der Dendrogramme wurde mit Hilfe der Software GelDoc (Fa. BioRAD München) durchgeführt.

Die vergleichende Berechnung der Fragmentmuster aus der Makrorestriktionsanalyse mit *Xba*I wurde nach Zuordnung der erhaltenen Banden zu einem Bandentyp mit einer zulässigen Toleranz von $\pm 4\%$ mit Hilfe des Jaccard-Koeffizienten S_J bzw. des „simple-matching coefficient“ S_{SM} vorgenommen (GRIMONT, 1999). Die zugrunde liegenden Formeln sind im folgenden aufgeführt.

Der Jaccard-Koeffizient S_J errechnet sich durch Einbeziehung der für jeweils zwei zu vergleichenden Stämme sichtbaren Fragmente:

$$S_J = \frac{S_1}{(S_1 + D_1 + D_0)}$$

bei: S_1 : Fragment tritt bei beiden Stämmen auf
 S_0 : Fragment tritt bei keinem der beiden Stämme auf
 D_1 : Fragment tritt bei erstem Stamm auf, jedoch nicht bei dem zweiten
 D_0 : Fragment tritt bei zweitem Stamm auf, jedoch nicht bei dem ersten

Der „simple-matching coefficient“ S_{SM} bezieht sich auf alle aufgetretenen Fragmente, die bei den untersuchten Stämmen aufgetreten sind. Hierbei wurde jedes aufgetretene Fragment einem Fragmenttyp zugeordnet. Es wurde das Auftreten bzw. nicht Auftreten eines Fragmentes nach der folgenden Formel zur Berechnung der Ähnlichkeit zweier Stämme gewertet:

$$S_{SM} = \frac{(S_1 + S_0)}{(S_1 + S_0 + D_1 + D_0)}$$

bei: S_1 : Fragment tritt bei beiden Stämmen auf
 S_0 : Fragment tritt bei keinem der beiden Stämme auf
 D_1 : Fragment tritt bei erstem Stamm auf, jedoch nicht bei dem zweiten
 D_0 : Fragment tritt bei zweitem Stamm auf, jedoch nicht bei dem ersten

Des weiteren wurden die PFGE erhaltenen Bandenmuster nach in der von TENOVER et al. (1995) beschriebenen Vorgehensweise verglichen. Sie bewerteten Stämme ohne Unterschiede in den Bandenmustern als „nicht differenzierbar“, bei zwei bis drei unterschiedlichen Banden als „nahe verwandt“. Bei vier bis sechs nicht bei beiden Stämmen auftretenden Fragmenten werteten sie diese als „wahrscheinlich verwandt“ und bei sieben oder mehr unterschiedlichen Banden als „sicher differenziert“.

3.3 Ergebnisse

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der Untersuchung von Feldproben, gezogen aus Verpflegungseinrichtungen der Bundeswehr, dargestellt. Es wurden sowohl sensorische als auch mikrobiologisch-hygienische Untersuchungen auf Kontamination mit *Enterobacteriaceae* und Hefen durchgeführt. Bei der Untersuchung auf Lebensmittelinfektionserreger wurde ein Teil der Proben auf *Salmonella* spp. und alle Proben auf das Vorkommen Verotoxin-bildender *E. coli* (VTEC) untersucht. Ebenso wird die epidemiologische Situation im untersuchten Gebiet vor dem Hintergrund möglicher lebensmittelhygienischer Risiken insbesondere durch *Salmonella* spp. und VTEC zusammenfassend dargestellt.

3.3.1 Charakterisierung der Risikopopulation und lebensmittelbedingte Gruppenerkrankungen im Untersuchungszeitraum

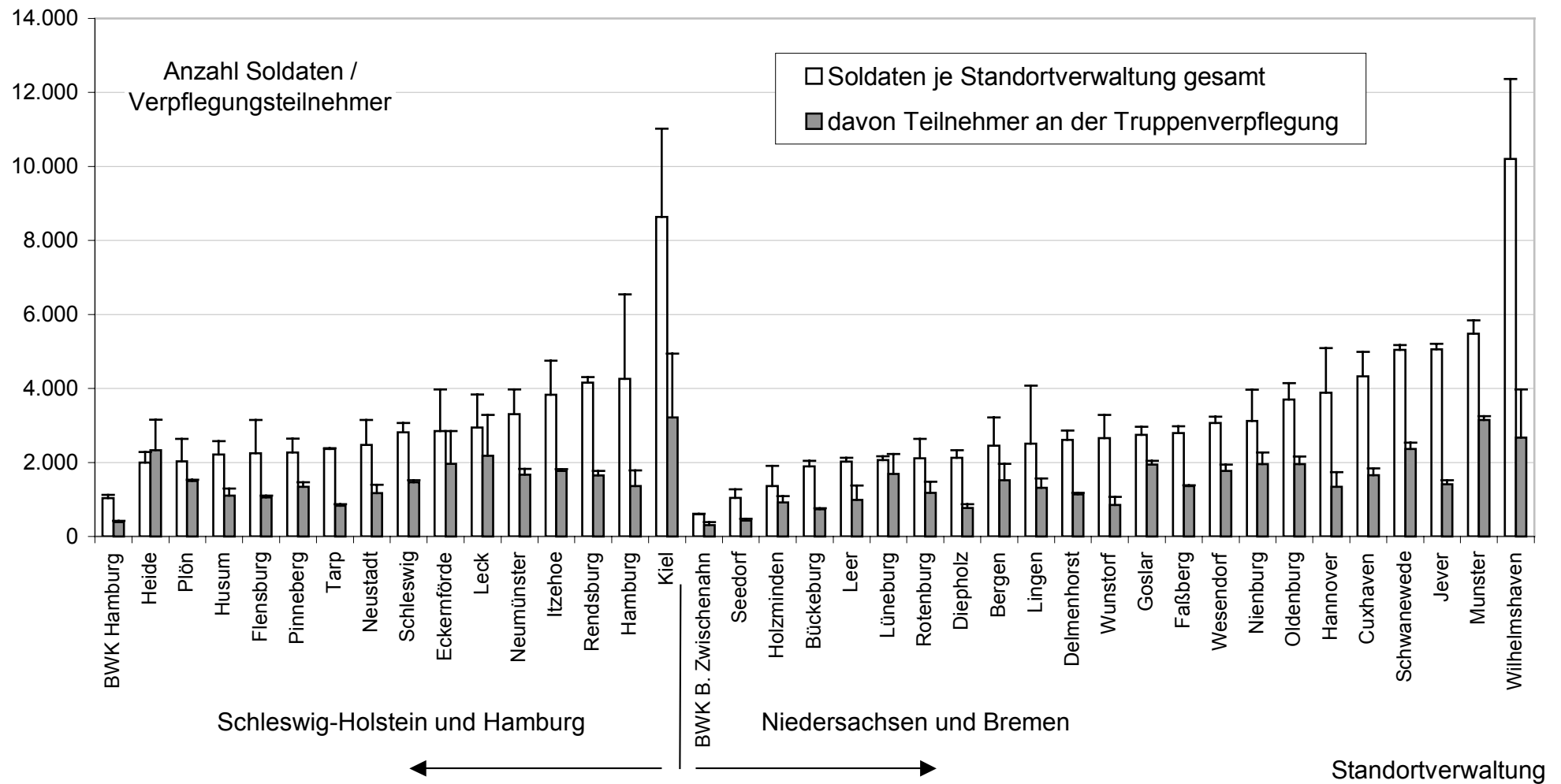
Das Einzugsgebiet für die zu untersuchenden Proben bestand aus den Bundesländern Schleswig-Holstein und Niedersachsen einschließlich der Stadtstaaten Hamburg und Bremen. Durch die Bundeswehr-interne Struktur der Wehrbereiche werden im folgenden Schleswig-Holstein und Hamburg (SH/HH) sowie Niedersachsen und Bremen (NI/HB) jeweils gemeinsam betrachtet.

Im Bereich SH/HH waren in den Jahren 1997 bis 1999 im Mittel 49.788 Soldaten stationiert. Diese wurden durch 15 Standortverwaltungen und eine Krankenhausverwaltung verpflegt. Damit lag die mittlere Stärke der Soldaten je Standortverwaltung in diesem Bereich bei 3.112 Soldaten. Der Anteil der Soldaten, die an der Truppenverpflegung teilnahmen, belief sich im Mittel auf 53 %, was 1.561 Soldaten in der Truppenverpflegung je Standortverwaltung entsprach.

Im Bereich NI/HB waren im Berichtszeitraum im Mittel 72.935 Soldaten stationiert, wobei sich der Anteil derer, die an der Truppenverpflegung teilnahmen, auf 49 % (24.973) belief. Dieser Bereich wurde durch 22 Standortverwaltungen und eine Krankenhausverwaltung verpflegt. Dies entspricht einer Soldatenstärke von 3.171 pro Standortverwaltung, bei jeweils 1.455 Verpflegungsteilnehmern.

Eine zusammenfassende Darstellung der Soldaten- und Verpflegungsteilnehmerzahlen ist Abbildung 1 zu entnehmen, wobei die Standardabweichung aus den drei Jahren Untersuchungszeitraum als positiver Fehlerindex berücksichtigt wurden.

Abbildung 1 Verteilung der Soldaten sowie der Teilnehmer an der Truppenverpflegung je Standortverwaltung einschließlich der Standardabweichung nach Bildung des Mittelwertes über die Jahre 1997 bis 1999



Bei Zugrundelegung der Zahlen der Truppenküchen aus den Bereichen SH/HH mit 52 und NI/HB mit 71 Truppenküchen mit Stand vom August 2000 wurden im Mittel 475 Soldaten aus einer Truppenküche verpflegt. Die Zahlen schwankten je nach Größe der Standorte und Einheiten im Bereich SH/HH zwischen 199 und 877 je Truppenküche, im Bereich NI/HB zwischen 199 und 1.041 Verpflegungsteilnehmern.

Im Untersuchungszeitraum traten insgesamt 39 Gruppenerkrankungen auf, bei denen aufgrund der Symptomatik der Erkrankten die gemeinsame Aufnahme von Verpflegung, die Ursache hätte sein können (s. Tabelle 20). Bei 15 dieser Gruppenerkrankungen (38,5%) trat bei einem Teil der Erkrankten Fieber auf. Insgesamt konnten bei etwa 33 % der Gruppenerkrankungen Lebensmittel als wahrscheinliche Ursache nachgewiesen werden. In zwei Fällen (5,1 %) handelte es sich um Infektionen mit *Salmonella* spp., die ihre nachgewiesene Ursache im Verzehr kontaminierter Lebensmittel hatten. Infektionen mit VTEC/EHEC wurden nicht im Rahmen von Gruppenerkrankungen nachgewiesen. Nachweise von VTEC/EHEC waren bei den im Berichtszeitraum in der Routine eingesandten Stuhlproben nur vereinzelt möglich (MÜLLER pers. Mitt., 2001).

Tabelle 20 Anzahl und Aufklärungsrate lebensmittelbedingter Gruppenerkrankungen im beprobten Gebiet im Zeitraum von 1997 bis 1999

Jahr	Anzahl	davon aufgeklärt (Prozent)	Auftreten von Fieber	Nachweis <i>Salmonella</i>	Nachweis VTEC/EHEC
1997	15	4 (27,0%)	5 (33,3%)	0	0
1998	10	4 (40,0%)	5 (50%)	1 (10%)	0
1999	14	5 (36,0%)	5 (36%)	1 (7,4%)	0
gesamt	39	13 (33,3%)	15 (38,5%)	2 (5,1%)	0

3.3.2 Probenaufkommen

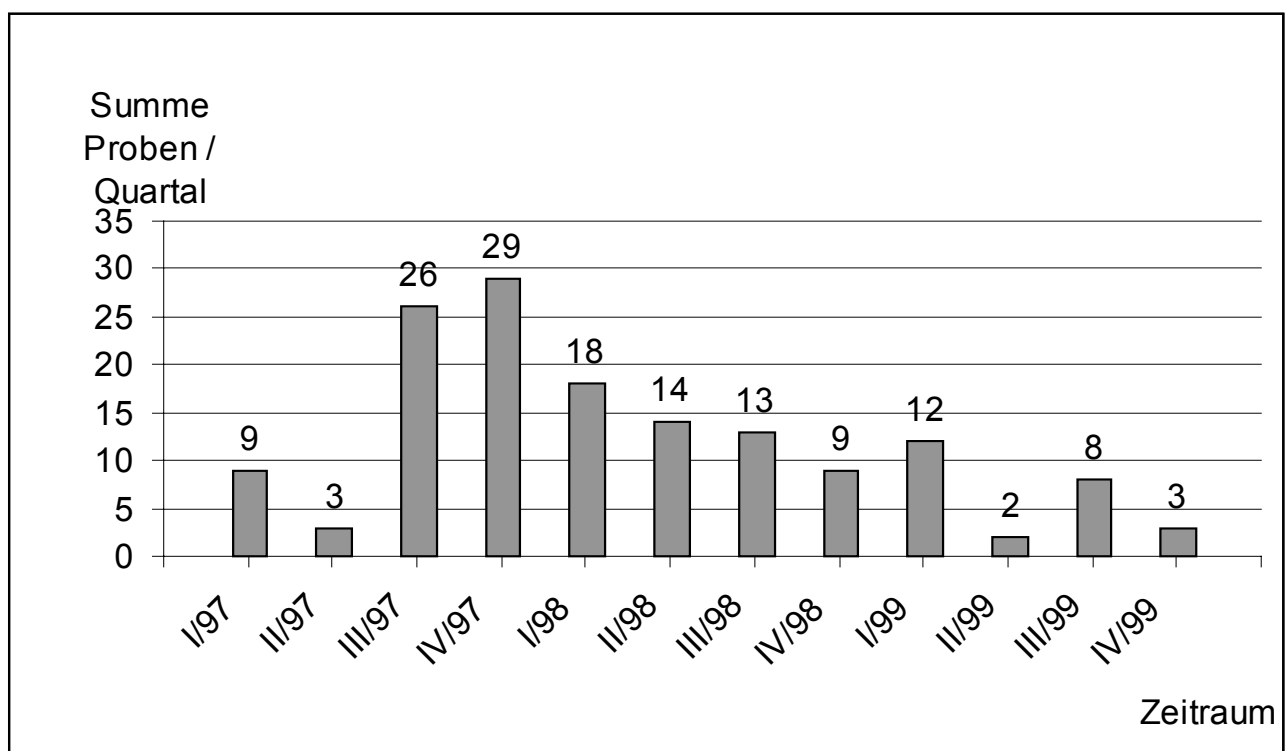
Es wurden über einen Zeitraum von drei Jahren 146 schnittfeste und streichfähige Rohwürste aus Verpflegungseinrichtungen der Bundeswehr in Schleswig-Holstein/Hamburg und Niedersachsen/Bremen untersucht, um ein mögliches Infektionsrisiko für die Verpflegungsteilnehmer der Bundeswehr mit verotoxinogenen *E. coli* abschätzen zu können.

Des weiteren wurden 78 streichfähige und schnittfeste Rohwürste aus Schleswig-Holstein von der Landwirtschaftlichen Untersuchungs- und Forschungsanstalt – Institut für Tiergesundheit und Lebensmittelqualität (LUFA-ITL) Kiel bezogen, die nicht bei jeder der folgenden Auswertungen einbezogen werden konnten, da sich die Kenntnisse über die Herkunft lediglich auf die Betriebsgröße der Lieferbetriebe beschränkten. Diese Betriebe wurden im folgenden als potentielle Lieferbetriebe eingestuft.

3.3.2.1 Stichprobenumfang

Der Zeitraum der untersuchten Proben erstreckte sich von Januar 1997 bis Dezember 1999. In Abbildung 2 sind die Probenzahlen in den Einsendequartalen aufgeführt. Hier wird deutlich, daß in jedem Quartal des Berichtszeitraumes Proben untersucht wurden. Die Untersuchung der Proben fand zeitlich versetzt maximal einen Monat später statt. Die Proben wurden über diesen Zeitraum bei -20°C gelagert und dann zur Untersuchung über Nacht bei 4 bis 6°C aufgetaut.

Abbildung 2 Verteilung streichfähiger und schnittfester Rohwürste auf den Untersuchungszeitraum nach Quartalen



Der prozentuale Anteil des eingesandten Probenaufkommens für streichfähige Rohwürste lag bei 22,9 %. Bei den untersuchten Proben machten die streichfähigen Rohwürste einen Anteil von 32,9 % aus. Von den Rohwürsten wurden 17,3 % der schnittfesten und 28,4 % der streichfähigen auf VTEC/EHEC untersucht. Die Zahlen sind detailliert in Tabelle 21 aufgeführt.

Tabelle 21 Durch Standortverwaltungen der Bundeswehr eingesandte streichfähige und schnittfeste Rohwürste im Zeitraum von 1997 bis 1999 und der davon auf Verotoxin-bildende *E. coli* (VTEC) untersuchter Anteil

	Anzahl eingesandt	davon auf VTEC untersucht	untersuchter Anteil der eingesandten Proben
schnittfeste Rohwürste	568 (77,1%)	98 (67,1%)	17,3 %
streichfähige Rohwürste	169 (22,9%)	48 (32,9%)	28,4 %
gesamt	737 (100%)	146 (100%)	19,8 %

Bei Zugrundelegung der Zahl der in den Jahren 1997 bis 1999 insgesamt eingesandten Rohwürste ergeben sich für den zu untersuchenden Stichprobenumfang die in Tabelle 22 aufgeführten Probenzahlen. Es wurden die von GALLIEN et al. (1999a) ermittelten 8,8 % als erwartete Kontaminationsrate angesetzt, da dies die für Rohwürste aus Deutschland derzeit höchste nachgewiesene Kontaminationsrate darstellt. Als das schlechteste akzeptierbare Ergebnis wurde von einer niedrigeren Kontaminationsrate ausgegangen und eine Kontaminationsrate von Null Prozent angenommen. Aufgrund der untersuchten Probenzahlen konnte bei Berücksichtigung aller Rohwürste von einer Richtigkeit der Aussage bei negativem Nachweis von mehr als 99,99 % ausgegangen werden. Bei Berücksichtigung der schnittfesten Rohwürste lag das Konfidenzintervall bei negativem Nachweis > 99,9 % bei den streichfähigen Rohwürsten bei mehr als 95 %.

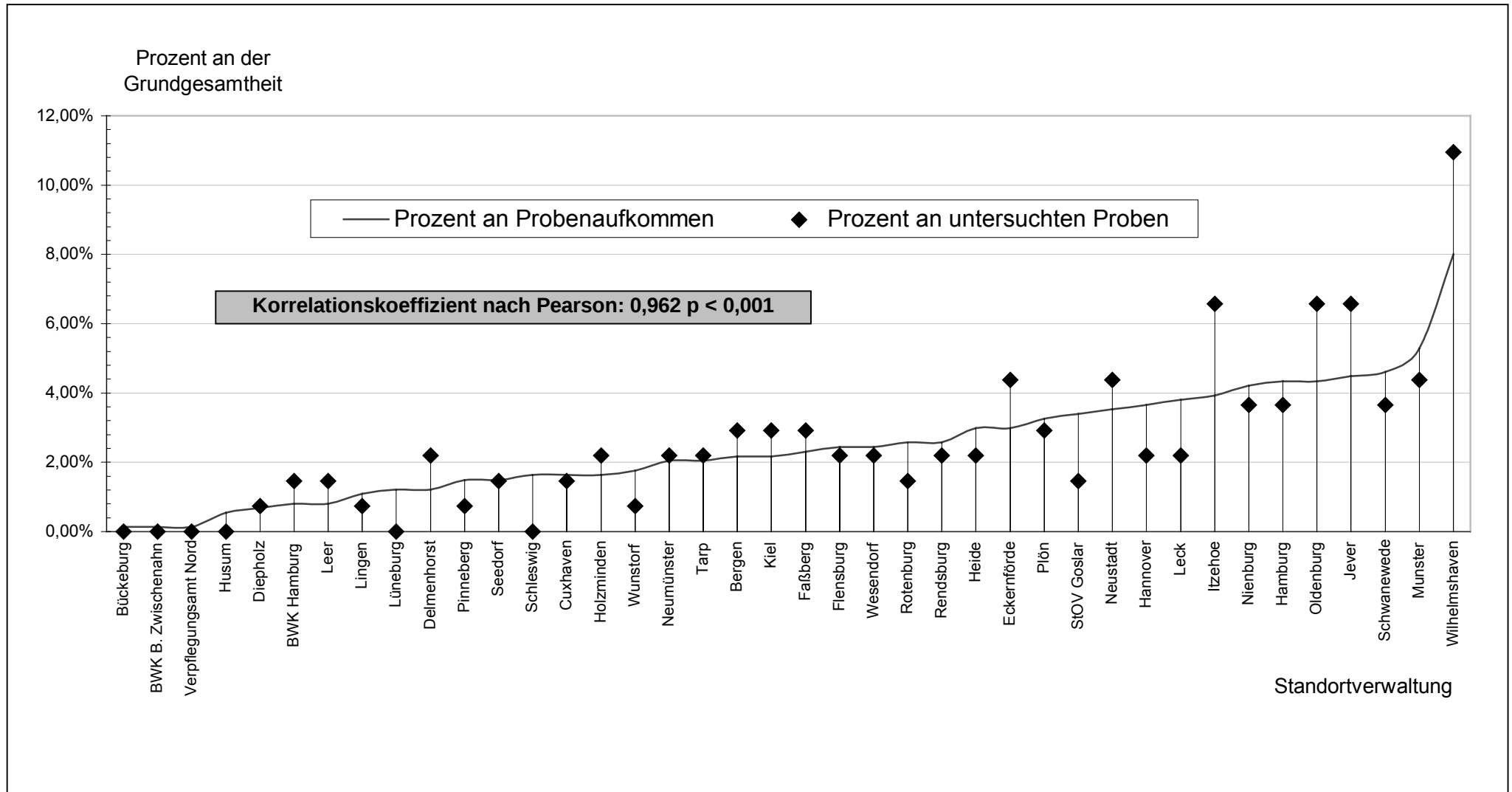
Tabelle 22 Konfidenzintervalle zu den untersuchten streichfähigen und schnittfesten Rohwürsten aus Truppenküchen der Bundeswehr bezogen auf die Gesamtmenge eingesandter Rohwürste aus den Jahren 1997 bis 1999

	Alle Rohwürste	Schnittfeste Rohwürste	Streichfähige Rohwürste
Anzahl aller Proben	738	568	169
Erwartete Nachweisrate ¹	8,8 %	8,8 %	8,8 %
Schlechtestes akzeptierbares Ergebnis	0 %	0 %	0 %
Probenanzahl untersucht	146	98	48
Konfidenzintervall	> 99,99 %	> 99,9 %	> 95 %

¹ nach GALLIEN et al., 1999a

Des weiteren wurde das untersuchte Probenaufkommen dem eingesandten Probenaufkommen, bezogen auf die einsendende Standortverwaltung, gegenübergestellt. Hierzu wurden die prozentualen Anteile von der gesamten Probenmenge je Standortverwaltung den prozentualen Anteilen der untersuchten Probenmenge je Standortverwaltung gegenübergestellt. Mit einem Korrelationskoeffizient von 0,962 ($p < 0,001$) war eine hohe Korrelation zwischen dem eingesandten und dem untersuchten Probenaufkommen gegeben. Auch bei Vergleich der absoluten Verteilung des eingesandten und des untersuchten Probenaufkommens auf die Standortverwaltungen war mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,789 ($p < 0,001$) eine mittlere Korrelation mit hoher Signifikanz gegeben. Die Verteilung des untersuchten Probenaufkommens innerhalb des untersuchten Gebietes ist somit der Verteilung des eingesandten Probenaufkommens gut vergleichbar. Die graphische Darstellung enthält Abbildung 3.

Abbildung 3 Prozentualer Anteil eingesandter Proben im Vergleich zum prozentualen Anteil untersuchter Proben bezogen auf die einsendenden Standortverwaltungen im Zeitraum von 1997 bis 1999 für SH/HH und NI/HB



3.3.2.2 Struktur der Lieferbetriebe und Verteilung der Proben auf die Lieferbetriebe

Die 56 beprobten Lieferbetriebe untergliederten sich in 18 Großbetriebe und 36 mittelständische Betriebe. Von den Betrieben hatten 14 die EU-Zulassung. Bei neun Großbetrieben/Industriebetrieben war die Zertifizierung nach ISO 9001 angegeben. Eine Übersicht zur Gruppierung der Lieferbetriebe ist in Tabelle 23 dargestellt. Die Großbetriebe/Industriebetriebe wiesen bis auf eine Ausnahme alle die EU-Zulassung als Fleischverarbeitungsbetrieb auf, die mittelständischen Betriebe zu 36 %.

Tabelle 23 Gruppierung der Lieferbetriebe nach Bundesland und EU-Zulassung

Bundesland	G* (davon EU-Zulassung)	M [#] (davon EU-Zulassung)	Summe (davon EU-Zulassung)
NI/HB ¹	12 (11)	15 (4)	27 (15)
SH/HH ²	5 (5)	19 (7)	24 (12)
NRW ³	1 (1)	2 (2)	3 (3)

¹ Niedersachsen/Bremen ² Schleswig-Holstein/Hamburg ³ Nordrhein-Westfalen

* G: Großbetriebe/Industriebetriebe

[#] M: mittelständische Betriebe

Je Lieferbetrieb wurden etwa zweieinhalb Rohwürste untersucht. Bei den streichfähigen Rohwürsten ergab sich eine geringere Frequenz der Beprobung, da nicht jeder Betrieb streichfähige Rohwürste an die Verpflegungseinrichtungen der Bundeswehr liefert und somit dieses Probenaufkommen geringer ausgefallen ist, als das der schnittfesten Rohwürste.

Es entfielen auf die Großbetriebe/Industriebetriebe 110 Proben (18 streichfähige und 92 schnittfeste Rohwürste) und auf die mittelständischen Betriebe 107 Proben (38 streichfähige und 69 schnittfeste Rohwürste). Sieben Proben konnten keinem Betrieb zugeordnet werden. Tabelle 24 zeigt die Verteilung der eingesandten Proben nach Bundesland, Betriebsgröße und deren EU-Zulassung.

Der überwiegende Teil der Proben (64,0 %) kam aus Betrieben Schleswig-Holsteins und Hamburgs, wobei 80 Proben (36,8 % der gesamten Probenmenge) auf Großbetriebe und 59 Proben (27,2 % der gesamten Probenmenge) auf mittelständische Betriebe entfielen. Von den Proben kamen 34,1 % aus Lieferbetrieben Niedersachsens/Bremens. Hiervon entfielen 28 Proben (12,9 % der gesamten

Probenmenge) auf Großbetriebe und 46 Proben (21,2 % der gesamten Probenmenge) auf mittelständische Betriebe. Die Verteilung der Proben auf Großbetriebe und mittelständische Betriebe war mit je etwa 50 % gleich. Proben von Betrieben aus Nordrhein-Westfalen machten 1,8 % der Gesamtprobenmenge aus.

Tabelle 24 Verteilung auf VTEC/EHEC untersuchter Rohwürste (n=217) auf die Bundesländer gegliedert nach Betriebsgröße der Lieferbetriebe und deren EU-Zulassung

Anzahl der Proben (n) (%)		Betriebsgröße		Summe
Bundesland	EU-Zulassung	G *	M #	
NI/HB ¹	ja	26	11	37
	nein	2	35	37
NI/HB ¹ Ergebnis		28 (12,9)	46 (21,2)	74 (34,1)
SH/HH ²	ja	80	36	116
	nein	0	23	23
SH/HH ² Ergebnis		80 (36,8)	59 (27,2)	139 (64,0)
NRW ³	ja	2	2	4
NRW ³ Ergebnis		2 (0,9)	2 (0,9)	4 (1,8)
Summe		110 (50,6)	107 (49,3)	217 (100,0)

¹ Niedersachsen/Bremen ² Schleswig-Holstein/Hamburg ³ Nordrhein-Westfalen

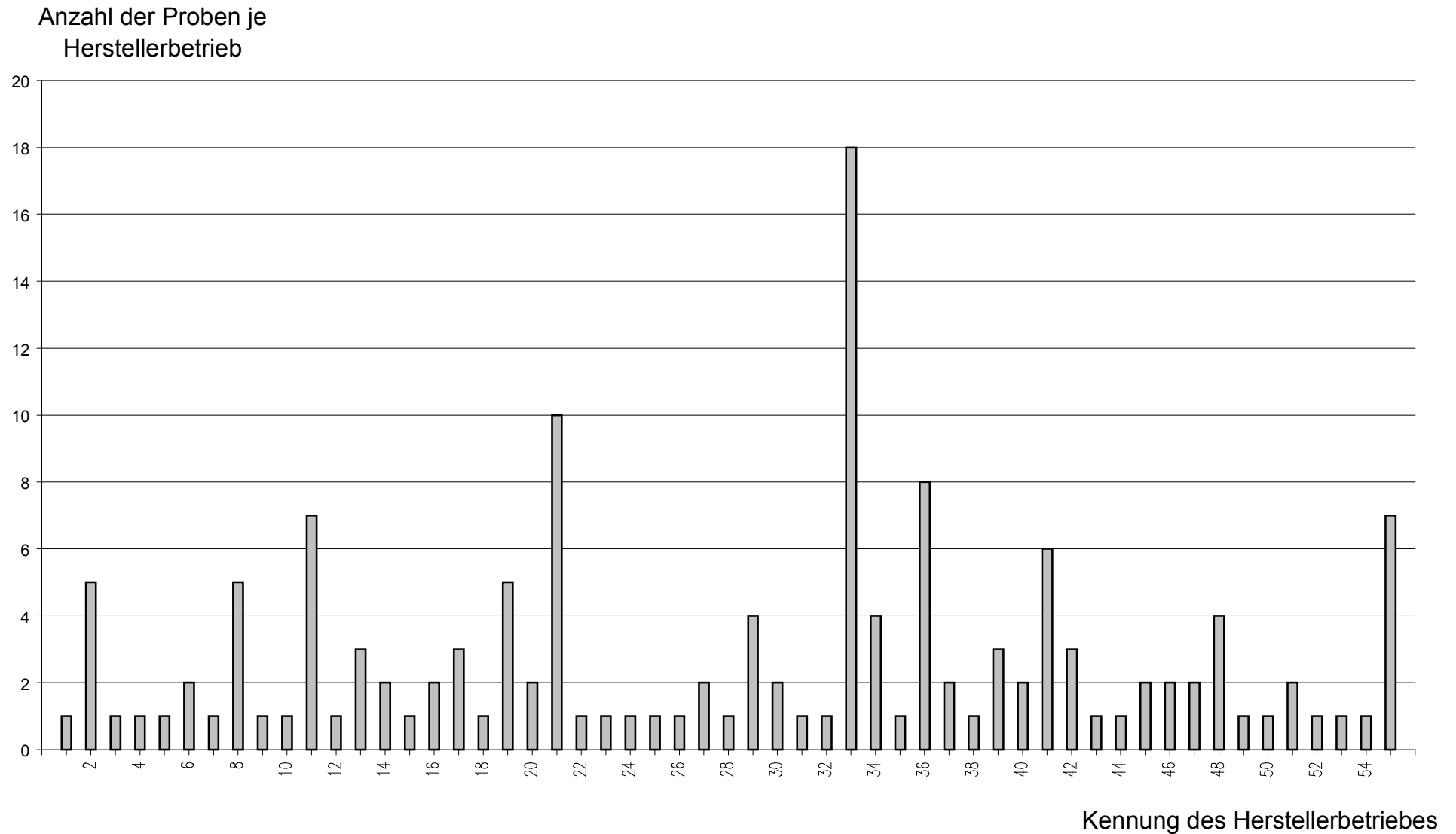
* G: Großbetriebe/Industriebetriebe

M: mittelständische Betriebe

Bei Verteilung der untersuchten Proben bezogen auf die Betriebsgröße mit/ohne EU-Zulassung je Bundesland ergab sich lediglich für Schleswig-Holstein ein deutlicher Überhang an untersuchten Proben aus Betrieben mit EU-Zulassung, in den anderen Bundesländern betrug der Anteil an Proben aus Betrieben mit bzw. ohne EU-Zulassung je 50 %.

Die Anzahl der je Lieferbetrieb untersuchten Proben ist graphisch in Abbildung 4 dargestellt, wobei die einzelnen Lieferbetriebe durch eine numerische Kennung anonymisiert wurden. Im Mittel wurden 2,53 Rohwürste pro Betrieb untersucht, wobei je nach gelieferter Menge Schwankungen zwischen einer Probe je Betrieb bis hin zu 18 Proben je Betrieb auftraten.

Abbildung 4 Verteilung der auf VTEC/EHEC untersuchten Rohwürste (n=146) auf die einzelnen Lieferbetriebe (anonymisiert durch Kennung)



Aus Betrieben mit EU-Zulassung stammten 75,2 % der schnittfesten Rohwürste, wobei die aus Großbetrieben/Industriebetrieben gelieferten Erzeugnisse 55,9 % der schnittfesten Rohwürste ausmachten. Die untersuchten streichfähigen Rohwürste kamen zu 64,3 % aus Betrieben mit EU-Zulassung, wobei diese Proben zu gleichen Teilen aus mittelständischen Betrieben und Großbetrieben/Industriebetrieben stammten. Die Daten sind in Tabelle 25 aufgeführt.

Tabelle 25 Verteilung auf VTEC/EHEC untersuchter streichfähiger und schnittfester Rohwürste (n=224) auf die Lieferbetriebe gegliedert nach deren Betriebsgröße und EU-Zulassung

EU-Zulassung	Konsistenz	Betriebsgröße		Gesamt
		G *	M #	
Ja	Schnittfest	90 (55,9%)	31 (19,3%)	121 (75,2%)
	Streichfähig	18 (32,2%)	18 (32,2%)	36 (64,3%)
Nein	Schnittfest	2 (1,2%)	38 (23,6%)	40 (24,8%)
	Streichfähig	0	20 (35,7%)	20 (35,7%)
Gesamt: Summe – schnittfest		92 (57,2%)	69 (42,8%)	161 (100%)
Gesamt: Summe – streichfähig		18 (32,1%)	38 (67,9%)	56 (100%)

* G: Großbetriebe/Industriebetriebe

M: mittelständische Betriebe

3.3.2.3 Verteilung der Proben auf die Population

Insgesamt wurden Proben von 87,2 % der Standortverwaltungen untersucht. Damit wurden durch die Stichproben streichfähige und schnittfeste Rohwürste für 92,2 % der Soldaten in SH/HH und NI/HB untersucht. Bezogen auf die Anzahl der Verpflegungsteilnehmer wurden Rohwürste für 90,9 % der Verpflegungsteilnehmer untersucht. Die einzelnen Zahlen sind in Tabelle 26 aufgeführt.

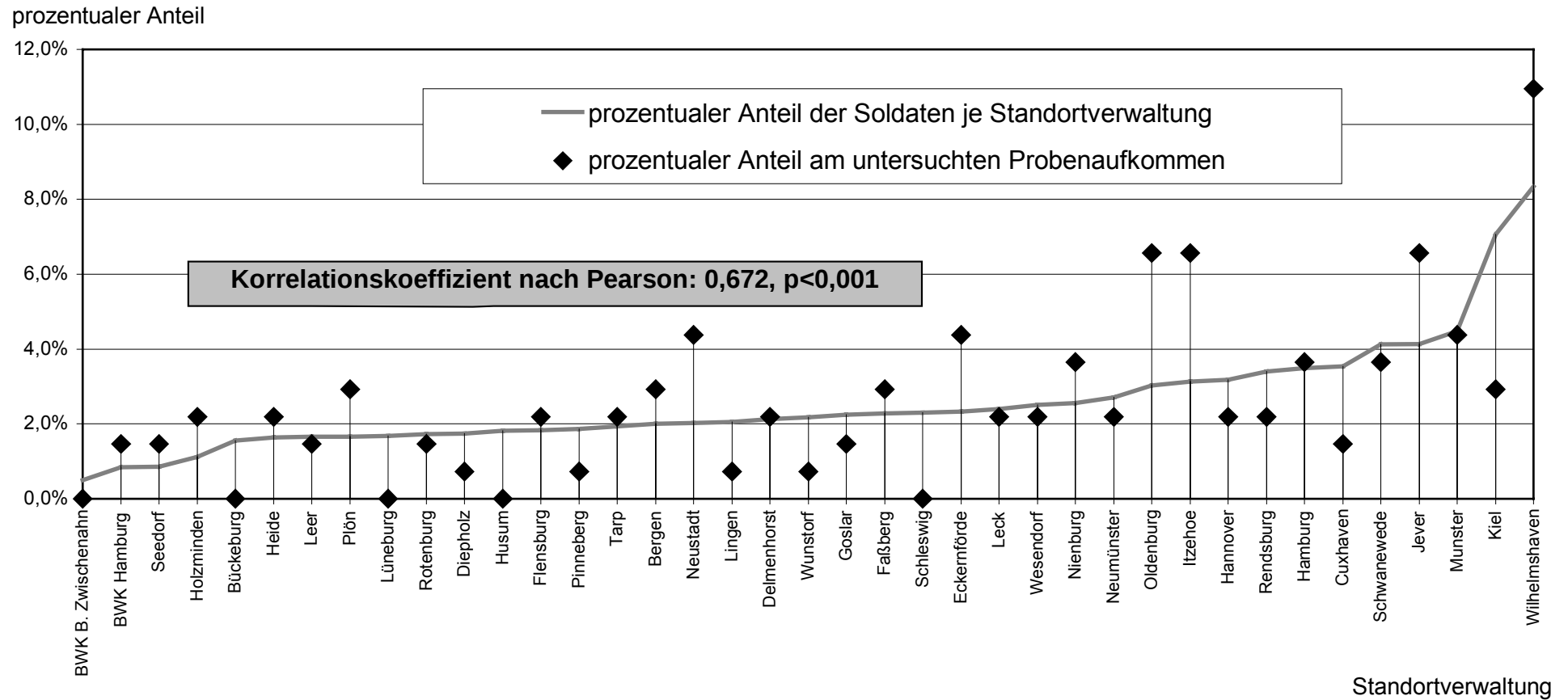
Tabelle 26 Anteil der beprobten Standortverwaltungen in NI/HB1 und SH/HH2 und sich daraus ergebender Anteil der Soldaten bzw. Verpflegungsteilnehmer, für die streichfähige und schnittfeste Rohwürste auf VTEC/EHEC untersucht wurden

	Anzahl	Prozent
Anzahl der Standortverwaltungen	39	100 %
davon beprobt	34	87,2 %
Anzahl der Soldaten gesamt pro Jahr (Mittelwert aus 1997 bis 1999)	122.390	100 %
Anzahl der Soldaten deren Standortverwaltung beprobt wurde:	112.784	92,2 %
Anzahl der Verpflegungsteilnehmer gesamt pro Jahr (Mittelwert aus 1997 bis 1999)	58.428	100 %
Anzahl der Verpflegungsteilnehmer deren Standortverwaltung beprobt wurde:	53.118	90,9 %

¹ Niedersachsen/Bremen ² Schleswig-Holstein/Hamburg

Die prozentualen Anteile der eingesandten Rohwürste je Standortverwaltung wurden der prozentualen Verteilung der Soldaten je Standortverwaltung gegenüber gestellt. Hierbei ergab sich mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,672 ($p < 0,001$) eine mittlere Korrelation mit hoher Signifikanz zwischen Verteilung der untersuchten Proben und Verteilung der Soldaten auf die Standortverwaltungen. Bezogen auf die prozentuale Verteilung der Verpflegungsteilnehmer ergab sich im Vergleich zur prozentualen Verteilung der Proben eine Korrelation von 0,358 ($p < 0,05$). Die prozentualen Anteile von Probenaufkommen und Soldaten je Standortverwaltung sind in Abbildung 5 graphisch dargestellt.

Abbildung 5 Prozentualer Anteil der Soldaten auf die Standortverwaltungen im untersuchten Gebiet im Vergleich zur prozentualen Verteilung der eingesandten Probenmenge je einsendende Standortverwaltung



3.3.3 Erhebung des sensorischen und mikrobiologischen Status

3.3.3.1 Sensorische Untersuchung und Bestimmung des pH-Wertes

Insgesamt kamen 165 schnittfeste und 59 streichfähige Rohwürste zur Untersuchung, von denen bei 162 schnittfesten und bei 57 streichfähigen Rohwürsten eine sensorische Untersuchung durchgeführt wurde.

Im Rahmen der sensorischen Untersuchung für den Bereich „Äußeres, Zustand des Behältnisses“ erfüllten 69 % der schnittfesten Rohwürste die Qualitätserwartung voll, und 22 % mit geringfügigen Abweichungen, bei den streichfähigen Rohwürsten waren 91 % der Proben ohne Abweichungen und weitere 7 % mit geringfügigen Abweichungen. In der Summe hatten also 91 % der schnittfesten und 98 % der streichfähigen Rohwürste höchstens geringfügige Abweichungen. Im Bereich „Aussehen, Farbe, Farbhaltung, Zusammensetzung“ waren 94 % der schnittfesten und 100 % der streichfähigen Rohwürste ohne Beanstandung. Bei der Beurteilung der Konsistenz erfüllten 72 % der schnittfesten Rohwürste die Qualitätserwartung und 20 % wiesen geringfügige Abweichungen auf (das entspricht zu 92 % höchstens geringfügigen Abweichungen) Die streichfähigen Rohwürsten wiesen zu 98 % keine Abweichungen auf.

Im Bereich des Geruchs und Geschmacks blieben bei den schnittfesten Rohwürsten 60 % ohne Abweichungen, 23 % hatten geringfügige Abweichungen, insgesamt wurden also 83 % der schnittfesten Rohwürste mit höchstens geringfügigen Abweichungen bewertet. Bei den streichfähigen Rohwürsten wurden 65 % hinsichtlich ihres Geruchs und Geschmacks nicht beanstandet und 21 % hatten geringfügige Abweichungen.

Zusammengefaßt nach der Gewichtung der Einzelbewertungen gemäß dem „Prüfschema für Rohwurst“ der Deutschen Landwirtschafts-Gesellschaft (DLG) wiesen 15,4 % der schnittfesten und 7,2 % der streichfähigen Rohwürste merkliche oder deutlichere Abweichungen auf.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 27 dargestellt.

Tabelle 27 Sensorische Bewertung eingesandter streichfähiger und schnittfester Rohwürste nach der 5-Punkte-Skala des „Prüfschema für Rohwurst“ der Deutschen Landwirtschafts-Gesellschaft (DLG)

Konsistenz	Bewertung	Anzahl Proben	Prozent
schnittfest (n=162)	deutlicher Fehler	8	4,9 %
	merkliche Abweichungen	17	10,5 %
	geringfügige Abweichungen	75	46,3 %
	volle Erfüllung der Qualitätserwartung	62	38,3 %
streichfähig (n=57)	deutlicher Fehler	1	1,8 %
	merkliche Abweichungen	3	5,3 %
	geringfügige Abweichungen	18	31,6 %
	volle Erfüllung der Qualitätserwartung	35	61,4 %

Bei Einbeziehung der sensorischen Merkmale „Äußeres, Zustand des Behältnisses“ und „Aussehen, Farbe, Farbhaltung, Zusammensetzung“ hatten sowohl die schnittfesten wie auch die streichfähigen Rohwürste zu über 98 % im Mittel höchstens geringfügige Abweichungen. Dieser Anteil bleibt auch unter zusätzlicher Einbeziehung des Beurteilungsmerkmals „Konsistenz“ erhalten.

Die Zusammenstellung der am häufigsten aufgetretenen sensorischen Mängel zeigt, daß der überwiegende Teil der Abweichungen, die zu deutlichen qualitativen Mängeln geführt haben, im Bereich „Geruch und Geschmack“ aufgetreten sind. Bei den schnittfesten Rohwürsten blieben 63 Proben (38,9 %) ohne abweichende Befunde, bei den streichfähigen Rohwürsten 31 Proben (55,4 %). Besonders häufig waren bei den schnittfesten Rohwürsten die Mängel im Aussehen im Anschnitt, der Farbe, zu weicher Konsistenz, sowie im Bereich Geruch und Geschmack die Befunde „säuerlich“, „zu frisch, unreif“ und „Fleischaroma zu gering“. Bei den streichfähigen Rohwürsten fielen besonders zu starke Würzung, zu geringes Fleischaroma und säuerlicher Geruch und Geschmack auf. Es traten vermehrt Mängel auf, die auf eine sehr kurze bzw. zu kurze Reifung hindeuten.

Eine Auflistung der aufgetretenen sensorischen Mängel ist in den Tabellen 28 und 29 aufgestellt. Es wurden lediglich die mehr als einmal aufgetretenen Mängel aufgeführt.

Tabelle 28 Festgestellte Abweichungen bei der sensorischen Untersuchung schnittfester und streichfähiger Rohwürste

Konsistenz Gruppe	Bereich ¹	Anzahl Proben	Prozent	Wesentliche Beanstandungsgründe
schnittfest (n=162)	Summe nicht beanstandet	63	38,9%	
	Äußere Herrichtung	8	4,9 %	Hülle nicht abziehbar
	Aussehen im Anschnitt	40	24,7 %	Trockenrandbildung, Schnittbild unklar, porig
	Farbe	20	12,3 %	Speck rötlich
	Farbhaltung	3	1,9 %	
	Konsistenz	40	24,7 %	zu weich
		9	5,6 %	Bindung mangelhaft
	Geruch und Geschmack	34	21,0 %	Säuerlich
		17	10,5 %	zu frisch, unreif
		14	8,6 %	Fleischaroma zu gering
		9	5,6 %	Rauch zu stark
		7	4,3 %	Kratzend
		7	4,3 %	Fettig
		4	2,5 %	Salzig
		4	2,5 %	Würzung zu stark
		3	1,9 %	Muffig
	Summe beanstandet	99	61,1 %	
streichfähig (n=57)	Summe nicht beanstandet	31	54,4 %	
	Zusammensetzung	2	3,6 %	unzerkaubare Anteile
	Geruch und Geschmack	5	8,9 %	Würzung zu stark
		4	7,1 %	Fleischaroma zu gering
		4	7,1 %	säuerlich
		3	5,4 %	Zwiebelaroma zu gering
		2	3,6 %	zu frisch, unreif
	Summe beanstandet	26	45,6 %	

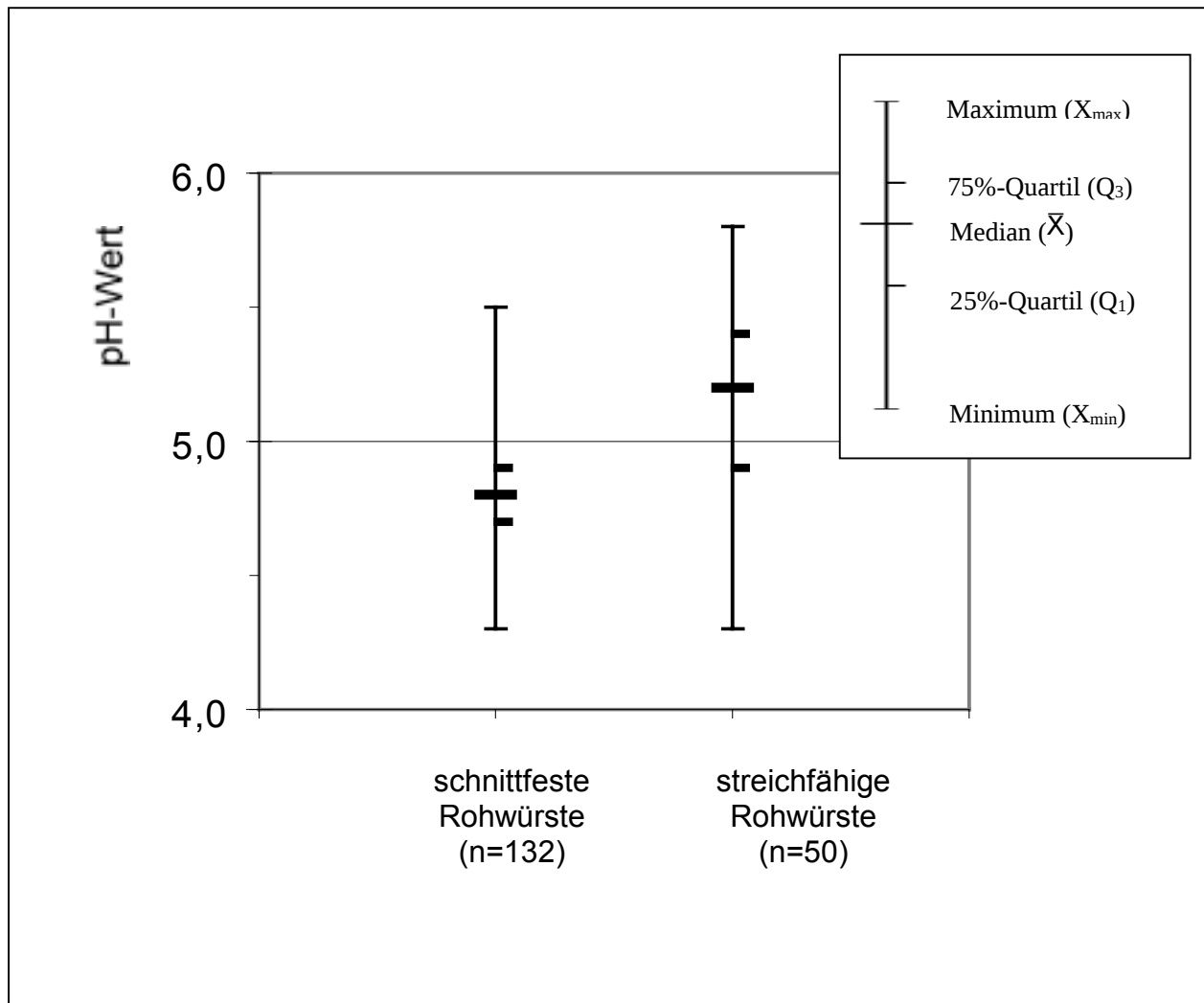
¹: aufgeführt sind lediglich die Bereiche, bei denen mehr als einmal Abweichungen auftraten

Tabelle 29 Häufigkeit der Beanstandungsgründe bei der sensorischen Untersuchung schnittfester und streichfähiger Rohwürste

Konsistenz Gruppe	Bereich	Anzahl Proben	Prozent
schnittfest (n=162)	Summe nicht beanstandet	63	38,9 %
	Beanstandungsgründe 1-fach	40	24,7 %
	Beanstandungsgründe 2-fach	19	11,7 %
	Beanstandungsgründe 3-fach	14	8,6 %
	Beanstandungsgründe 4-fach	13	8,0 %
	Beanstandungsgründe 5-fach	9	5,6 %
	Beanstandungsgründe mehrfach	4	2,5 %
	Summe beanstandet	99	61,1 %
streichfähig (n=57)	Summe nicht beanstandet	31	54,4 %
	Beanstandungsgründe 1-fach	16	28,6 %
	Beanstandungsgründe 2-fach	5	8,9 %
	Beanstandungsgründe 3-fach	3	5,4 %
	Beanstandungsgründe mehrfach	2	3,6 %
	Summe beanstandet	26	45,6 %

Des weiteren wurde bei 132 schnittfesten und 50 streichfähigen Rohwürsten der pH-Wert gemessen. Die einzelnen Daten zu den erhobenen pH-Werte sind in Abbildung 6 in Form von Box-and-Whisker-Plots dargestellt.

Abbildung 6 pH-Werte bei untersuchten streichfähigen und schnittfesten Rohwürsten (n=182)



Die Bestimmung der pH-Werte ergab für die schnittfesten Rohwürste eine Verteilung der Werte von 4,3 bis 5,5, wobei 86 % der Proben im Bereich von 4,6 bis 5,0 lagen. Die streichfähigen Rohwürste lagen im Bereich von 4,3 bis 5,8, wobei 58 % der Proben im Bereich von über 5,0 lagen. Der Mittelwert war bei den schnittfesten Rohwürsten 4,82 mit einem Median von 4,8, bei den streichfähigen Rohwürsten war der Mittelwert 5,16 mit einem Median von 5,2. Bei den streichfähigen Rohwürsten lagen die pH-Werte im Mittel deutlich höher, als die der schnittfesten Rohwürste (f value 51,28, $p < 0,001$). Sowohl bei den streichfähigen als auch den schnittfesten Rohwürsten wiesen die Proben aus mittelständischen Betrieben einen höheren pH-Wert auf, als die aus Großbetrieben/Industriebetrieben (χ^2 4,48, $p < 0,05$).

3.3.3.2 Mikrobiologische Untersuchungen auf *Enterobacteriaceae*, Hefen und *Salmonella* spp.

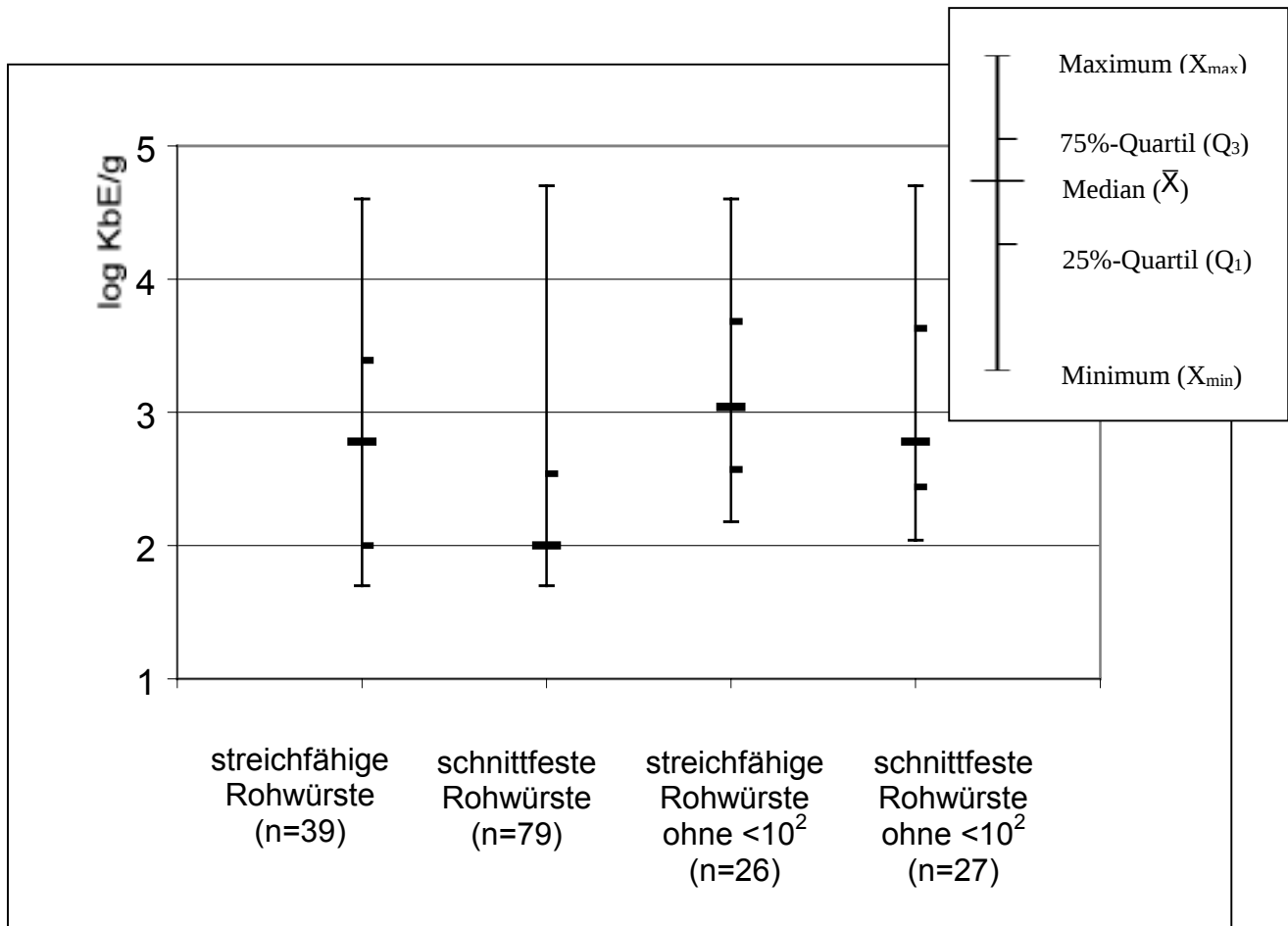
Die mikrobiologische Statuserhebung der Proben wurde über die quantitative Bestimmung der Hefen und *Enterobacteriaceae* als Indikatoren für den Reifezustand vorgenommen. Zudem wurde auf Kontamination mit Salmonellen in 25 g untersucht. Insgesamt wurden 79 schnittfeste Rohwürste (47,9 %) und 39 streichfähige Rohwürste (66,1 %) einbezogen.

Für die Bewertung des Reifezustandes wurde eine Belastung mit *Enterobacteriaceae* bei den schnittfesten Rohwürsten $>10^2$ KbE/g, bei streichfähigen Rohwürsten $>10^3$ KbE/g und bei allen Proben mit Hefen $>10^2$ KbE/g als erhöht bewertet und die Proben somit als mikrobiologisch nicht ausgereift eingestuft.

Die Ergebnisse zum Nachweis von Hefen sind in Abbildung 7 in Form von Box-and-Whisker-Plots enthalten.

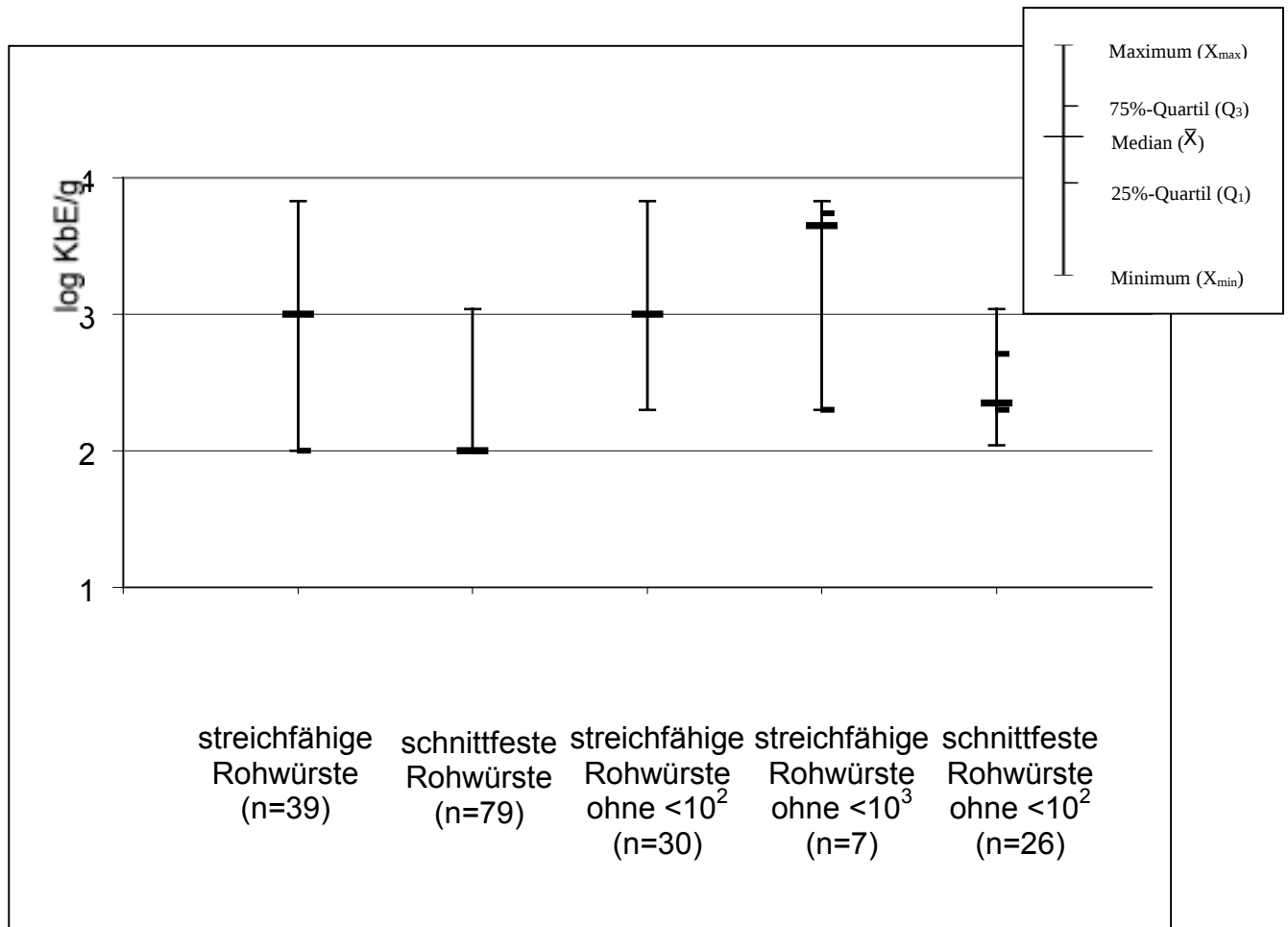
Der Median der Koloniezahlwerte für Hefen lag bei den streichfähigen Rohwürsten höher als bei den schnittfesten Rohwürsten. Beim Vergleich der Proben mit abweichenden Befunden wiesen die streichfähigen Rohwürste eine höhere Kontaminationsrate mit Hefen auf (O.R. 3,85; χ^2 11,14; $p < 0,001$).

Abbildung 7 Nachweis von Hefen aus streichfähigen und schnittfesten Rohwürsten (Kolonie-bildende Einheiten [KbE] pro Gramm [g])



Die Ergebnisse zum Nachweis von *Enterobacteriaceae* sind in Abbildung 8 in Form von Box-and-Whisker-Plots enthalten. Hier wurde zum einen deutlich, daß bei den streichfähigen Rohwürsten der Median höher lag als bei den schnittfesten. Rechnete man die Proben heraus, die bei den streichfähigen Rohwürsten $<10^3$ und bei den schnittfesten $<10^2$ lagen, so wurde deutlich, daß die Koloniezahlwerte für die *Enterobacteriaceae* bei den streichfähigen Rohwürsten im Mittel um eine Zehnerpotenz höher lagen.

Abbildung 8 Nachweis von *Enterobacteriaceae* aus streichfähigen und schnittfesten Rohwürsten (Kolonie-bildende Einheiten [KbE] pro Gramm [g])



Bei den streichfähigen Rohwürsten wiesen 59 % der Proben erhöhte Koloniezahlwerte für Hefen auf, bei fünf Prozent waren die *Enterobacteriaceae* erhöht, acht Prozent der Proben wiesen bei beiden Parametern erhöhte Gehalte auf. Insgesamt wurden 72 % der streichfähigen Rohwürste mikrobiologisch als nicht ausgereift eingestuft. Die einzelnen Daten hierzu sind in Tabelle 30 enthalten.

Tabelle 30 Gegenüberstellung der mikrobiologischen Befunde zur Untersuchung auf Hefen und *Enterobacteriaceae* in streichfähigen Rohwürsten (n=39)

Gruppe	<i>Enterobacteriaceae</i> (KbE/g)	Hefen (KbE/g)	Anzahl Proben	Prozent
o.B.	$<10^3$	$<10^2$	11	28%
Hefen erhöht	$<10^3$	$>10^2$	23	59%
<i>Enterobacteriaceae</i> erhöht	$>10^3$	$<10^2$	2	5%
<i>Enterobacteriaceae</i> und Hefen erhöht	$>10^3$	$>10^2$	3	8%
mikrobiologisch nicht ausgereift			28	72%

Ein Prozent der schnittfesten Rohwürsten wies für *Enterobacteriaceae* Koloniezahlwerte von $>10^2$ KbE/g auf, Hefen waren bei 28 % der schnittfesten Rohwürsten erhöht. Beide Parameter waren bei sechs Prozent der Proben $>10^2$ KbE/g. Insgesamt wurden 35 % der schnittfesten Rohwürste als mikrobiologisch nicht ausgereift eingestuft. Die Ergebnisse sind im einzelnen in Tabelle 31 aufgeführt.

Tabelle 31 Gegenüberstellung der mikrobiologischen Befunde zur Untersuchung auf Hefen und *Enterobacteriaceae* in schnittfesten Rohwürsten (n=79)

Gruppe	<i>Enterobacteriaceae</i> (KbE/g)	Hefen (KbE/g)	Anzahl Proben	Prozent
o.B.	$<10^2$	$<10^2$	51	65 %
Hefen erhöht	$<10^2$	$>10^2$	22	28 %
<i>Enterobacteriaceae</i> erhöht	$>10^2$	$<10^2$	1	1 %
<i>Enterobacteriaceae</i> und Hefen erhöht	$>10^2$	$>10^2$	5	6 %
mikrobiologisch nicht ausgereift			28	35 %

Die Höhe der ermittelten Keimzahlwerte für *Enterobacteriaceae* und Hefen wies keine signifikanten Zusammenhänge auf. Signifikante Unterschiede wurden jedoch bei der Anzahl der Proben festgestellt, die erhöhte Koloniezahlwerte sowohl für *Enterobacteriaceae* als auch für Hefen aufwiesen.

Die streichfähigen Rohwürsten wiesen im Vergleich zu den schnittfesten Rohwürste eine höhere Kontaminationsrate mit *Enterobacteriaceae* auf (O.R. 40,56; χ^2 59,19; $p < 0,001$). Bei Gegenüberstellung der Anzahl an Proben mit abweichenden mikrobiologischen Befunden mußten bei den streichfähigen Rohwürsten signifikant mehr Proben als mikrobiologisch nicht ausgereift eingestuft werden (O.R. 33,7; χ^2 37,27; $p < 0,001$).

Faßt man diese Daten zusammen, so ergibt sich zum einen ein signifikanter Hinweis darauf, daß die streichfähigen Rohwürste nach einer deutlich kürzeren Fermentationsphase in der Truppenverpflegung ausgegeben wurde. Es mußte jedoch auch bei den schnittfesten Rohwürste bei mehr als einem Drittel der Proben eine nur kurze Fermentationszeit unterstellt werden.

Bei der Untersuchung von 116 Proben auf *Salmonella* spp. wurden bei zwei schnittfesten Rohwürsten (2,6 %) einmal *Salmonella* Typhimurium aus einer Cervelatwurst sowie einmal *Salmonella* Derby aus einer Salami „1a“ nachgewiesen. In keiner der einbezogenen streichfähigen Rohwürste gelang der Nachweis von Salmonellen.

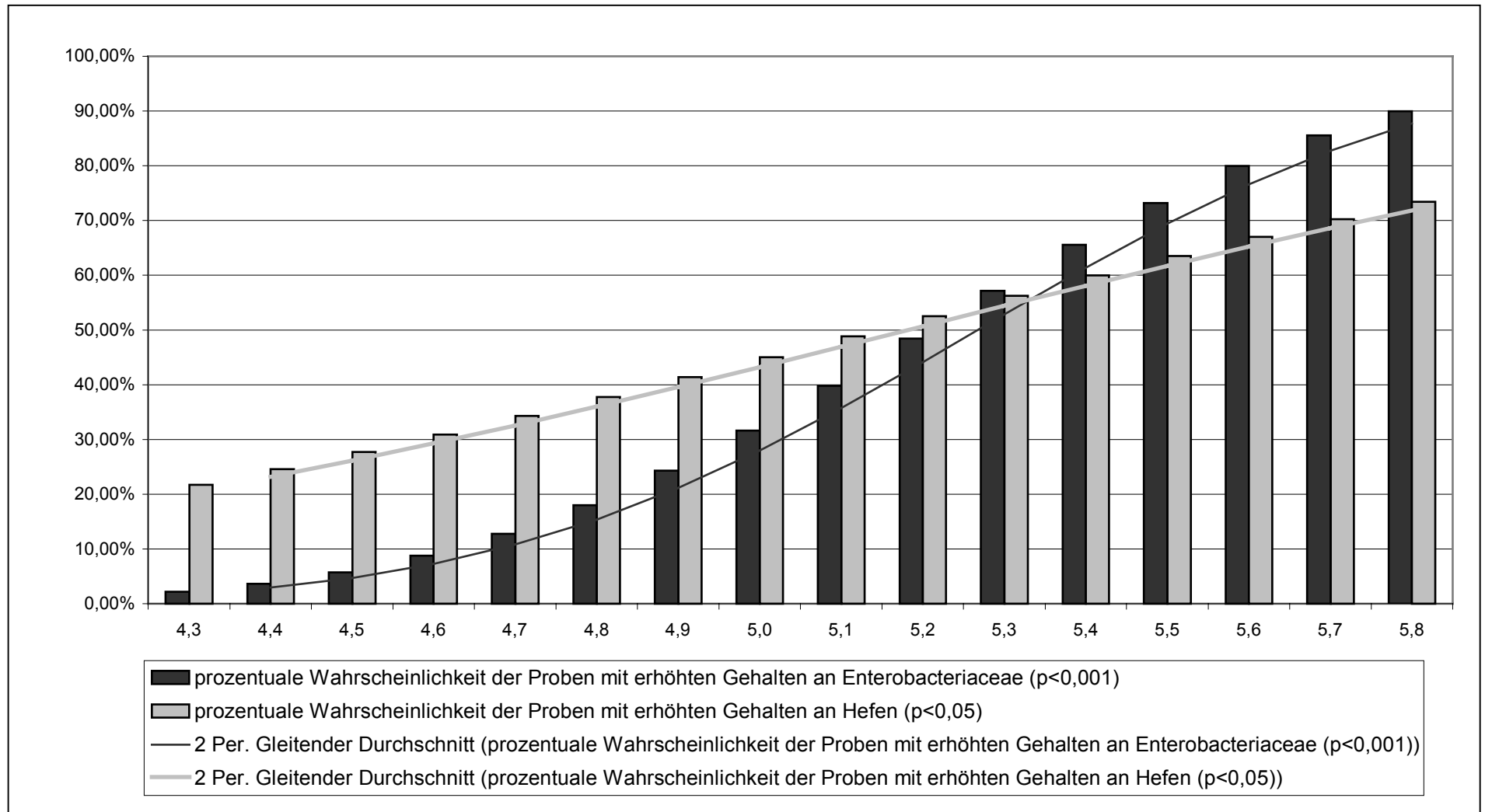
Die beiden Rohwürste stammten aus mittelständischen Betrieben. Einer der Betriebe hatte keine EU-Zulassung für Fleischverarbeitung. Statistische Zusammenhänge waren nicht nachweisbar.

3.3.3.3 Einflußfaktoren auf den mikrobiologischen Status streichfähiger und schnittfester Rohwürste

Neben den in Kapitel 3.3.3.2 beschriebenen signifikanten Zusammenhängen zwischen der Konsistenz und den erhöhten Gehalten an *Enterobacteriaceae* und Hefen wurden mögliche weitere Einflußfaktoren auf diese beiden Parameter geprüft.

Den einzigen signifikanten Einfluß auf die Anzahl der Proben mit abweichenden Befunden bei *Enterobacteriaceae* und Hefen wies der pH-Wert auf. Hierbei konnte eine statistisch hoch signifikante Korrelation zwischen einer Erhöhung des pH-Wertes und einer Erhöhung der Kolonie-bildenden Einheiten (KbE/g) der *Enterobacteriaceae* nachgewiesen werden (χ^2 21,58; $p < 0,001$). Ein ebensolcher Zusammenhang konnte für die KbE/g der Hefen nachgewiesen werden, wenn auch schwach signifikant (χ^2 4,57; $p < 0,05$). In Abbildung 9 sind die steigenden prozentualen Anteile von Proben mit erhöhten Gehalten an *Enterobacteriaceae* bzw. Hefen den jeweils ermittelten pH-Werten streichfähiger und schnittfester Rohwürste zugeordnet. Danach besteht bereits bei einem pH-Wert ab 5,1 eine hohe Wahrscheinlichkeit, daß 40 % der Rohwürste einen erhöhten Gehalt an *Enterobacteriaceae* aufweisen, bei Hefen bereits ab einem pH-Wert von 4,9. Bei Berechnung der Daten unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Gruppen streichfähiger und schnittfester Rohwürste waren keine weiteren statistischen Zusammenhänge nachweisbar.

Abbildung 9 Prozentualer Anteil der Proben mit erhöhten Gehalten an *Enterobacteriaceae* oder Hefen in Abhängigkeit vom pH-Wert der Probe



3.3.4 Nachweis von VTEC in streichfähigen und schnittfesten Rohwürsten

Es wurden insgesamt 165 schnittfeste und 59 streichfähige Rohwürste mit Hilfe der Immunomagnetischen Separation (IMS) und immunologischem Screening über EIA mit anschließender Isolierung über den Immunoblot untersucht. Als VTEC-positiv wurde nur diejenige Proben gewertet, bei der auch ein Stamm mit verotoxinogenen Eigenschaften isoliert werden konnte.

3.3.4.1 Vorkommen

Als eine Screening-Methode wurde der EIA nach Anreicherung mit Isolierung über den Immunoblot verwendet. Insgesamt wurde nach Anreicherung in mTSB+M bei jeweils drei schnittfesten und drei streichfähigen Rohwürsten, nach Anreicherung in BRILA bei zwei schnittfesten Rohwürsten der „Cut Off“-Wert im EIA-Verfahren überschritten. Die Überschreitung des „Cut Off“-Wertes war in allen Fällen jedoch sehr gering im Vergleich zu den eingesetzten Positivkontrollen. In keiner Probe wurde der „Cut Off“-Wert gleichzeitig nach beiden Anreicherungen überschritten. Die Isolierung eines verotoxinogenen Stammes über den Immunoblot gelang lediglich aus einer Salami.

Weiterhin wurden die Proben mit Hilfe der Immunomagnetischen Separation (IMS) auf Anwesenheit von *E. coli* O157-Stämmen untersucht. Mit Hilfe der IMS gelang der Nachweis aus einer Bauernmettwurst und einer Salami, wobei im Falle der Salami mehrere Stämme über den Immunoblot isoliert werden konnten. Bei der Bauernmettwurst konnte die Überschreitung des „Cut Off“-Wertes im EIA durch den positiven Nachweis über die IMS bestätigt werden. Eine Isolierung über den Immunoblot war in diesem Fall nicht möglich.

Die Ergebnisse der Untersuchungen mit EIA und IMS sind in Tabelle 32 aufgeführt.

Tabelle 32 Untersuchungsergebnisse mit Überschreitung des „Cut Off“-Wertes nach Anreicherung in mTSB+M und BRILA

Verkehrsbezeichnung	Ext Mit [#]	Ext BRILA [#]	IMS 6 CT [◇]	IMS 6 HC [◇]	IMS 24 CT [◇]	IMS 24 HC [◇]	Isolate*	isoliert über
Cervelatwurst	0,150	0,132	negativ	negativ	negativ	negativ	keine	-
Salami	0,151	0,141	positiv	negativ	positiv	positiv	Nr. 86	Immunoblot, IMS
Schinkenwurst, grob	0,164	0,126	negativ	negativ	negativ	negativ	keine	-
Streichmettwurst	0,150	0,132	negativ	negativ	negativ	negativ	keine	-
grobe Zwiebelmettwurst	0,153	0,134	negativ	negativ	negativ	negativ	keine	-
Bauernmettwurst	0,180	0,076	positiv	positiv	negativ	negativ	Nr. 74	IMS
Holsteiner Mettwurst, fein	0,144	0,158	negativ	negativ	negativ	negativ	keine	-
Schinkenmettwurst, fein	0,144	0,158	negativ	negativ	negativ	negativ	keine	-

* die genaue Charakterisierung der Isolate erfolgt in Kapitel 4.3.4.3

[#] O.D. nach Detektion des VT im Premier EHEC der Fa. HISS, Freiburg nach Anreicherung in modifizierter Tryptose-Soja Bouillon (mTSB) mit Mitomycin C (Ext Mit) bzw. Brillantgrün-Galle-Laktose Bouillon (Ext BRILA)

[◇] Immunomagnetische Separation (IMS) nach 6 Stunden (IMS 6) und 24 Stunden (IMS 24) Anreicherung in mTSB+N und BRILA mit Kultivierung auf HC-Medium (IMS 6 HC bzw. IMS 24 HC) und CT SMAC (IMS 6 CT bzw. IMS 24 CT)

Eine Überschreitung des „Cut Off“-Wertes im EIA konnte bei fünf schnittfesten Rohwürsten (entspricht 3,0 % der schnittfesten Rohwürste) und drei streichfähigen (entspricht 5,1 % der streichfähigen Rohwürste) ermittelt werden. Positive Nachweise mit der IMS auf *E. coli* O157 konnten bei einer schnittfesten und einer streichfähigen Rohwurst geführt werden. Insgesamt ergibt sich daraus eine Kontaminationsrate bei schnittfesten Rohwürsten von 0,6 % und bei streichfähigen Rohwürsten von 1,7 %. Die Zahlen im einzelnen sind in Tabelle 33 aufgeführt.

Tabelle 33 Anzahl (n) positiv getesteter Proben im EIA-Verfahren sowie nach Immunomagnetischer Separation (IMS)

Konsistenz	EIA		IMS		Isolate	Prozent
	positiv	negativ	positiv	negativ		
schnittfest (n=165)	5 (3,0 %)	160	1 (0,6 %)	164	1	0,6 %
streichfähig (n=59)	3 (5,1 %)	56	1 (1,7 %)	58	1	1,7 %
gesamt (n=224)	8 (3,6 %)	224	2 (0,9 %)	224	2	0,9 %

Der Nachweis der VTEC O157 gelang aus zwei Proben, die durch das LUFA-ITL eingesandt worden waren. Aus Proben, die in Verpflegungseinrichtungen der Bundeswehr gezogen wurden, konnte kein Nachweis geführt werden.

3.3.4.2 Einflußfaktoren auf die Nachweisrate von VTEC/EHEC

Von den zwei Proben mit positivem Nachweis von VTEC/EHEC entfiel eine auf einen Großbetrieb/Industriebetrieb und eine auf einen mittelständischen Betrieb. Beide Betriebe besaßen die EU-Zulassung.

Die Betriebsdaten der Lieferbetriebe zu den Proben mit Nachweis von VTEC/EHEC sind in Tabelle 34 aufgeführt.

Tabelle 34 Betriebsdaten der Lieferbetriebe zu Rohwürsten mit positivem Nachweis von VTEC/EHEC

Probenbezeichnung	Konsistenz	Betriebsgröße	EU-Zulassung	Nachweis von
Salami	schnittfest	G*	ja	<i>E. coli</i> O157
Braunschweiger Mettwurst	streichfähig	M [#]	ja	<i>E. coli</i> O157

* G: Großbetriebe/Industriebetriebe

[#] M: mittelständische Betriebe

Bei der Nachweisrate von VTEC war weder ein statistischer Zusammenhang mit der Betriebsgröße noch mit der EU-Zulassung nachweisbar.

Bezogen auf alle Proben wiesen Proben aus mittelständischen Betrieben ein leicht erhöhtes relatives Risiko (O.R. 3,14; χ^2 2,12; $p=0,137$) für positive Ergebnisse in EIA auf, jedoch war dieses nicht signifikant. Bei getrennter Berechnung für streichfähige und schnittfeste Rohwürste ließen sich keine statistischen Zusammenhänge errechnen. Die weiteren Ergebnisse aus den eigenen Untersuchungen wiesen keine statistischen Zusammenhänge mit der Nachweisrate bzw. den Ergebnissen des EIA auf.

3.3.4.3 *E. coli*-Serovare mit verotoxinogenen Eigenschaften

Es wurden insgesamt zwei Stämme mit Verotoxin-Bildungsvermögen isoliert und mit Hilfe der PCR auf die Virulenzfaktoren *vtx1*, *vtx2*, *E. coli* attaching and effacing -Gen (*eae*-Gen) sowie das EHEC-Hämolyisin-Gen (*Ehly*) überprüft.

Die Isolate „68“ aus Probe 17 und „74“ aus Probe 27 wiesen biochemisch die Eigenschaften der „klassischen“ *E. coli* O157 auf. Sie waren nicht in der Lage, MUG und Sorbitol zu fermentieren, Indol-positiv und bildeten in der Objektträgeragglutination gegen ein O157-spezifisches polyklonales Antiserum feine Präzipitate. Der Stamm „68“ war zudem in der Lage Urease zu fermentieren.

Bei Prüfung auf Expression der Virulenzfaktoren wurde bei den Isolaten Nr. „68“ und „74“ die Bildung von VT2 und Enterohämolyisin nachgewiesen. VT1 wurde von keinem der Isolate gebildet.

Bei beiden Isolaten waren neben dem *vtx2*-, auch das *eae*- und das *Ehly*-Gen nachweisbar.

3.3.4.4 „Fingerprinting“ der Isolate mittels RAPD-PCR und PFGE

Um eine weitere Charakterisierung der Isolate zu ermöglichen, wurde eine genotypische Differenzierung gegenüber den eingesetzten Referenzstämmen über die „Random Amplified Polymorphic DNA PCR“ (RAPD-PCR) und Makrorestriktionsanalyse mit Darstellung der Fragmente in der Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) durchgeführt. Durch die nach Amplifikation bzw. Restriktionsverdau erhaltenen Bandenmuster sollte über Berechnung des Ähnlichkeitsmaßes nach DICE eine Aussage über genetische Ähnlichkeiten im Sinne klonaler Verwandtschaftsverhältnisse gemacht werden. Zudem sollte durch diese Untersuchungen die Möglichkeit einer Kontamination der Feldproben mit den verwendeten Referenzstämmen ausgeschlossen werden.

Die **RAPD-PCR** wurde mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen Testkits durchgeführt. Es wurden alle zur Verfügung stehenden sechs Primer eingesetzt.

Zur Untersuchung in der RAPD-PCR kamen neben den testeigenen Positivkontrollen (hier K1 und K2 benannt) und einer „Probe“ ohne Zusatz von DNS die Isolate Nr. „68“ und „74“ sowie *E. coli* ATCC25922 als Negativkontrolle. Der als Negativkontrolle eingesetzte Stamm weist keinen der Virulenzfaktoren und auch nicht das Oberflächenantigen O157 auf. Als Referenzstämme wurden DSM8579 (*E. coli* O157:H7) und E32511 (*E. coli* O157:H⁻) eingesetzt.

Die einzelnen eingesetzten Stämme sind einschließlich ihrer Charakteristika in Tabelle 35 aufgeführt.

Tabelle 35 Eigenschaften der Stämme zur Differenzierung mittels RAPD-PCR

Bez.	Stamm/Isolat	Spezies/Serovar	Herkunft	Virulenzgene ¹	eingesetzt als
K1	-	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	Testkit	keine	Positivkontrolle
K2	-	<i>E. coli</i> C1a	Testkit	keine	Positivkontrolle
Ent33	ATCC11775	<i>E. coli</i>	Referenz	keine	Negativkontrolle
Ent36	E32511	<i>E. coli</i> O157:H ⁻	Referenz	vtx2c+, eae+, Ehly+	Vergleichsstamm
Ent37	DSM8579	<i>E. coli</i> O157:H7	Referenz	vtx2+, eae+, Ehly+	Vergleichsstamm
68	8.17	<i>E. coli</i> O157	Feldstamm	vtx2+, eae+, Ehly+	Isolat aus Probe 17
74	27 C'	<i>E. coli</i> O157	Feldstamm	vtx2+, eae+, Ehly+	Isolat aus Probe 27
N	-	-	-	-	„Probe“ ohne DNS

¹

vtx2 : Verotoxin 2-Gen

vtx2c : Verotoxin 2c-Gen

eae: *E. coli* attaching and effacing-Gen

Ehly: EHEC-Hämolysin-Gen

Die Berechnung des Ähnlichkeitsmaßes nach DICE nach Auswertung der Bandenmuster ergab die in Tabelle 36 aufgeführten prozentualen Übereinstimmungen.

Tabelle 36 Prozentuale Übereinstimmung der Isolate „68“ und „74“ zu *E. coli* E32511 und *E. coli* DSM8579 im Bandenmuster nach RAPD-PCR mit sechs verschiedenen Primern, berechnet nach dem Ähnlichkeitsmaß gemäß DICE (1945)

Primer (Sequenz 5' – 3')	Isolat 68 / DSM8579	Isolat 68 / E32511	Isolat 68 / Isolat 74	Isolat 74 / DSM8579	Isolat 74 / E32511	Mittel- wert
1 (GGT GCG GGA A)	48,7	46,7	49,7	72,2	73,1	58,08
2 (GTT TCG CTC C)	54,2	49,4	55,5	51,1	49,4	51,92
3 (GTA GAC CCG T)	77,6	81,3	82,6	70,2	78,2	77,98
4 (AAG AGC CCG T)	86,8	80,8	80,1	77,2	72,2	79,42
5 (AAC GCG CAA C)	85,6	86,3	85,6	87,4	89,0	86,78
6 (CCC GTC AGC A)	85,0	96,5	81,3	93,9	83,1	87,96
Mittelwert	72,98	73,50	72,47	75,33	74,17	

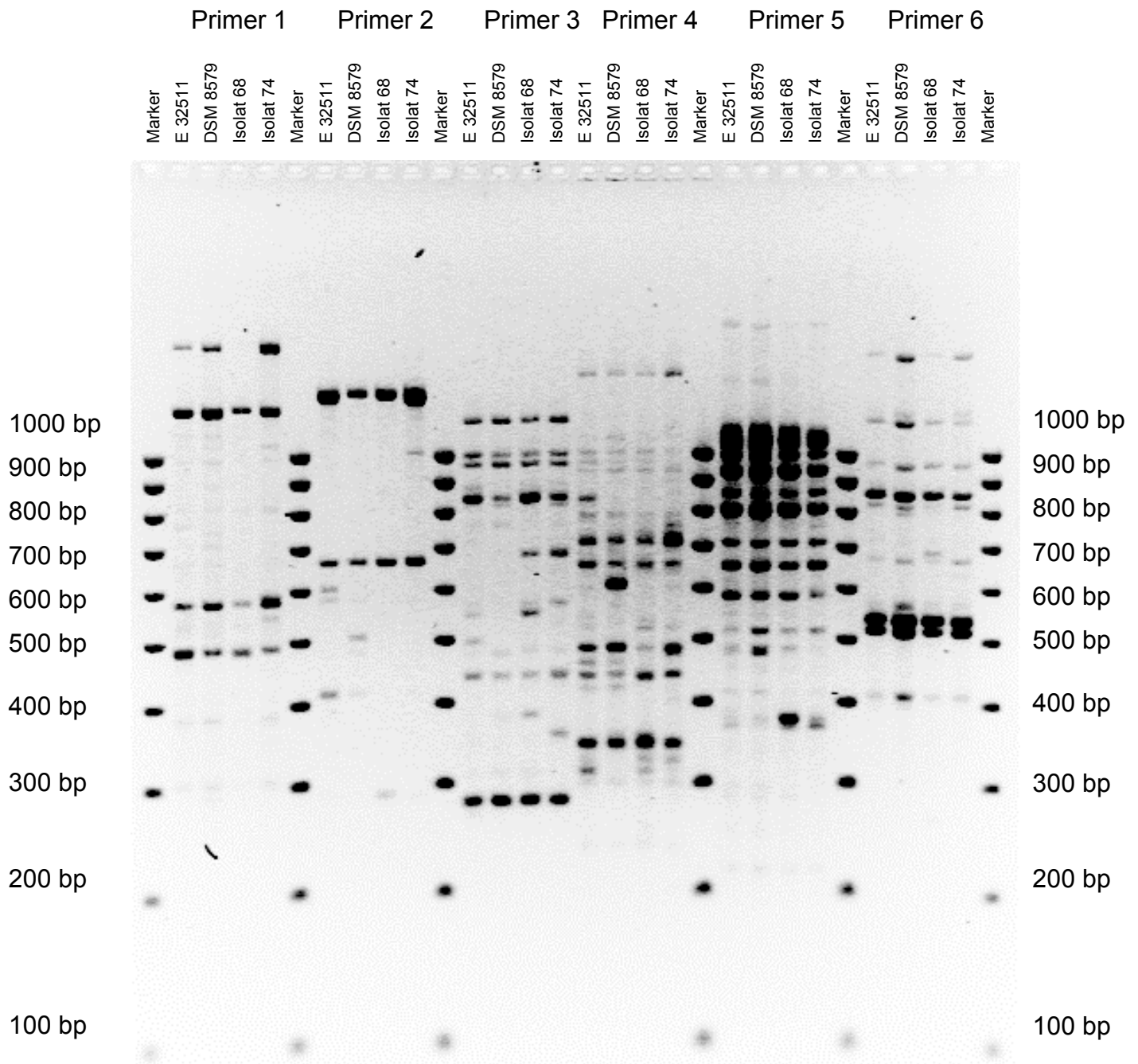
Beim Vergleich der DNA mit RAPD-PCR konnten in Abhängigkeit von den eingesetzten Primern unterschiedliche Ähnlichkeitsmaße berechnet werden. Die Primer 1 und 2 führten zu den deutlichsten Unterschieden im Bandenmuster, bei den Primern 3 und 4 lag der DICE-Koeffizient bei 78 bzw. 79 %. Die Primer 5 und 6 wiesen in jedem Fall Ähnlichkeiten von mehr als 80 % auf. Jedoch traten bei Verwendung der Primer 1 und 2 meist weniger als sechs Banden auf, bei Verwendung der Primer 3 bis 6 in jedem Fall mehr als 10 Banden. Eine Gegenüberstellung der prozentualen Verwandtschaftsverhältnisse mit der Zahl der auszuwertenden Banden ist in Tabelle 37 wiedergegeben. Die Ergebnisse der RAPD-PCR waren nach Wiederholung reproduzierbar. Eine Bewertung der Intensität der erhaltenen Bandenmuster wurde nicht vorgenommen.

Tabelle 37 Anzahl auswertbarer Banden und Ähnlichkeitsmaß gemäß DICE der Isolate „68“ und „74“ sowie der Vergleichsstämme *E. coli* E32511 und *E. coli* DSM8579 nach RAPD-PCR

Bandenzahl mit	Primer 1	Primer 2	Primer 3	Primer 4	Primer 5	Primer 6
Isolat 68	6	6	14	13	11	11
Isolat 74	13	6	14	12	12	13
DSM 8579	14	7	10	15	13	13
E 32511	15	7	11	14	13	11
Mittelwert der Ähnlichkeitsmaße nach DICE	58,1 %	51,9 %	78,0 %	79,4 %	86,8 %	88,0 %

Ein Teil der Ergebnisse ist in Abbildung 10 dargestellt, wobei hier lediglich die Isolate „68“ und „74“ sowie die Vergleichsstämme *E. coli* E2511 und *E. coli* DSM8579 nach RAPD-PCR aufgetragen wurden. Die Darstellung der erhaltenen Banden aller in Tabelle 35 aufgeführten Stämme nach RAPD-PCR mit den einzelnen Primern sowie die dazugehörigen Dendrogramme erstellt nach dem Verfahren UPGMA („Unweighted Pair Group Methode using Arithmetic Average“) mit den dazugehörigen Aufnahmen der Bandenmuster sind den Anhangsabbildungen 1 bis 3 zu entnehmen. Die verwendeten Stämme sind im Anhang mit der Bezeichnung (Bez.) aus Tabelle 35 benannt.

Abbildung 10 Bandenmuster der Isolate „68“ und „74“ im Vergleich zu den Vergleichsstämmen *E. coli* E32511 und *E. coli* DSM8579 nach RAPD-PCR mit unterschiedlichen Primern



Nach Makrorestriktionsanalyse mit *Xba*I und anschließender **Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE)** wurden nach Berechnung die in Tabelle 38 aufgeführten prozentualen Ähnlichkeitsmaße errechnet. Hierbei wurde sowohl der Jaccard-Koeffizient als auch der „simple-matching-coefficient“ zur Berechnung verwendet. Die Zuordnung zu den ermittelten 31 Bandenmustern beim Vergleich der Isolate „68“ und „74“ zu *E. coli* E32511 und *E. coli* DSM8579 ist Anhangstabelle 1 zu entnehmen. Grundsätzlich wurde bei der Zuordnung eine 4 %ige Toleranz der aufgetretenen Banden aller miteinander verglichenen Bakterienstämme zugrunde gelegt. Die verwendeten Stämme sind im Anhang mit der Bezeichnung (Bez.) aus Tabelle 35 benannt.

Tabelle 38 Anzahl auswertbarer Banden und Ähnlichkeitsmaß nach dem „Jaccard-coefficient“ (S_j) sowie dem „simple-matching coefficient“ (S_{SM}) der Isolate „68“ und „74“ zu den Vergleichsstämmen *E. coli* E32511 und *E. coli* DSM8579 im Fragmentmuster nach Restriktionsverdau mit *Xba*I

	Anzahl der Fragmente	S_1	S_0	D_1	D_0	Jaccard coefficient (S_j)	simple-matching coefficient (S_{SM})
E32511 KI zu DSM8579	17 / 19	12	5	5	7	50,00%	58,62%
E32511 KI zu Isolat 68	17 / 19	14	7	3	5	63,64%	72,41%
E32511 KI zu Isolat 74	17 / 20	16	8	1	4	76,19%	82,76%
DSM8579 zu Isolat 68	19 / 19	12	3	7	7	46,15%	51,72%
DSM8579 zu Isolat 74	19 / 20	13	3	6	7	50,00%	55,17%
Isolat 68 zu Isolat 74	19 / 20	16	6	3	4	69,57%	75,86%

S_1 : Fragment tritt bei beiden Stämmen auf

S_0 : Fragment tritt bei keinem der beiden Stämme auf

D_1 : Fragment tritt bei erstem Stamm auf, jedoch nicht bei dem zweiten

D_0 : Fragment tritt bei zweitem Stamm auf, jedoch nicht bei dem ersten

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, daß die Lebensmittelisolate „68“ und „74“ mit der RAPD-PCR wie auch der PFGE deutlich von den Referenzstämmen abzugrenzen waren. Sowohl die berechneten Koeffizienten als auch die nach dem UPGMA-Verfahren („Unweighted Pair Group Methode using Arithmetic Average“) erstellten Dendrogramme ergaben Verwandtschaftsverhältnisse unter 80 %; auch die nach PFGE berechneten JACCARD-Koeffizienten bzw. der „Simple matching coefficient“ belegen dieses.

4 DISKUSSION

In den eigenen Untersuchungen wurden streichfähige und schnittfeste Rohwürste aus Truppenküchen der Bundeswehr sensorisch und mikrobiologisch unter besonderer Berücksichtigung verotoxinogener *E. coli* (VTEC) untersucht. Es sollte geprüft werden, ob grundsätzlich ein Infektionsrisiko mit VTEC für den Verpflegungsteilnehmer der Bundeswehr und speziell eines durch den Verzehr von Rohwürsten besteht. Basierend auf der epidemiologischen Situation im Untersuchungszeitraum werden die spezifischen Voraussetzungen für das Inverkehrbringen von Lebensmitteln bei der Bundeswehr den in der Literatur beschriebenen Infektionsswegen für VTEC gegenübergestellt. Durch Differenzierung und molekularbiologische Feintypisierung sollte eine Einstufung des Pathogenitätspotentials der Isolate ermöglicht werden.

Struktur der Studienpopulation im Vergleich zur epidemiologischen Situation in Deutschland

Im beprobten Gebiet wurden im Mittel 50000 Soldaten in Schlesig-Holstein/Hamburg bzw. 73000 Soldaten in Niedersachsen/Bremen durch 37 Standortverwaltungen und zwei Krankenhausverwaltungen verpflegt. Das Gros der Verpflegungsteilnehmer in den Truppenküchen waren wehrpflichtige Soldaten im Alter von Anfang 20. Im weiteren wurden auch Soldaten im Alter bis maximal 60 Jahren verpflegt, wobei der Anteil derer über 50 Jahre, gemessen an der Verteilung von Wehrpflichtigen, Zeit- und Berufssoldaten eher gering einzuschätzen war. Die Altersstruktur der in dieser Studie zugrunde gelegten Population entsprach nicht im klassischen Sinne der sog. YOPIS-Gruppe („young, old, pregnant, immunocompromised segments of the public“; MOSSEL und STRUIJK, 1993). Im Rahmen nationaler Erhebungen zum Vorkommen von VTEC konnten mittlere Inzidenzen von 0,3 bis 1,2 Erkrankte pro 100.000 Einwohner nachgewiesen werden. Die Inzidenz bei Kindern im Alter bis zu 4 Jahren war, verglichen mit den anderen Altersgruppen, deutlich höher. Infektionen bzw. schwere Erkrankungen in der Altersgruppe von 20 bis etwa 60 wurden nur vereinzelt nachgewiesen (ANONYMUS, 1999a; ANONYMUS, 2000). Die schwereren extraintestinalen Erkrankungsverläufe traten fast ausschließlich bei Kleinkindern auf. Nach derzeitigem Stand liegen kaum Zahlen vor, die die Inzidenz in den mittleren Altersgruppen beschreiben. Bundesweit stehen lediglich Zahlen zur Verfügung, daß in dieser Altersgruppe zumindest die schwereren Erkrankungsverläufe deutlich seltener auftreten. Dies kann darin begründet sein, daß bei den erhobenen Zahlen nur die

berechnet werden konnten, bei denen Isolate zur Differenzierung eingesandt wurden. Dies geschieht meist nur im Rahmen der weiteren Differenzierung bzw. Bestätigung bei schweren Erkrankungsverläufen. Symptomlose Ausscheider in den mittleren Altersgruppen wurden vielfach erst bei der Untersuchung von Kontaktpersonen bei Gruppenerkrankungen nachgewiesen. Diese offenbar geringere Bedeutung VTEC-bedingter Erkrankungen bei Menschen der mittleren Altersgruppen wird durch die Abwesenheit VTEC-bedingter Gruppenerkrankungen im Untersuchungszeitraum bestätigt. Einzelne Erregernachweise aus Stuhlproben waren nicht mit größeren Krankheitsausbrüchen in Zusammenhang zu bringen (MÜLLER pers. Mitt., 2001). Eine deutlich höhere Inzidenz von etwa 13 % wurde von PRAGER et al. (1998) im Rahmen einer Surveillance-Studie errechnet, wobei die dort zugrunde gelegte Population alle Altersgruppen umfaßte. Es bleibt abzuwarten, ob die bundesweit erhobenen Inzidenzen nach Einführung der Meldepflicht durch das am 01. Januar 2001 in Kraft getretene Infektionsschutzgesetz die von PRAGER et al. (1998) ermittelten Zahlen bestätigen. Bezogen auf die Situation bei der Bundeswehr darf das trotzdem nicht zu der Bewertung führen, daß Infektionen und Erkrankungen keine Bedeutung zu haben scheinen. Es wurden in der Literatur auch schwerere Erkrankungsverläufe bei Menschen mittlerer Altersgruppen beschrieben (CARTER et al., 1987; ALEKSIC et al., 1992; BONNET et al., 1998). Mildere Erkrankungsverläufe mit alleiniger Enteritis ohne extraintestinale Komplikationen traten beispielsweise bei einer Gruppenerkrankung an einer Universität auf (RODRIGUE et al., 1995).

Charakterisierung des Probenaufkommens

Im Rahmen epidemiologischer Studien müssen zunächst gewisse „Planungsparameter“ identifiziert werden, um die Qualität der Studien einschätzen zu können (KREIENBROCK und BROLL (1999). Hierzu gehören die interne und die externe Validität, aber auch die Abschätzung des Zufallsfehlers, um den notwendigen Stichprobenumfang errechnen zu können. Des weiteren muß der systematische Fehler, der sog. Bias, weitgehend gering gehalten werden. Hierzu ist eine exakte Definition der Populationen und der Methoden, mit denen sie untersucht werden sollen, erforderlich. Als Grundlage für die eigenen Untersuchungen wurde das Gesamtprobenaufkommen an streichfähigen und schnittfesten Rohwürsten aus den Jahren 1997 bis 1999 als Zielpopulation gesetzt. In der vorliegenden Studie wurde aus einem Gesamtprobenaufkommen von 568 schnittfesten und 168 streichfähigen Rohwürsten eine Zufallsstichprobe gezogen und auf VTEC untersucht. Zur Untersuchung kamen

17,3 % der schnittfesten und 28,4 % der streichfähigen Rohwürste. Dies entsprach bezogen auf alle untersuchten Proben einem Vertrauensintervall von 99,99 %; auch bei getrennter Berechnung der beiden Gruppen streichfähiger und schnittfester Rohwürste ergaben sich mit mehr als 95 % ausreichend hohe Konfidenzintervalle. Die Verteilung des Stichprobenaufkommens entsprach ebenfalls der des Gesamtprobenaufkommens. Hierzu konnte anhand der Verteilung der Stichproben und des Gesamtprobenaufkommens auf die einzelnen Standortverwaltungen eine hohe Korrelation zwischen den beiden Größen nachgewiesen werden. Die hohe Korrelation zwischen der Verteilung des Gesamtprobenaufkommens und der der Soldaten bzw. Verpflegungsteilnehmer entsprach insofern den Erwartungen, daß die Menge der einzusendenden Fleisch und Fleischerzeugnisse auf Grundlage der Zahl der Soldaten bzw. Verpflegungsteilnehmer angefordert wird. Die Zahl der einzusendenden Rohwürste ist damit jedoch nicht automatisch verbunden. Es konnte jedoch gezeigt werden, daß es sich, bezogen auf die Soldaten wie auch die Verpflegungsteilnehmer, für die eigenen Untersuchungen um einen repräsentativen Stichprobenumfang handelt.

Hinzu kamen noch 78 Proben vom LUFA-ITL, eingesandt von potentiellen Lieferbetrieben der Bundeswehr. Diese Proben wurden dadurch, daß lediglich die Betriebsgröße bekannt war, nicht in die Berechnung des notwendigen Stichprobenumfanges einbezogen. Dadurch ergab sich die Möglichkeit, zum einen die Zahl der beprobten Betriebe zu erhöhen und zum anderen auch potentielle Lieferbetriebe mitzubetrachten.

Eine Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Verbraucher kann allerdings nur teilweise erfolgen, da durch die spezifischen Voraussetzungen für die Lieferbetriebe nur mittelständische und Großbetriebe/Industriebetriebe beprobt wurden. Diese ließen sich nicht auf die Grundgesamtheit aller mittelständischen und Großbetriebe/Industriebetriebe in Schleswig-Holstein/Hamburg und Niedersachsen/Bremen beziehen. Dadurch kann anhand der beprobten Betriebe lediglich vorsichtig darauf geschlossen werden, daß die Prävalenz von VTEC in Proben aus Betrieben dieser Größe eher geringer zu sein scheint. Der Nachweise hochvirulenter *E. coli* O157 aus zwei Proben zeigt jedoch, daß keine absolute Sicherheit gegeben werden kann.

Um eine Einschätzung zu erlauben, in welchem Stadium des Fermentationsprozesses sich die Proben befanden, wurden sensorische Untersuchungen sowie mikrobiologische Untersuchungen auf *Enterobacteriaceae* und Hefen durchgeführt. Die in der sensorischen Untersuchung abweichenden Befunde wiesen keine Korrelation zu

denen der mikrobiologischen Untersuchung auf Hefen und *Enterobacteriaceae* auf. Lediglich einer Erhöhung des pH-Wertes der untersuchten Rohwürste folgte ein höheres Risiko der Proben einen abweichenden mikrobiologischen Befund aufzuweisen. Diese Mängel waren für *Enterobacteriaceae* hoch signifikant, bei den Hefen signifikant. Dies erscheint aufgrund der höheren Empfindlichkeit GRAM-negativer Bakterien gegenüber niedrigeren pH-Werten nachvollziehbar, da die Konkurrenzfähigkeit GRAM-negativer Bakterien bei niedrigeren pH-Werten deutlich abnimmt (LÜCKE, 1985). Dies zeigen ebenfalls die Befunde aus der mikrobiologischen Untersuchung auf Hefen und *Enterobacteriaceae*. Hier konnte gezeigt werden, daß ein nicht unerheblicher Anteil, insbesondere der streichfähigen Rohwürste, Herstellungsverfahren unterlegen hat, die keine ausreichende Reduktion der unerwünschten GRAM-negativen Begleitflora bewirkt haben. Dies bildet ein ständiges Risiko, da somit z. B. die Gefahr steigt, daß auch Lebensmittelinfektionserreger vermehrt nachweisbar sind. In den eigenen Untersuchungen konnte weder dieser Zusammenhang noch der mit der Nachweisrate von VTEC hergestellt werden. Jedoch muß ausgehend von dem von TEUFEL et al. (1997) nachgewiesenem Zusammenhang von einem ständigen, wenn auch derzeit geringen, Risiko ausgegangen werden.

Die streichfähigen Rohwürste wiesen im Gegensatz zu den schnittfesten Rohwürsten in signifikant höherem Maße abweichende mikrobiologische Befunde auf. Ein Grund dafür kann neben weiteren der höhere pH-Wert der streichfähigen Rohwürste sein, darüber hinaus kommen streichfähige Rohwürste in der Regel nach einer wesentlich kürzeren Reifungszeit in den Verkehr als schnittfeste Rohwürste. Aufgrund dieser Umstände kann gerade bei den streichfähigen Rohwürsten noch keine so deutliche Reduktion GRAM-negativer Bakterien erzielt werden. Die sehr kurze Reifungszeit der streichfähigen, aber auch bei einigen schnittfesten Rohwurstzeugnissen spiegelt sich auch im Anteil der Proben mit erhöhten Gehalten an Hefen wieder. Hefen dominieren neben *Micrococcaceae* bei schlachtfischem Fleisch die Zusammensetzung der Mikroflora, wenn man einwandfreie hygienische Bedingungen bei der Schlachtung voraussetzt (LÜCKE, 1985). Die Reduktion des Gehaltes an Hefen im Kern einer Rohwurst unter 10^2 KbE/g erfolgt infolge des Sauerstoffentzuges ab etwa 14 Tagen Fermentation (HECHELMANN, 1985). Aufgrund der durchgeführten orientierenden Untersuchungen kann also davon ausgegangen werden, daß es sich bei den untersuchten Rohwürsten um Produkte handelte, die am Beginn ihrer Fermentation waren.

Bei den untersuchten streichfähigen Rohwürste wurde ein höherer Anteil an mikrobiologisch nicht ausgereiften Produkten nachgewiesen. Der fehlende Nachweis von *Salmonella* spp. aus streichfähigen Rohwürsten entspricht den Ergebnissen aus der „Bundesweiten Erhebung zum mikrobiologischen Status von frischen streichfähigen Rohwürsten“ des BgVV (TEUFEL et al., 1997). Hier ließ sich zwischen *Salmonella*-positiven Proben und hohen Gehalten an *Enterobacteriaceae* und *Pseudomonas* spp. kein Zusammenhang herstellen.

Bedeutung der für VTEC/EHEC beschriebenen Infektionswege für die Produktionsabläufe in Verpflegungseinrichtungen der Bundeswehr

Wie in den eigenen Untersuchungen dargestellt, werden im Mittel 3000 Soldaten durch eine Standortverwaltung verpflegt. Die unter Vertrag stehenden Lieferbetriebe müssen eine entsprechende Kapazität aufweisen, um zu den geforderten Zeitpunkten die entsprechende Menge an Lebensmitteln liefern zu können. Dies führt dazu, daß fast ausschließlich mittelständische und Großbetriebe/Industriebetriebe unter Vertrag stehen.

Lebensmittel, die unter dem Zusatz von Rindfleisch hergestellt werden, stellten in der Vergangenheit wiederholt die Ursache für Lebensmittelinfektionen mit EHEC dar. Hierbei spielten VTEC des Serotyps O157 bei Gruppenerkrankungen eine bedeutsame Rolle (vgl. Kapitel 2.3.2). Wie oben beschrieben wurden auch andere *E. coli*-Serovare wiederholt im Rahmen von größeren Ausbrüchen wie auch bei sporadischen Infektionen nachgewiesen. Durch epidemiologische Studien konnte belegt werden, daß die infektiöse Dosis sehr gering ist, was die hohe Virulenz dieses Pathovars belegt. Neben der Übertragung von VTEC vom Tier bis in das fertige Lebensmittel besteht ein hohes Infektionsrisiko infolge unsachgemäßen Umgangs mit verzehrfertigen Lebensmitteln oder auch durch Schmierinfektionen. Dieser mögliche Infektionsweg für VTEC muß immer im Falle eines Verdachtes auf Lebensmittel-bedingte Erkrankung beachtet werden.

Bei keiner der im Untersuchungszeitraum aufgetretenen Gruppenerkrankungen konnten VTEC als Infektionsursache nachgewiesen werden, wohl aber in zwei Fällen *Salmonella* spp.. Bei beiden Lebensmitteln handelte es sich nach den Ergebnissen der Recherchen vor Ort um Lebensmittel, die während des Produktionsprozesses kontaminiert wurden. In keinem Fall traten die Erkrankungen durch den Verzehr roher oder unzureichend gegarter Lebensmittel tierischer Herkunft auf. Die Möglichkeit der sekundären Kontamination verzehrfertiger Lebensmittel besteht jedoch nicht nur für

Salmonella spp., ebenso sind in der Vergangenheit Infektionen mit VTEC durch den Verzehr sekundär kontaminierter Lebensmittel beschrieben worden (TSCHÄPE et al., 1995; GALLIEN et al., 1997a).

In den Verpflegungseinrichtungen der Bundeswehr im untersuchten Gebiet werden aus einer Kücheneinheit bis zu 1500 Mann verpflegt. Die großen Mengen produzierter Lebensmittel bergen bei unsachgemäßer Handhabung ein ständiges Infektionsrisiko. Die hohe Zahl der Verpflegungsteilnehmer führt dazu, daß lebensmittelbedingte Erkrankungen zu einer entsprechend hohen Zahl Erkrankter führen können. Hierbei können neben der Gruppe der VTEC Zoonoseerreger wie z. B. *Salmonella* spp. von Bedeutung sein. Im Unterschied zur Gruppe der VTEC ist jedoch bei *Salmonella* spp. von ungleich höheren infektiösen Dosen auszugehen (KRÄMER, 1997). Die in Kapitel 2.3.3 beschriebenen Infektionswege mit VTEC sind denen von *Salmonella* spp. grundsätzlich vergleichbar. Im Unterschied zu VTEC gelten für lebensmittelbedingte Salmonellosen des Menschen Hühner, Puten, Enten und Gänse als das wichtigste Reservoir. Somit kann bei hygienewidrigen Umständen bei der Herstellung von Lebensmitteln das Risiko einer Infektion mit VTEC gleichermaßen wie mit Salmonellen bestehen. Die zwingende Notwendigkeit einer gewissenhaften Durchführung betriebsinterner Kontrollverfahren zur Verbesserung der Lebensmittelsicherheit wird durch diese Dimensionen eindrucksvoll bestätigt.

Ein großer Teil der Lebensmittel, die als Risikolebensmittel einzustufen sind, dürfen in Verpflegungseinrichtungen der Bundeswehr nicht ausgegeben werden. Durch Beschränkungen beim Bezug von Lebensmitteln wird einigen möglichen Infektionswegen vorgebeugt. Die Gefahr sekundärer Kontaminationen kann jedoch nicht durch Bezugsverbote bei einzelnen Lebensmitteln ausgeschlossen werden. Bei Einhaltung auch der Vorgaben der ZDv 46/28 besteht ein geringes Infektionsrisiko. Eine potentielle Infektionsquelle für VTEC kann jedoch durch den Bezug von Rohwürsten entstehen, da selbst geringe Zahlen von VTEC im Wurstbrät aufgrund der niedrigen infektiösen Dosis zu Erkrankungen führen könnten. Es muß derzeit davon ausgegangen werden, daß für VTEC im Unterschied zu Salmonellen auch beim rein qualitativen Nachweis nach Anreicherung ein Erkrankungsrisiko nicht auszuschließen ist (WILLIAMS et al., 2000). Jedes Überleben hochvirulenter Stämme in verzehrsfertigen Produkten bedeutet ein Erkrankungsrisiko (HECKÖTTER und BÜLTE, 1998). Bei den in der Literatur beschriebenen Ausbrüchen konnte die niedrige infektiöse Dosis nachgewiesen werden. Dies wurde bei einer durch den Verzehr von

Mettwurst hervorgerufenen Gruppenerkrankung durch PATON et al. (1996) eindrucksvoll belegt.

Überlebensfähigkeit von VTEC und EHEC O157 in streichfähigen und schnittfesten Rohwürsten

Zu Beginn des Produktionsprozesses werden dem Brät Starterkulturen zugesetzt. Durch die klimatischen Bedingungen im Zuge der Reifung entsteht ein Selektionsvorteil für die Fermentationsflora, gleichzeitig werden unerwünschte GRAM-negative Mikroorganismen, wie *Enterobacteriaceae*, zurückgedrängt. Dieses bedingt zum einen eine weitgehend standardisierbare Ausbildung der typischen sensorischen Eigenschaften einer Rohwurst, zum anderen eine Sicherheit dieser Lebensmittelgruppe im Hinblick auf die Abwesenheit möglicher GRAM-negativer Infektionserreger. Grundsätzlich handelt es sich hier um ein biologisches System, das durch die Zugabe definierter Starterkulturen und Zusatzstoffe, durch Steuerung der äußeren Bedingungen den Fermentationsprozeß im Zuge der Reifung weitgehend standardisieren läßt. Je länger die Reifung einer Rohwurst andauert, desto eher ist auch von einer ausreichenden Zurückdrängung GRAM-negativer Infektionserreger auszugehen und die Sicherheit des Lebensmittels Rohwurst steigt. Dieses kann aber im Zuge der industriellen Herstellung, bei der in möglichst kurzer Zeit ein möglichst hochwertiges Erzeugnis produziert werden soll, problematisch werden. Dieses trifft insbesondere zu, wenn die verwendeten Rohstoffe in hohem Maße mit GRAM-negativen Bakterien kontaminiert sind. Dieses kann zu einer verlangsamten Reifung, aber auch einer nicht ausreichenden Zurückdrängung dieser Bakterien führen (LÜCKE, 1985).

Das Grundprinzip, die lebensmittelhygienische Sicherheit einer Rohwurst zu erreichen, ist die Ausnutzung des Hürdeneffektes, wobei zu Beginn der Reifung der Zusatz von Nitrit, im weiteren Verlauf das Sinken des Redoxpotentials, aber auch die Zunahme der Fermentationsflora die wesentliche Rolle spielen. Die Dominanz der Milchsäurebakterien kann im Zusammenspiel mit anderen Hürden wie pH-Wert und a_w -Wert (Wasseraktivität) zu einer Stabilisierung des Produktes führen, wenngleich die anderen Hürden ihre Wirkung meist nur zu Beginn der Reifung entfalten und dann an Bedeutung verlieren (LEISTNER, 1985). Die Bedeutung der Hürden a_w -Wert und Fermentationsflora nimmt zu, je länger eine Rohwurst gereift ist. Bei den kürzer gereiften Produkten spielten insbesondere der pH-Wert und die Fermentationsflora die wesentliche Rolle.

In verschiedenen Studien konnten zwar Reduktionen der zum Rohwurstbrät zugesetzten VTEC nachgewiesen werden, jedoch war der qualitative Nachweis auch nach längerer Fermentation möglich (GLASS et al., 1992; CALICIOGLU et al., 2001; MÜLLER et al., 1998; KOFOTH, 1999). POZZI et al. (1996) konnten bei der von ihnen gewählten Rezeptur keine signifikante Reduktion der zugesetzten Mengen von 10 bis 100 KbE/g nachweisen.

Es kann also davon ausgegangen werden, daß mit Hilfe der derzeit in Deutschland genutzten Verfahren zur Rohwurstherstellung zwar für langgereifte Produkte eine deutliche Reduktion von VTEC möglich ist, jedoch keine Gewähr für deren Abtötung gegeben werden kann. Bei der Herstellung schnellreifender Rohwürste, insbesondere der streichfähigen, können die derzeit angebrachten Herstellungsverfahren keine Inaktivierung von VTEC gewährleisten. Somit sind zumindest die schnellgereiften Rohwurstprodukte der Gruppe der Risikolebensmittel zuzuordnen (MÜLLER et al., 1998; TIMM et al., 1999; KOFOTH et al., 1999). Um einer Infektion mit VTEC durch den Verzehr von Rohwürsten vorzubeugen, ist zumindest für Verbraucher, die der YOPIS-Gruppe angehören, der Verzehr langgereifter Produkte zu empfehlen, da hier eine höhere, wenn auch nicht absolute Sicherheit gegeben scheint.

Phänotypische und genotypische Methoden zur Untersuchung von Rohwürsten auf VTEC sowie EHEC O157

Ausgehend von der geringen minimalen infektiösen Dosis sind für den Nachweis und die Isolierung von VTEC aus Lebensmitteln ausreichend sensitive Methoden erforderlich. Der quantitative Nachweis von VTEC ist zum einen wünschenswert zur Klärung der *dosis infectiosa minima* dieses Lebensmittelinfektionserregers, zum anderen zur Untersuchung von Überlebenskinetiken in Reifungsprozessen von Lebensmitteln sowie nach unterschiedlichen Konservierungs- und Behandlungsverfahren. Die angestrebte Nachweisgrenze von einer Kolonie-bildenden Einheit pro 25 g Lebensmittel konnte jedoch bisher nur nach einem Anreicherungsschritt also im Rahmen eines qualitativen Nachweises erreicht werden. In den eigenen Untersuchungen, die eine Abschätzung des Infektionsrisikos ermöglichen sollten, wurde die Prävalenz von VTEC in streichfähigen und schnittfesten Rohwürsten zugrunde gelegt.

Zum qualitativen Nachweis stehen derzeit verschiedene phänotypische und genotypische Nachweismethoden zur Verfügung (VERNOZY-ROZAND, 1997; BÜLTE et al., 1998). Hierbei muß grundsätzlich zwischen zwei Ansätzen unterschieden

werden. Zum einen werden Serovar-spezifische Methoden zum Nachweis von *E. coli* O157 eingesetzt, zum anderen Serovar-unspezifische Nachweisverfahren für VTEC über das exprimierte Verotoxin bzw. das *vtx*-Gen. Die Wahl des dazu notwendigen Anreicherungsmediums muß der bakteriellen Belastung des zu untersuchenden Lebensmittels Rechnung tragen, um der gesuchten Bakterienspezies den gewünschten Selektionsvorteil zu ermöglichen. Bei der Untersuchung von Rohwürsten auf VTEC ist, bedingt durch den Produktionsprozeß, mit einer hohen Anzahl GRAM-positiver Bakterien zu rechnen. Somit muß die Anreicherung sowohl diese Fermentationsflora auf ein Minimum zurückdrängen, als auch die möglicherweise subletal geschädigten Zielzellen ausreichend revitalisieren, um damit deren Nachweis und Isolierung zu ermöglichen. In einer Reihe von Studien wurden hierzu verschiedene Anreicherungsmedien hinsichtlich dieser Anforderungen geprüft. Die Eignung verschiedener Anreicherungsmedien zur selektiven Erfassung von *E. coli* O157 aus Hackfleischproben mit anschließender Immunomagnetischer Separation (IMS) wurde von HECKÖTTER (1999) geprüft. Hierbei erwiesen sich die modifizierte Tryptose-Soja-Bouillon mit Novobiocin (mTSB+N) und die Brillant-Galle-Laktose (BRILA)-Bouillon im Vergleich zu sechs anderen publizierten Anreicherungsmedien als die geeignetesten. Für den Serovar-unspezifischen Nachweis der gesamten Gruppe der VTEC hat sich in Deutschland die vom BgVV Dessau empfohlene mTSB+N durchgesetzt. Die Eignung dieses Nährmediums wurde für die Untersuchung verschiedener Lebensmittel wie Milch (KLIE et al., 1997), Hackfleisch (TEUFEL et al., 1998) und Rohwurst (TIMM et al., 1999) aber auch Kotproben (RICHTER et al., 1997; GALLIEN et al., 1997b) dokumentiert. Zum Nachweis von *E. coli* O157 wurde in den eigenen Untersuchungen die IMS nach DIN 10167 bzw. der amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG eingesetzt. Gleichzeitig wurde die mTSB+N als Voranreicherung für den Nachweis des Verotoxins mittels eines kommerziell erhältlichen Enzym-Immunoassays verwendet. Die Anreicherung in mTSB mit Mitomycin C (mTSB+M) im Anschluß an die sechsstündige Voranreicherung erlaubte zugleich die Induktion des Toxinbildungsvermögens, um auch hier falsch-negative Ergebnisse weitgehend ausschließen zu können. Der Einsatz des Immunoblot (TIMM et al., 1996) zur Isolierung von VTEC wurde aus dem Grund gewählt, daß der Nachweis der VT-bildenden Stämme ohne weitere Manipulation der einzelnen Kolonien ermöglicht wird. Derzeit stehen keine weiteren phänotypischen Verfahren zur Isolierung von VTEC in standardisierter Form zur Verfügung. Vom Einsatz molekularbiologischer Methoden zur Isolierung (GALLIEN et al., 1996) wurde wegen des vorhergehenden phänotypischen

Screenings abgesehen. Mit Hilfe der eingesetzten Verfahren wurde die derzeit empfindlichste Methode zur Untersuchung auf *E. coli* O157 mit einer Methode zum Nachweis aller VT-bildenden Serovare erfolgreich kombiniert, ohne daß eine getrenntes Ansetzen der Proben erforderlich gewesen wäre.

Die Nachweisgrenzen immunologischer und molekularbiologischer Nachweismethoden nach Anreicherung für VTEC verglichen GALLIEN et al. (1997b) bei der Untersuchung von Kot- und Milchproben. Sie konnten keine signifikanten Unterschiede in der Nachweisrate beider Verfahren feststellen. Im Unterschied dazu läßt sich jedoch für den Nachweis von *E. coli* O157 die Sensitivität um etwa das 100-fache steigern, wenn die Immunomagnetische Separation (IMS) zur Aufreinigung und Aufkonzentrierung der Bakteriensuspension eingesetzt wird (WRIGHT et al., 1994; WEGANT et al., 1995). Darüber hinaus können dadurch das Wachstum von *E. coli* O157 beeinträchtigende Lebensmittelinhaltsstoffe in der Bakteriensuspension reduziert werden, um so die Untersuchung z. B. stark saurer Lebensmittel wie Apfel Cidre zu ermöglichen (JINNEMAN et al., 1995). Da die IMS mit verschiedensten Nachweismethoden durchgeführt werden kann, stellt sie eine effektive Möglichkeit dar, um die Nachweisgrenze herabzusetzen. Im vorliegenden Versuchsaufbau wurde die kulturelle Bestätigung gewählt, um gleichzeitig die Isolierung zu ermöglichen.

Grundsätzlich sollte die Untersuchung von Lebensmitteln auf VTEC/EHEC mit Hilfe mindestens zweier unterschiedlicher Nachweismethoden durchgeführt werden, um zum einen eine weitere Absicherung der Ergebnisse zu erhalten und zum anderen ein größtmögliches Spektrum innerhalb der Gruppe der VTEC abzudecken (BEUTIN et al., 1997; BÜLTE et al., 1998). Der Einsatz einer Serovar-spezifischen Methode parallel zu einer Pathovar-spezifischen erscheint vor dem Hintergrund gerechtfertigt, daß nach wie vor innerhalb des Serovars *E. coli* O157 die Stämme mit der höchsten Virulenz am häufigsten auftreten. Zudem haben sie durch ihre hohe Isolierungsrate bei HUS-Fällen eine besondere epidemiologische Bedeutung. Die Kombination von IMS und ELISA zum Verotoxin-Nachweis wurde ebenfalls von HECKÖTTER et al. (1996) empfohlen, um sowohl nicht typisch reagierende O157-Stämme als auch weitere VTEC nachweisen zu können. Das in den eigenen Untersuchungen eingesetzte Verfahren erfüllt die Forderung nach einer ausreichend hohen Sensitivität, insbesondere für hochpathogene Stämme wie die des Serovars *E. coli* O157. Ebenso ermöglicht es den Nachweis der weiteren Serovare der Pathogruppe VTEC.

Nachweisrate von VTEC sowie EHEC O157 aus streichfähigen und schnittfesten Rohwürsten

In den eigenen Untersuchungen wurden streichfähige und schnittfeste Rohwürste sowohl mit der Immunomagnetische Separation (IMS) auf *E. coli* O157 als auch immunologisch mit einem kommerziell erhältlichen ELISA auf VTEC mit anschließender Isolierung über den Immunoblot untersucht. Von insgesamt acht im ELISA positiven Proben konnten lediglich zwei Stämme isoliert werden. Die Isolierung gelang in beiden Fällen über die IMS, lediglich in einem Fall über den Immunoblot. Auch wenn aufgrund der geringen Anzahl positiver Proben die Vergleichbarkeit der Nachweisrate der beiden eingesetzten Verfahren nicht sinnvoll erscheint, so gibt dies doch einen Hinweis auf die Bestätigung der von anderen Arbeitsgruppen veröffentlichten Angaben, daß durch den Einsatz der IMS die Nachweisgrenze deutlich gesenkt werden kann (WRIGHT et al., 1994).

Insbesondere lebensmittelhygienisch bedenkliche Bakterienspezies zeichnen sich im Gegensatz zu apathogenen durch eine höhere Widerstandsfähigkeit gegenüber den Fermentationsprozessen aus. Die vermehrte Unempfindlichkeit gegenüber niedrigen pH-Werten konnte für EHEC von CLAVERO und BEUCHAT (1996) gezeigt werden. Auch die Reisolierung von in Inokulationsversuchen zugesetzten *E. coli*-Stämmen teilweise nach Fermentationszeiträumen von mehreren Wochen bestätigt dies (MÜLLER et al., 1998). KOFOTH (1999) konnte zudem anhand von Modellversuchen nachweisen, daß sich das Risiko des Vorkommens pathogener *E. coli*-Stämme mit höherem pH-Wert deutlich steigert. Interessanterweise konnten jedoch trotz der teilweise hohen pH-Werte einzelner Proben keine VTEC anderer Serovare als O157 isoliert werden.

In der sensorischen Untersuchung der Proben mit positivem Nachweis von EHEC waren nur geringgradige Abweichungen festzustellen, die pH-Werte lagen mit 4,6 für die Salami und 4,7 für die Bauernmettwurst jeweils unter dem Mittelwert bezogen auf die untersuchte Menge schnittfester und streichfähiger Rohwürste. Es konnten keine statistisch gesicherten Zusammenhänge zwischen der Nachweisrate von VTEC und den durchgeführten sensorischen wie auch mikrobiologischen Untersuchungen auf Hefen und *Enterobacteriaceae* nachgewiesen werden. Die Befunde bestätigen jedoch, daß auch ein Absinken des pH-Wertes nicht zu einer Eliminierung von EHEC führt. Vielmehr muß auch bei optimaler Ausnutzung des Hürdeneffektes mit dem Vorkommen durch Lebensmittel übertragbarer Zoonoseerreger gerechnet werden. Der Nachweis von *E. coli* O157 gelang aus keiner von den Verpflegungseinrichtungen eingesandten

Proben, beide Proben entstammten potentiellen Lieferbetrieben. Trotzdem ist grundsätzlich damit zu rechnen, daß durch die hohe Tenazität pathogener Stämme auch in Rohwürsten aus Verpflegungseinrichtungen EHEC vorkommen können. Insbesondere die gezeigten kurzen Fermentationszeiten, verbunden mit den teilweise höheren pH-Werten einzelner Proben zeigen dieses potentielle Infektionsrisiko für den Verpflegungsteilnehmer auf.

Bei beiden Isolaten handelte es sich um *E. coli* O157, die durch ihre Virulenzfaktoren (VT2, *eae*-Gen und EHEC-Hämolyisin) als hochpathogen einzustufen sind. Aus keiner der Proben konnten VTEC anderer Serovare isoliert werden. Gemessen an der prozentualen Kontaminationsrate von 0,6 % für schnittfeste und 3,4 % für streichfähige Rohwürste stehen diese Befunde im Gegensatz zu den bisher publizierten Daten anderer Arbeitsgruppen. So konnten TIMM et al. (1999) aus 8,8 % von 158 untersuchten streichfähigen und schnittfesten Rohwürsten aus dem Einzelhandel Dessaus VTEC isolieren, wobei vier der Isolate einem Serovar entsprachen, das bereits im Zusammenhang mit Erkrankungen beim Menschen nachgewiesen wurde. Lediglich eines der Isolate wies mit VT1/2, *eae*-Gen und EHEC-Hämolyisin das „volle Virulenzspektrum“ auf. 13 der 14 VT-positiven Proben gehörten zur Gruppe der streichfähigen Rohwürste, weshalb sie zur Gruppe der Risikolebensmittel zu zählen seien. Der Nachweis von *E. coli* O157 aus Rohwürsten in Deutschland wurde bisher noch nicht berichtet. TRUMPF et al. (2000) konnten auf der anderen Seite aus 167 untersuchten Rohwürsten aus Schleswig-Holstein keinen Nachweis von VTEC führen. Die in diesen beiden Studien eingesetzten Verfahren waren vergleichbar. Auch wurde in den eigenen Untersuchungen das immunologische Screening mit dem gleichen Ansatz gewählt, wie bei den genannten Arbeitsgruppen. Somit scheinen die Gründe für die unterschiedlichen Nachweisraten weniger methodischer Art zu sein, vielmehr scheinen die Gründe in der Herkunft der untersuchten Proben zu liegen. In den eigenen Untersuchungen wurden Proben aus mittelständischen Betrieben und Großbetrieben/Industriebetrieben untersucht. Im Fall der Studie des BgVV Dessau (TIMM et al., 1999) wurden Proben aus dem Einzelhandel untersucht (GALLIEN, pers. Mitteilung 2001). In der von TRUMPF et al. (2000) publizierten Studie wurden keine Angaben zur Herkunft der Proben gemacht. Das statistisch erhöhte Risiko für ein positives Ergebnis im EIA bei Proben aus mittelständischen Betrieben bestätigt die Vermutung, daß mit zunehmender Größe der produzierenden Einrichtung und daraus folgender Standardisierung der Produktionsabläufe, die lebensmittelhygienische Sicherheit der Endprodukte zu steigen scheint.

Es erscheint nachvollziehbar, daß es bei der Produktion unter nicht optimierten Bedingungen leichter zur Kontamination des Wurstbrätes kommen kann. Hintergrund sind hier bessere Schulungsmöglichkeiten des Personals, Produkteingangskontrollen wie auch ein Prozeß-begleitendes Monitoring während der Produktion. Diese Faktoren spielen in den optimierten Betriebsabläufen größerer Betriebe eine wesentlichere Rolle, als in Kleinbetrieben/Handwerksbetrieben.

Ebenso ist es denkbar, daß es auch regional zu unterschiedlichen Kontaminationsraten kommen kann. Allein durch die nicht kontinuierliche, wenn auch hohe, Prävalenz von VTEC bereits innerhalb der Rinderbestände kommt es zu einer diskontinuierlichen Ausscheidung VT-bildender Stämme. Bei der Untersuchung von Rindfleischproben wurden durch verschiedene Arbeitsgruppen zum Teil unterschiedliche Nachweisraten publiziert, die zudem deutlich unter den für Rinderkotproben beschriebenen blieben. Dies führt im weiteren zu einer wechselnden Kontaminationsrate der Endprodukte, was auch die unterschiedlichen Nachweisraten bei den einzelnen Lebensmittelgruppen dokumentieren.

Ein weiterer Hintergrund für die unterschiedlichen Nachweisraten kann sich durch das regional unterschiedliche Auftreten verschiedener Serovare ergeben. LIESEGANG et al. (2000) konnten durch den Einsatz molekularer wie auch phänotypischer Fingerprint-Techniken die Heterogenität bei den in Deutschland von 1988 bis 1998 isolierten *E. coli* O157-Stämmen ebenso nachweisen, wie das regional sehr unterschiedliche Auftreten. Durch den Einsatz dieser Techniken war es ihnen nicht möglich, einen epidemiologischen Zusammenhang unter den einzelnen Isolaten herzustellen. Somit kann es durchaus durch regional unterschiedliches Auftreten einzelner Serovare zu unterschiedlichen Kontaminationsraten bei Lebensmitteln aus Rindfleisch kommen. Diese möglichen Zusammenhänge zwischen regional wechselnden VTEC-Inzidenzen in Rinderbeständen und Nachweis in Produkten, die aus Rindfleisch hergestellt werden, müssen durch Studien über einen längeren Zeitraum mit übergreifendem Probenaufkommen untersucht werden.

Feintypisierung der isolierten *E. coli* O157-Stämme anhand von Referenzstämmen mit PFGE und RAPD-PCR

In der Vergangenheit wurden verschiedene phänotypische wie auch genotypische Methoden zur Differenzierung von bakteriellen Isolaten eingesetzt. Eine der bekanntesten Methoden ist hier die Serotypisierung bei *Salmonella* spp.. Auch für *E. coli* wurde dieses Verfahren eingesetzt. Mit zunehmender Kenntnis der einzelnen

Pathovaren von *E. coli* mußte jedoch festgestellt werden, daß die einzelnen Serotypen sich nicht unweigerlich einem Pathovar zuordnen lassen (SCOTLAND et al., 1987; TAMURA et al., 1996). Es wurde für VTEC insbesondere innerhalb des Serovars O157 deutlich, daß hier die Methoden der Serotypisierung, wie auch weitere Typisierungsmethoden wie VT-Genotyp oder Bestimmung des Plasmidprofils keine abschließende Differenzierung der Isolate ermöglichen. Erste Ansätze zur Typisierung ergaben sich durch die Etablierung der Phagentypisierung ebenso wie durch die Differenzierung mittels Multi-Enzym-Elektrophorese (MEE). Hierdurch war es erstmals möglich, die phylogenetischen Zusammenhänge innerhalb des Serovars O157 wie auch gegenüber dem Serovar *E. coli* O55, einem klassischen EPEC-Serovar, nachzuweisen (WHITTHAM et al., 1993).

Die Differenzierung mittels MEE wird jedoch von der Mehrheit der Arbeitsgruppen mittlerweile kaum noch durchgeführt, vielmehr wurden in der Vergangenheit zunehmend molekularbiologische Methoden eingesetzt. Hier wurde von BÖHM und KARCH (1992) erstmals die Möglichkeit beschrieben, *E. coli* O157:H7-Stämme mittels Makrorestriktionsanalyse und anschließender Pulsfeldgelelektrophorese sicher zu differenzieren. Sie prüften vier verschiedene Restriktionsenzyme, von denen sich *Xba*I als das geeigneteste erwies. Die Bestätigung so erhaltener Befunde war nach ihren Untersuchungen mittels *Not*I möglich. Die Auswertung geschah in diesem Fall mittels visuellen Vergleiches der Fragmentmuster. Diese Methode und die daran anschließende Zuordnung der einzelnen Isolate zu einem Fragmentmuster-Typ wurde in der Folge von verschiedenen Arbeitsgruppen vorgenommen. Jedoch ließen sich bei der Interpretation der erhaltenen Fragmentmuster durchaus Unterschiede feststellen. So ließen KRAUSE et al. (1996) eine Abweichung beim Matching der Fragmente untereinander von maximal zwei Prozent bei der Auswertung zu. Stämme mit einer „similarity matrix“ von mehr als 95 % werteten sie als gleich. Dies zeigt beispielhaft die Unterschiede in der Wertung der erhaltenen Ergebnisse. Auch wenn die Standardisierung der PFGE als Fingerprint-Methode bereits weit fortgeschritten ist, so scheinen doch z. T. erhebliche Unterschiede in der Auswertung zu bestehen. BÖHM und KARCH (1992) werteten, wie auch andere Arbeitsgruppen, zwei Isolate als nicht zum gleichen Klon gehörend, wenn sie sich in zwei oder mehr Fragmenten unterschieden. TENOVER et al. (1995) bewerten die Verwandtschaftsverhältnisse von Stämmen anhand des unterschiedlichen Auftretens der Fragmente bei den Isolaten. Erst ab dem Auftreten von mehr als sieben Fragmenten, die nicht bei beiden Stämmen auftreten, werten sie diese als unterschiedlich. Auch die Größe der in die Auswertung

einzubeziehenden Fragmente unterscheidet sich: IZUMIYA et al. (1997) zeigten, daß sich *E. coli* O157:H7-Stämme am sichersten durch ihre Fragmente von weniger als 100 kb differenzieren lassen, andere Arbeitsgruppen beziehen Fragmente von weniger als 100 kb gar nicht mit in ihre Auswertung ein (BENDER et al., 1997).

Einen anderen Ansatz zur Feintypisierung wählten WANG et al. (1993), indem sie mit der RAPD-PCR eine auf Amplifikation basierende Methode wählten. Diese Methode ist jedoch in der Literatur nicht unumstritten, da sie auf der Amplifikation mit Hilfe randomisierter Primer basiert und somit keine definierte Zielsequenz vorhanden ist. Eine Standardisierung erscheint hier nach Einschätzung verschiedener Arbeitsgruppen sehr schwierig. Insbesondere wird die Anfälligkeit gegenüber den verwendeten Geräten, den gewählten Puffern, dem Primer/Template-Verhältnis sowie der *Taq*-Polymerase kritisiert.

In den eigenen Untersuchungen wurden die PFGE wie auch die RAPD-PCR als Methoden zur Feintypisierung der Isolate verwendet. Hierbei wurden zwei Isolate mit zwei Referenzstämmen verglichen. Die PFGE wurde nach Verdau mit dem Restriktionsenzym *Xba*I vorgenommen. Das hier eingesetzte Protokoll kann hinsichtlich seiner Durchführung als weitgehend standardisiert angesehen werden. Wie in den eigenen Untersuchungen beschrieben, wiesen die prozentualen Verwandtschaftsverhältnisse PFGE zu RAPD-PCR ebenso Unterschiede auf, wie auch die ermittelten Verwandtschaftsgrade der Stämme untereinander. Der Verwandtschaftsgrad innerhalb der RAPD-PCR variierte je nach eingesetzten Primer. Es mußte zudem festgestellt werden, daß bei Verwendung der Primer 1 und 2 die Anzahl der amplifizierten Banden z. T. deutlich geringer als 10 Banden war. Die Anzahl von 10 Bande bzw. Fragmenten wird jedoch von TENOVER et al. (1995) als Mindestzahl angesehen, um eine ausreichende Aussage treffen zu können. Die prozentualen Verwandtschaftsverhältnisse nach Amplifizierung mit den Primern 4 bis 6 ergab Verwandtschaftsverhältnisse zwischen 70 und mehr als 90 % zwischen den einzelnen Isolaten wie auch den eingesetzten Referenzstämmen. Auch wenn diese Ergebnisse nach eigener Wiederholung reproduzierbar waren, so steht dem die Kritik verschiedener Arbeitsgruppen an der mangelnden Reproduzierbarkeit dieser Methode aus zuvor genannten Gründen gegenüber. Die Differenzierung der Isolate und der Referenzstämmen war mit Hilfe beider eingesetzter Verfahren möglich. Unabhängig von der Gewichtung der hier eingesetzten Methoden ließen sich bei den untersuchten Bakterienstämmen die hohe Klonalität innerhalb des Serovars O157 bestätigen. Es

kann als gesichert angesehen werden, daß es sich hier um erstmals in Deutschland beschriebene *E. coli* O157-Isolate aus Rohwürsten handelt.

Weitere Untersuchungen mit RAPD-PCR und PFGE müssen zeigen, wieweit die Methoden miteinander vergleichbar sind. Hierzu kann aufgrund der geringen Zahl der untersuchten Stämme keine abschließende Bewertung erfolgen. Insbesondere für die RAPD-PCR als eine schnell und mit geringem materiellen Aufwand durchführbare Methode wäre eine Standardisierung wünschenswert.

5 SCHLUSSFOLGERUNGEN

- Es besteht ein ständiges Risiko einer Kontamination von Rohwürsten mit gesundheitlich bedenklichen Mikroorganismen aufgrund hygienewidriger Produktionsumstände. Nach den derzeitigen Vorschriften der Bundeswehr erscheint eine Infektion durch EHEC für den Verpflegungsteilnehmer durch den Verzehr von Rohwürsten möglich. Aufgrund der vorliegenden Zahlen kann derzeit von einer geringen VTEC-Prävalenz in Rohwürsten aus Verpflegungseinrichtungen der Bundeswehr ausgegangen werden.
- Die untersuchten Rohwürste entstammten alle aus mittelständischen Betrieben oder Großbetrieben/Industriebetrieben. Trotz der unterstellten optimierten Prozeßbedingungen ist mit den derzeit eingesetzten Produktionsverfahren keine ausreichende Inaktivierung aller VTEC-Serovare zu gewährleisten. Der Nachweis hochvirulenter *E. coli* O157-Stämme aus zwei Proben potentieller Lieferbetriebe unterstreicht darüberhinaus die Bedeutung von Rohwürsten als möglichen Vektor bei der Übertragung von Zoonoseerregern auf den Menschen.
- Das Infektionsrisiko mit EHEC durch sekundär kontaminierte Lebensmittel infolge mangelhafter hygienischer Bedingungen bei der Herstellung verzehrsfertiger Speisen muß grundsätzlich berücksichtigt werden. Die Ursachen der aufgetretenen Salmonellenbedingten Gruppenerkrankungen im Berichtszeitraum belegen dies eindrucksvoll.
- Die beschriebenen unterschiedlichen Nachweisraten von VTEC haben ihre mögliche Ursache in regional wie auch in zeitlich unterschiedlichen Prävalenzen in den Rinderbeständen. Überregionale Surveillance-Studien sollten verstärkt durchgeführt werden, um beschriebene Unterschiede in den Prävalenzen von VTEC in Rinderbeständen und Lebensmitteln regionalen Zusammenhängen zuordnen zu können.
- Die Kombination von Immunomagnetischer Separation (IMS) von *E. coli* O157 und phänotypischem Screening auf Verotoxin-Bildungsvermögen ermöglicht neben der gezielten Untersuchung auf *E. coli* O157 auch den Nachweis und die Isolierung von weiteren VTEC-Serovaren.
- Anhand der eingesetzten Fingerprint-Methoden konnte trotz des hohen klonalen Zusammenhanges innerhalb des Serovars *E. coli* O157 eine weitgehende Differenzierung der Stämme vorgenommen werden. Weitere Untersuchungen müssen die Vergleichbarkeit der beiden Verfahren zeigen.

6 ZUSAMMENFASSUNG

In den vergangenen Jahren wurden zunehmend Infektionen durch enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC) beobachtet. Das Serovar *E. coli* O157:H7 gilt als Prototyp dieser Pathogruppe, wobei insbesondere in Deutschland weitere Serovare bei Erkrankungen des Menschen eine bedeutende Rolle spielen. Beim „Hämolytisch-urämisches Syndrom“, der schwersten Verlaufsform einer EHEC-Infektion, spielt jedoch nach wie vor das Serovar O157 die dominierende Rolle. Die hohe Virulenz dieses Pathovars wird zudem durch die sehr geringe infektiöse Dosis von 10 bis 100 Kolonie-bildenden Einheiten unterstrichen.

Bei der Bundeswehr werden die Verpflegungsteilnehmer über Truppenküchen verpflegt. Die Anzahl der Verpflegungsteilnehmer kann bis zu 1500 Mann betragen. Dadurch hat die Einhaltung eines hohen Standards bei Herstellung und Inverkehrbringung von Lebensmitteln einen besonderen Stellenwert. Ziel der eigenen Untersuchungen war es, das Infektionsrisiko mit verotoxinogenen *Escherichia coli* (VTEC) für den Verpflegungsteilnehmer der Bundeswehr zu ermitteln. Hierzu sollten im Zeitraum von 1997 bis 1999 ursächlich für eine Infektion in Frage kommende Lebensmittel auf das Vorkommen von VTEC untersucht werden.

Nach Prüfung der spezifischen Voraussetzungen für das Inverkehrbringen von Lebensmitteln bei den Bundeswehr konnten vielfach als Risikolebensmittel beschriebene Erzeugnisse wie Hackfleischerzeugnisse, Rohmilch und Rohmilchprodukte als möglicher Vektor weitestgehend ausgeschlossen werden, da ihre Ausgabe in Verpflegungseinrichtungen untersagt ist. Im Gegensatz dazu werden jedoch vielfach streichfähige und schnittfeste Rohwürste in den Verpflegungseinrichtungen ausgegeben. Bei Zusatz von Rindfleisch zum Rohwurstbrät ist das Risiko einer Übertragung auf den Menschen durch die Überlebensfähigkeit dieses Pathovars im Zuge der Fermentation besonders gegeben.

Im Untersuchungszeitraum wurden 146 schnittfeste und streichfähige Rohwürste aus Verpflegungseinrichtungen der Bundeswehr in Schleswig-Holstein/Hamburg und Niedersachsen/Bremen mit Hilfe der Immunomagnetischen Separation (IMS) auf *E. coli* O157 sowie mittels eines kommerziell erhältlichen EIA auf verotoxinogene Stämme untersucht. Darüber hinaus wurden weitere 78 streichfähige und schnittfeste Rohwürste aus potentiellen Lieferbetrieben mit dem gleichen Verfahren untersucht.

Sämtliche Proben stammten aus mittelständischen Betrieben oder Großbetrieben/Industriebetrieben. In den Proben aus Verpflegungseinrichtungen wurden in

keinem Fall VTEC/EHEC nachgewiesen, jedoch konnten aus zwei Proben der potentiellen Lieferbetriebe hochvirulente *E. coli* O157 (Verotoxin 2-, *eae*- sowie EHEC-Hämolysin-positiv) isoliert werden. Aufgrund der vorliegenden Zahlen kann derzeit von einer geringen VTEC-Prävalenz in Rohwürsten aus Verpflegungseinrichtungen der Bundeswehr ausgegangen werden, jedoch zeigen die Proben aus potentiellen Lieferbetrieben eine mögliche Gefährdung durch den Verzehr von Rohwürsten auf. Es konnte dadurch gezeigt werden, dass selbst bei den unterstellten optimalen Produktionsbedingungen größerer Betriebe keine vollständige Eliminierung dieser Zoonoseerreger aus fermentierten Rohwurstserzeugnissen möglich ist.

Hinzu kommt bei der Größe der eingesetzten Verpflegungseinrichtungen das Risiko, dass Infektionen durch sekundär kontaminierte Lebensmittel hervorgerufen werden können. Eine Unterbrechung dieses Infektionsweges erscheint nur schwer möglich. Dies wurde durch zwei im Untersuchungszeitraum aufgetretene Salmonellosen bestätigt. In beiden Fällen handelte es sich um Speisen, die infolge mangelnder Betriebshygiene sekundär kontaminiert wurden.

Mit den eingesetzten Untersuchungsverfahren wurde zum einen der besonderen Bedeutung von *E. coli* O157 Rechnung getragen, zum anderen war durch das Screening über das exprimierte Verotoxin mittels EIA auch die Untersuchung auf alle Serovare der VTEC möglich. Um alle potentiellen Infektionserreger dieses Pathovars nachweisen und isolieren zu können, ist in jedem Fall die Untersuchung mit zwei verschiedenen Untersuchungsverfahren anzustreben.

Die isolierten *E. coli* O157-Stämme wurden mit Hilfe molekularbiologischer Fingerprintmethoden („Random Amplified Polymorphic DNA PCR“ [RAPD-PCR] und Makrorestriktionsanalyse mit Darstellung der Fragmente in der Pulsfeldgelelektrophorese [PFGE]) im Vergleich zu Referenzstämmen untersucht. Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass die Lebensmittelisolate mit der RAPD-PCR wie auch der PFGE deutlich von den Referenzstämmen abzugrenzen waren. Es konnte ebenso gezeigt werden, dass es durch den Einsatz verschiedener Methoden zu unterschiedlichen Ergebnissen kommen kann. Die Bewertung hinsichtlich möglicher klonaler Zusammenhänge kam jedoch in der Summe zu vergleichbaren Ergebnissen.

7 SUMMARY

Ulrich Schotte:

Assessment of the risk of infection due to verotoxinogenic *E. coli* (VTEC) for soldiers in catering facilities of the Federal Armed Forces with emphasis on spreadable and sliceable dry fermented sausages

In recent years infections caused by enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) have increased. The serovar *E. coli* O157 is considered as the prototype in this pathogroup, although, particularly in Germany, further serovars play an important role in human infections. However, in case of the “hemolytic-uremic syndrome”, the most serious course of an EHEC-infection, the serovar O157 plays the major role. The high virulence of this pathogroup is emphasized by the very low infectious dose of 10 to 100 colony-forming units.

In the federal armed forces large kitchens cater for the soldiers. Up to 1500 soldiers are catered by one kitchen. Thus, the compliance with high standards in the production and release of food is extremely important. The aim of this study was to investigate the verotoxinogenic *E. coli* (VTEC) in the food supplies of the soldiers. Between 1997 and 1999 potentially contaminated food had to be investigated with regard to potential contamination with VTEC.

Concerning the specific requirements for the release of food in the federal armed forces, some kinds of food, which are often described as causative agents in human illness, such as minced meat, raw milk and products made of raw milk, are not allowed in catering facilities. So they could be excluded as a potential vector. Instead, spreadable and sliceable dry fermented sausages are served in catering facilities very frequently. If beef is used as ingredient in dry fermented sausages, the risk of transmission to human beings is especially high due to the survivability of this pathogroup in the course of the fermentation process.

During the survey period, 146 dry fermented sausages from catering facilities of the federal armed forces in Schleswig-Holstein/Hamburg and Lower Saxony/Bremen were monitored for *E. coli* O157 content using Immunomagnetic separation (IMS). Verotoxinogenic strains were also analyzed by means of a commercially available EIA.

In addition, another 78 dry fermented sausages from potential distributors were investigated using the same procedure.

All samples originated from medium sized companies or large firms/industrial firms. No VTEC/EHEC were detected in the samples from army catering facilities, whereas highly virulent *E. coli* O157 (verotoxin 2, *eae*- as well as EHEC-Haemolysin-positive) were isolated from two samples from potential distributors. Based on the present data a low VTEC-prevalence in dry fermented sausages from army catering facilities can be assumed. The samples from potential suppliers indicate that the consumption of dry fermented sausages present a potential hazard. It seems, that even under supposedly optimal production conditions of larger food suppliers, the total elimination of these zoonotic bacteria from dry fermented sausages is not possible.

Furthermore, infections due to secondary contaminated food are a permanent risk in catering facilities of this size. The total interruption of this way of transmission appears to be impossible. Two large outbreaks of salmonellosis during the survey period seem to confirm this. In both cases the cause was secondary contaminated food as a result of insufficient hygienic production practices.

The methods used account not only for the outstanding significance of the serovar *E. coli* O157. By applying a screening method (EIA) based upon the expression of the verotoxin, it was also possible to include all serovars of VTEC. In all cases, the use of two different procedures is recommended in order to detect and isolate all strains of this pathogroup.

The isolated *E. coli* O157-strains were typed by comparison to reference strains using molecular fingerprint techniques („Random Amplified Polymorphic DNA PCR“ [RAPD-PCR] and macrorestrictionanalysis with illustration of the fragments by means of Pulsed Field-Gelelectrophoresis [PFGE]). In summary, it was possible to distinguish clearly between isolates from the strains found in the food samples and the reference strains. It was also possible to demonstrate that different methods lead to varying results. Hence, the assessment regarding the potential clonal relationships between individual strains was comparable.

8 ANHANG

Abbildung 1 Bandenmuster nach RAPD-PCR mit den Primern 1 und 2 der Isolate „68“ und „74“ im Vergleich zu den eingesetzten Referenzstämmen sowie das daraus errechnete Dendrogramm zur Darstellung des Verwandtschaftsgrades

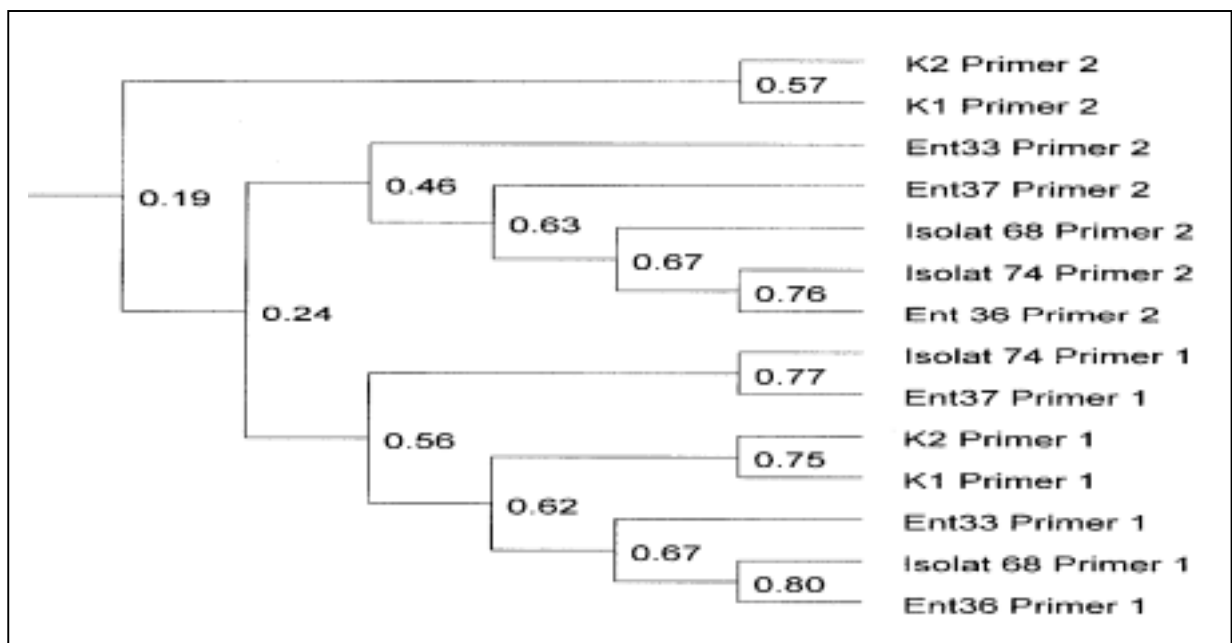
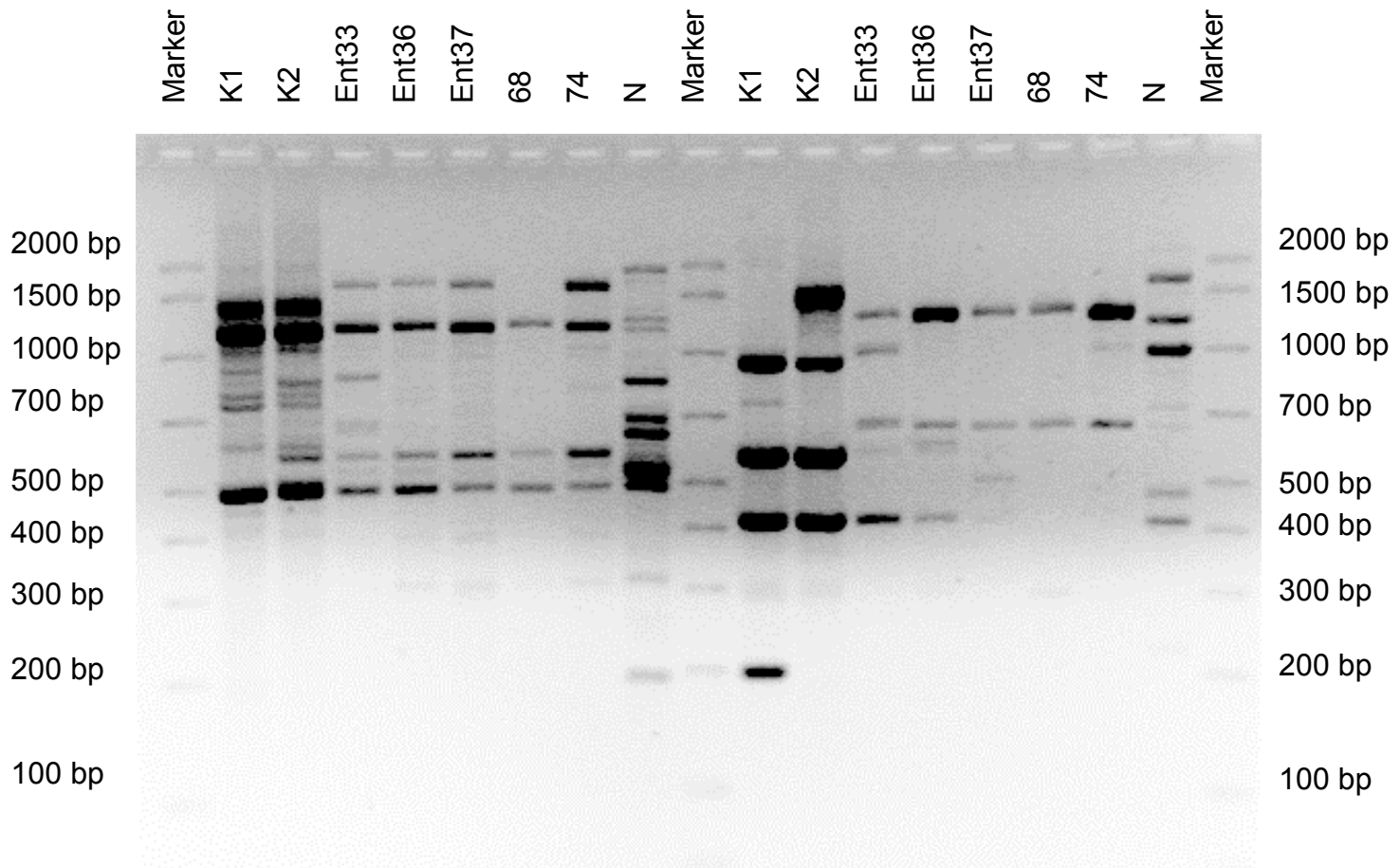


Abbildung 2 Bandenmuster nach RAPD-PCR mit den Primern 3 und 4 der Isolate „68“ und „74“ im Vergleich zu den eingesetzten Referenzstämmen sowie das daraus errechnete Dendrogramm zur Darstellung des Verwandtschaftsgrades

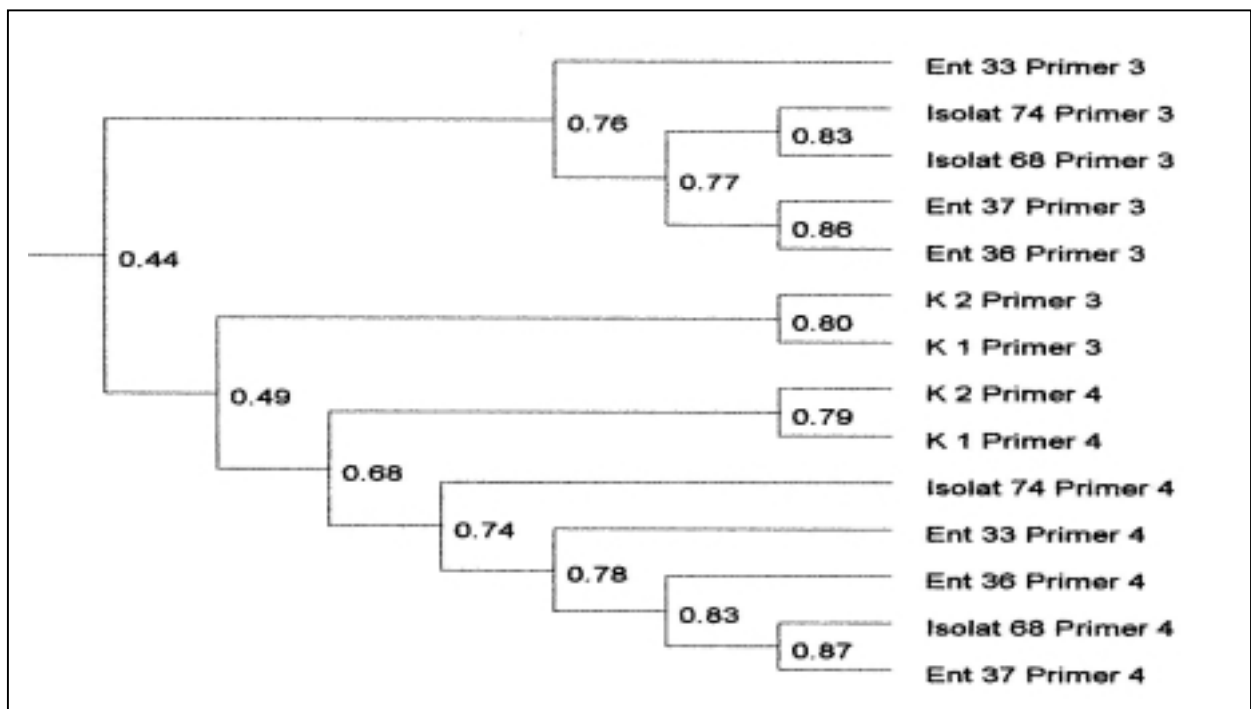
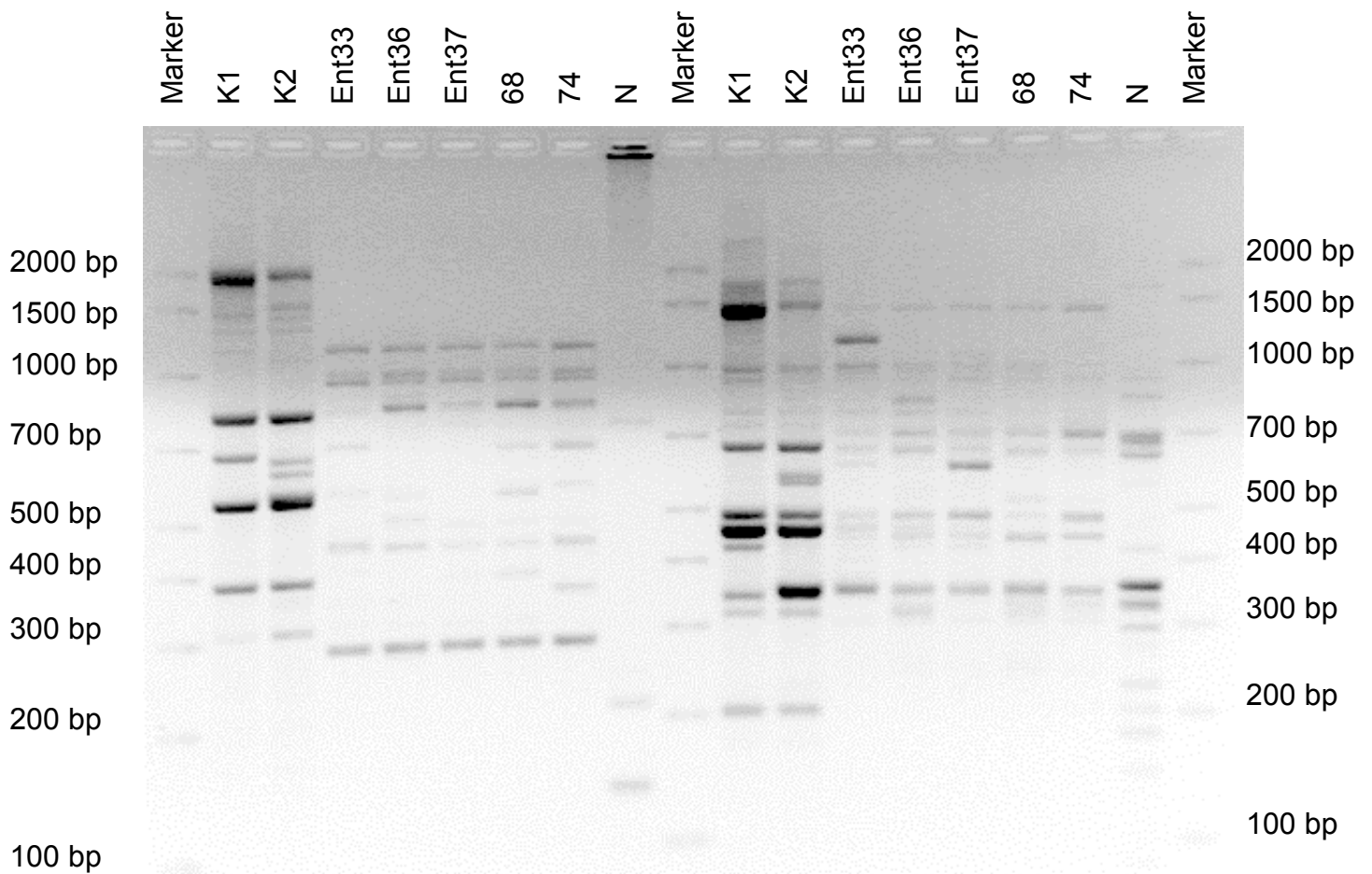


Abbildung 3 Bandenmuster nach RAPD-PCR mit den Primern 5 und 6 der Isolate „68“ und „74“ im Vergleich zu den eingesetzten Referenzstämmen sowie das daraus errechnete Dendrogramm zur Darstellung des Verwandtschaftsgrades

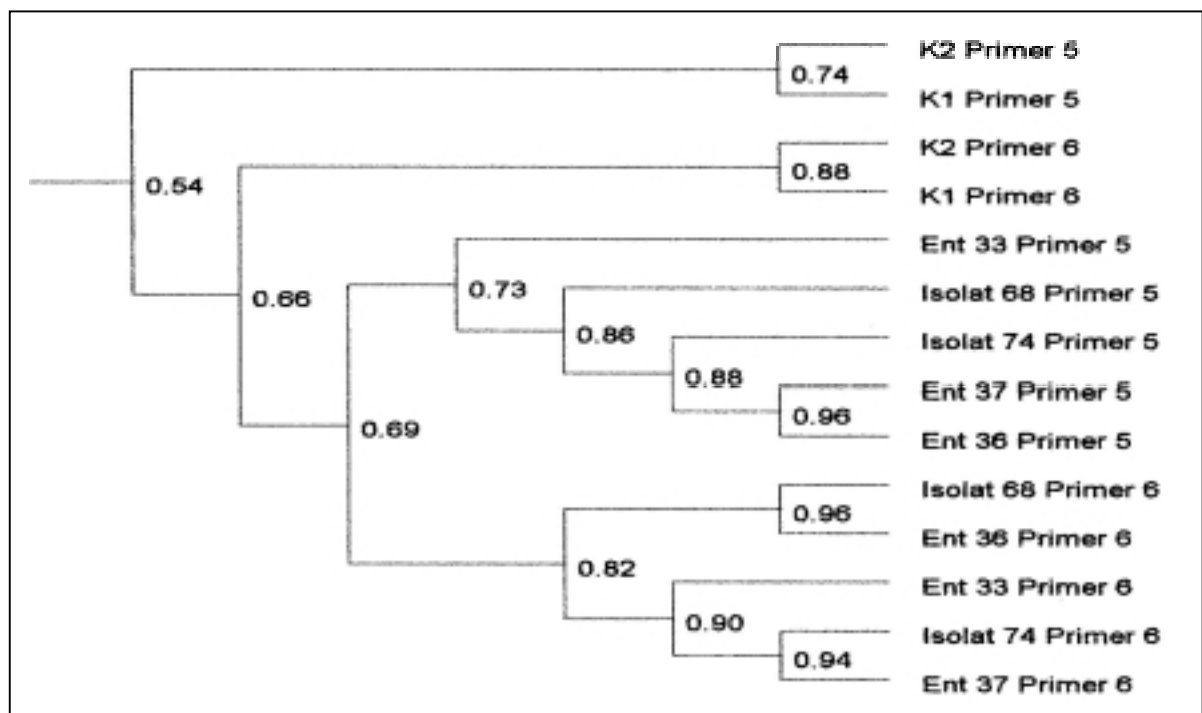
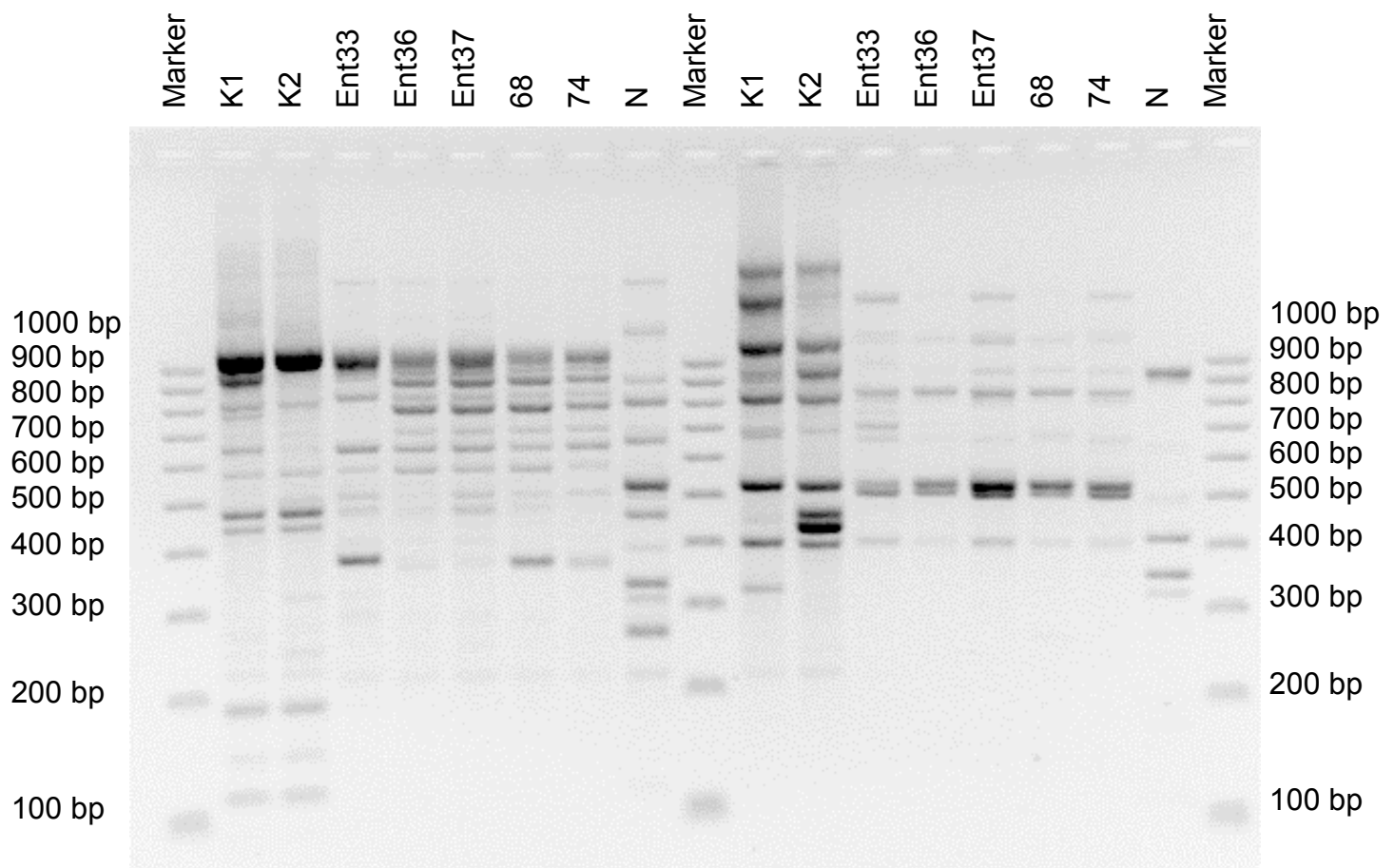


Tabelle 1: Größe (in kbp) und Übereinstimmung der nach Makrorestriktionsanalyse mit *Xba*I erhaltenen Fragmente der Isolate „68“ und „74“ sowie der Vergleichsstämme *E. coli* E35211 und DSM8579 und deren Zuordnung zu einem Fragmenttyp

Fragment- typ	Größe der Fragmente je Stamm in kbp				prozentuale Toleranz*	
	E32511	DSM8579	Isolat 68	Isolat 74	+ 4 %	- 4 %
1		1.011,4	979,5	1013,5	1.041,6	961,4
2				914,4	951,0	877,8
3	842,8				876,5	809,0
4		795,9	793,3		826,4	762,8
5	748,6	750,5	743,3	739,3	775,3	715,6
6			701,0		729,0	672,9
7	660,6	652,7	654,3	654,3	681,7	629,2
8		624,6			649,6	599,6
9	602,4	604,3	592,4	592,4	621,8	574,0
10	570,7		563,9	563,9	588,8	543,5
11	552,3	542,9	542,0	542,0	566,6	523,0
12	534,5		529,6	525,7	551,2	508,8
13	514,8	514,8	508,7	508,7	532,2	491,3
14		494,7			514,5	474,9
15	478,0	481,4		471,1	495,9	457,7
16	451,2	460,1	466,0	462,6	478,4	441,6
17			444,5	442,9	461,4	425,9
18			430,3		447,5	413,1
19	422,5	420,7	415,2	415,2	435,2	401,7
20	405,0	396,7		395,0	414,8	382,9
21	371,4	379,2	383,5	383,5	394,6	364,2
22	363,2	365,0	365,8	364,4	379,2	350,0
23	355,2		354,5	353,1	368,4	340,1
24	342,2		346,2	347,6	359,2	331,5
25				336,8	350,3	323,4
26	327,3	317,0	323,9	322,6	335,6	309,8
27		305,0			317,2	292,8
28		297,3			309,2	285,4
29		275,2			286,3	264,2

* Berechnung aufgrund des Mittelwertes der Größen der Fragmente eines Fragmenttyps

9 LITERATURVERZEICHNIS

ABDULMAWJOOD, A. und BÜLTE, M. (2000)

Optimization of the polymerase chain reaction (PCR) for the detection of verocytotoxin type 2d

Proc. 41. Arbeitstagung Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft e.V., Arbeitsgebiet Lebensmittelhygiene, Garmisch-Partenkirchen 25.-28.09.2000

ACHESON, D.W.K. (1996)

Nomenclature of enterotoxins

Lancet 351, 1003

ACHESON, D.W.K., KEUSCH, G.T., LIGHTOWLERS, M., DONOHUE-ROLFE, A. (1990)

Enzyme-linked immunosorbent assay for shiga toxin and shiga-like toxin II using P1 glycoprotein from hydatid cysts

J. Infect. Dis. 161, 134-137

ACHESON, D.W.K., LINICOME, L.L., BREUCKER, S.E., KEUSCH, G.T. (1996)

Detection of shiga-like toxin-Producing *Escherichia coli* in ground beef and milk by commercial enzyme immunoassay.

J. Food Prot. 59, 334-349

AHMED, R., BOPP, C., BORCZYK, A., KASATIYA, S. (1987)

Phage-typing scheme for *Escherichia coli* O157:H7

J. Infect. Dis. 155 (4), 806-809

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-negative bacteria

Zbl. Bakt. 276, 221-230

AL-JUMAILI, I., BURKE, D.A., SCOTLAND, S.M., AL-MARDINI, H., RECORD, C.O. (1992)

A method of enhancing verocytotoxin production by *Escherichia coli*

FEMS Microbiol. Lett. 93, 121-126

AMMON, A., PETERSEN, L.R., KARCH, H. (1999)

A large outbreak of hemolytic uremic syndrome caused by a unusual sorbitol-fermenting strain of *Escherichia coli* O157:H⁻

J. Infect. Dis. 179, 1274-1277

ANONYMUS (1996a)

Übersicht: Die Pathovaren von *Escherichia coli* beim Menschen.

Epidemiologisches Bulletin 30/96

ANONYMUS (1996b)

Häufung von EHEC-Erkrankungen in Bayern

Epidemiologisches Bulletin 20/96

- ANONYMUS (1996c)
Zur Situation bei ausgewählten meldepflichtigen Infektionskrankheiten im Jahr 1996
Teil 1: Darminfektionen (Gastroenteritiden)
Epidemiologisches Bulletin 8/96
- ANONYMUS (1998)
Zur Situation bei ausgewählten meldepflichtigen Infektionskrankheiten im Jahr 1997
Teil 1: Gastroenteritiden (II) – übrige Formen der Enteritis infectiosa
Epidemiologisches Bulletin 9/98
- ANONYMUS (1999a)
Zur Situation bei ausgewählten meldepflichtigen Infektionskrankheiten im Jahr 1998
Teil 1: Darminfektionen (Gastroenteritiden)
Epidemiologisches Bulletin 15/99
- ANONYMUS (1999b)
Ratgeber Infektionskrankheiten 6. Folge: Infektionen durch Enterohämorrhagische
Escherichia coli (EHEC)
Epidemiologisches Bulletin 31/99
- ANONYMUS (1999c)
Escherichia coli: Ursprung war Ziegenmilch
Food & Hygiene 3, 6
- ANONYMUS (2000)
Wichtige Infektionskrankheiten in Deutschland – zur Situation im Jahr 1999
Teil 1: Darminfektionen (Gastroenteritiden)
Epidemiologisches Bulletin 23/2000
- ARMSTRONG, G.L., HOLLINGSWORTH, J., MORRIS, J.G. (1996)
Emerging foodborne pathogens: *Escherichia coli* O157:H7 as a model of entry of a
new pathogen into the food supply of the developed world
Epidemiol. Rev. 18 (1), 29-51
- ASHKENAZIE, S. und CLEARY, T.G. (1989)
Rapid method to detect shiga toxin and shiga-like toxin I based on binding to
globotriaosyl ceramide (GB3), their natural receptor
J. Clin. Microbiol. 27 (6), 1145-1150
- AURELI, P., CONSTANTINI, A., FENICIA, L., GIANFRANCESCHI, M., RAINALDI, L.
(1992)
Occurrence of pathogenic *Escherichia coli* in available Italian soft cheeses
Arch. Lebensmittelhyg. 43, 17-19
- BALL, H.J., FINLAY, D., BURNS, L., MACKIE, D.P. (1994)
Application of monoclonal antibody-based sandwich ELISAs to detect verotoxins in
cattle faeces
Res. Vet. Sci. 57, 225-232

- BALL, H.J., FINLAY, D., ZAFAR, A., WILSON, T. (1996)
The detection of verocytotoxins in bacterial cultures from human diarrhoeal samples with monoclonal antibody-based ELISAs
J. Med. Microbiol. 44, 273-276
- BANATVALA, N., MAGNANO, A.R., CARTTER, M.L., BARRETT, T.J., BIBB, W.F., VASLIE, L.L., MSHAR, P., LAMBERT-FAIR, M.A., GREEN, J.H., BEAN, N.H., TAUXE, R.V. (1995)
Meat grinders and molecular epidemiology: Two supermarket outbreaks of *Escherichia coli* O157:H7 infection
J. Infect. Dis. 173, 480-483
- BANATVALA, N., DEBEUKELAER, M.M., GRIFFIN, P.M., BARRETT, T.J., GREENE, K.D., GREEN, J.H., WELLS, J.G. (1996)
Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* O111 and associated hemolytic-uremic syndrome: a family outbreak
Pediatr. Infect. Dis. J. 15 (11), 1008-1011
- BARRETT, T.J., LIOR, H., GREEN, J.H., KHAKHRIA, R., WELLS, J.G., BELL, B.P., GREENE, K.D., LEWIS, J., GRIFFIN, P.M. (1994)
Laboratory investigation of a multistate food-borne outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 by using pulsed-field gel electrophoresis and phage typing
J. Clin. Microbiol. 32, 3013-3017
- BASTA, M., KARMALI, M.A., LINGWOOD, C. (1989)
Sensitive receptor-specified enzyme-linked immunosorbent assay for *Escherichia coli* verocytotoxin
J. Clin. Microbiol. 27 (7), 1617-1622
- BAUMGARTNER, A. und GRAND, M. (1995)
Detection of verotoxin-producing *Escherichia coli* in minced beef and raw hamburgers: comparison of polymerase chain reaction (PCR) and immunomagnetic beads
Arch. Lebensmittelhyg. 46 (6), 125-130
- BEEBAKHEE, G., LOUIE, M., DE AZAVEDO, J., BRUNTON, J. (1992)
Cloning and nucleotide sequence of the eae gene homologue from enterohemorrhagic *Escherichia coli* serotype O157:H7.
FEMS Microbiol. Lett. Feb 1 70 (1), 63-8
- BENDER, J.B., HEDBERG, C.W., BESSER, J.M., BOXRUD, D.J., MacDONALD, K.L., OSTERHOLM, M.T.. (1997)
Surveillance by molecular subtype for *Escherichia coli* O157:H7 infections in Minnesota by molecular subtyping.
N. Engl. J. Med. 337(6), 388-94.
- BENNETT, A.R., MACPHEE, S., BETTS, R.P. (1996a)
Evaluation of methods for the isolation and detection of *Escherichia coli* O157 in minced beef
Lett. Appl. Microbiol. 20, 375-379

- BENNETT, A.R., MACPHEE, S., BETTS, R.P. (1996b)
The isolation and detection of *Escherichia coli* O157 by use of the immunomagnetic separation and immunoassay procedures
Lett. Appl. Microbiol. 22, 237-243
- BESSER, R.E., LETT, S.M., DOYLE, M.P., BARRETT, T J., WELLS, J. G., GRIFFIN, P. M. (1993)
An outbreak of diarrhea and hemolytic uremic syndrome from *Escherichia coli* O157:H7 in freshpressed apple cider
J. Am. Med. Assoc. 269 (17), 2217-2220
- BETTELHEIM, K.A. (1998)
Reliability of CHROMagar O157 for the detection of enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) O157 but not EHEC belonging to other serogroups
J. Appl. Microbiol. 85, 425-428
- BETTELHEIM, K.A., EVANGELIDIS, H., PEARCE, J.L., SOWERS, E., STROCKBINE, N.A. (1993)
Isolation of a *Citrobacter freundii* strain which carries the *Escherichia coli* O157 antigen
J. Clin. Microbiol. 31 (3), 760-761
- BEUTIN, L. (1995)
Zur Epidemiologie von Infektionen durch enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC) in der Bundesrepublik Deutschland -Mikrobiologisch nachgewiesene Fälle von Infektionen durch EHEC bei Menschen in den Jahren 1993 und 1994
Bundesgesundhbl. 38, 428-429
- BEUTIN, L., MONTENEGRO, M.A., ORSKOV, I., ORSKOV, F., PRADA, J., ZIMMERMANN, S., STEPHAN, R. (1989)
Close association of verotoxin (shiga-like toxin) production with enterohemolysin production in strains of *Escherichia coli*
J. Clin. Microbiol. 27 (11), 2559-2564
- BEUTIN, L., STROEHER, U.H., MANNING, P.A. (1993)
Isolation of enterohemolysin (Ehly2)-associated sequences encoded on temperate phages of *Escherichia coli*
Gene 132, 95-99
- BEUTIN, L., GLEIER, K., ZIMMERMANN, S., GEIER, D. (1994a)
Zur Identifizierung von Verotoxin-bildenden (VTEC) und enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC) auf Indikatornährböden
Klin. Lab. 40, 193-201
- BEUTIN, L., ALEKSIC, S., BOCKEMÜHL, J., SCHWARZKOPF, A., KARCH, H. (1994b)
Zur Epidemiologie von Infektionen durch enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC) in der Bundesrepublik Deutschland im Jahr 1993
Bundesgesundhbl. 37, 410-414

- BEUTIN, L., GEIER, D., ZIMMERMANN, S., KARCH, H. (1995)
Virulence markers of shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* strains originating from healthy domestic animals of different species
J. Clin. Microbiol. 33, 631-635
- BEUTIN, L., ZIMMERMANN, S., GLEIER, K. (1996a)
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 (11), 2812-2814
- BEUTIN, L., ZIMMERMANN, S., GLEIER, K. (1996b)
Zur Epidemiologie und Diagnostik von Infektionen durch enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC) in der Bundesrepublik Deutschland - Mikrobiologisch nachgewiesene Fälle von Infektionen durch EHEC bei Menschen in den Jahren 1993-1995.
Bundesgesundhbl. 39, 326-331
- BEUTIN, L., GEIER, D., ZIMMERMANN, S., ALEKSIC, S., GILLEPSIE, H.A., WHITTAM, T.S. (1997)
Epidemiological releatness and clonal Types of natural populations of *Escherichia coli* strains producing shiga toxins in sepearate populations of cattle and sheep.
Appl. Environ. Microbiol. 63, 2175-2180
- BIRCH, M., DENNING, D.W., LAW, D. (1996)
Rapid genotyping of *Escherichia coli* O157 isolates by random amplification of polymorphic DNA
Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 15 (4), 297-302
- BLACKBURN, C. de W., MCCARTHY, J.D. (2000)
Mini-Review: Modifications to methods for the enumeration and detection of injured *Escherichia coli* O157:H7 in foods
Int. J. Food Microbiol. 55, 285-290
- BLAIS, B.W., BOOTH, R.A., PHILLIPPE, L.M., YAMAZAKI, H. (1997)
Effect of temperature and agitation on enrichment of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef using modified EC broth with novobiocin
Int. J. Food Microbiol. 36, 221-225
- BLANCO, J., GONZALEZ, E.A., BERNARD, Z.I., REGUEIRO, B. (1983)
Differentiated biological activity of Vero cytotoxins (VT) released by human and porcine *Escherichia coli* strains
FEMS Microbiol. Lett. 20, 167-170
- 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 (verotoxin)-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. 39, 290-296
- BOCKEMÜHL, J., KARCH, H., TSCHÄPE, H. (1997)
Infektionen des Menschen durch enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC) in Deutschland, 1996
Bundesgesundhbl. 40, 194-197
- BOCKEMÜHL, J., KARCH, H., TSCHÄPE, H. (1998)
Zur Situation der Infektionen des Menschen durch enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC) in Deutschland 1997
Bundesgesundhbl. 41, 2-5
- BÖHM, H. und KARCH, H. (1992)
DNA fingerprinting of *Escherichia coli* O157:H7 strains by pulsed-field gel Electrophoresis
J. Clin. Microbiol. 30 (8), 2169-2172
- BOLTON, J.F., CROZIER, L., WILLIAMSON, J.K. (1995)
Optimisation of methods for the isolation of *Escherichia coli* O157 from beefburgers
PHLS Microbiol. Dig. 12 (2), 67-70
- BOLTON, F.J., CROZIER, L., WILLIAMSON, J.K. (1996)
Isolation of *Escherichia coli* O157 from raw meat products
Lett. Appl. Microbiol. 23, 317-321
- BORCZYK, A.A., LIOR, H., CIEBIN, B. (1987)
False positive identifications of *Escherichia coli* O157 in foods
Int. J. Food Microbiol. 4, 347-349
- 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 Jun 36(6),1777-80
- BRIAN, M.J., FROSOLONO, M., MURRAY, B.E., MIRANDA, A., LOPEZ, E.L., GOMEZ, H.F., CLEARY, T.G. (1992)
Polymerase chain reaction for diagnosis of enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection and hemolytic-uremic syndrome
J. Clin. Microbiol. 30 (7), 1801-1806

- BRÜCKLER, J., BLOBEL, H., PREISSNER, K. (1991)
Serologische Methoden
In: BLOBEL, H. und SCHLIEßER, T.: Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren Band 1, Gustav Fischer Verlag Jena
- BRUNDER, W., SCHMIDT, H., KARCH, H. (1996)
KatP, a novel catalase-peroxidase encoded by the large plasmid of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7
Microbiology 142, 3305-3315
- 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 (4), 767-778
- BÜLTE, M. (1991)
Dot Blot-Verfahren mit Digoxenin-markierten Gensonden zum Nachweis von verotoxinogenen *E. coli*-Stämmen (VTEC) in Verdünnungskulturen und Lebensmittelproben
Arch. Lebensmittelhyg. 42 (4), 83-86
- BÜLTE, M. (1995)
Enterohämorrhagische *E. coli*-Stämme (EHEC) - Aktuell in der Bundesrepublik Deutschland ? 1. Pathogenitätspotential von EHEC-Stämmen - Bedeutung als Lebensmittelinfektionserreger
Fleischwirtschaft 75, 1430-1432
- 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. und HECKÖTTER, S. (1997)
Vorkommen und Bedeutung von O157 und anderen verotoxinbildenden *E. coli* bei Tieren und in Lebensmitteln
Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. 88, 665-680
- BÜLTE, M. und HECKÖTTER, S. (1999)
Neue Erkenntnisse zum Virulenzspektrum bei Verotoxin-bildenden *E. coli*-Stämmen (VTEC)
Proc. 40. Arbeitstagung Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft e.V., Arbeitsgebiet Lebensmittelhygiene, Garmisch-Partenkirchen 29.09.-01.10.1999
- BÜLTE, M. und REUTER, G. (1989)
Glucuronidase-Nachweis und Indol-Kapillartest als zuverlässiges Schnellidentifizierungsverfahren 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-Koloniehybridsierungsverfahren
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 103, 380-384
- BÜLTE, M., HECKÖTTER, S., SCHWENK, P. (1996)
Enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC) - aktuelle Lebensmittelinfektionserreger auch in der Bundesrepublik Deutschland ? 2. Nachweis von VTEC-Stämmen in Lebensmitteln tierischen Ursprungs
Fleischwirtschaft 76, 88-91
- 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
- BÜRK, C., BRAUMILLER, I., BECKER, H., MÄRTLBAUER, E. (1999)
Nachweis von Shiga Toxinen mit dem 5'-Nuklease-Fluoreszenztest
Proc. 40. Arbeitstagung Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft e.V., Arbeitsgebiet Lebensmittelhygiene, Garmisch-Partenkirchen 29.09.-01.10.1999
- CALDERWOOD, S.B., AUCLAIR, F., DONOHUE-ROLFE, A., KEUSCH, G.T., MEKALANOS, J.J. (1987)
Nucleotide sequence of the shiga-like toxin genes of *Escherichia coli*
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 (7), 4364-4368
- CALDERWOOD, S.B. UND MEKALANOS, J.J. (1987)
Iron Regulation of shiga-like toxin expression in *Escherichia coli* is mediated by the *fur* locus
J. Bacteriol. 169 (10), 4759-4764
- CALDERWOOD, S.B., ACHESON, D.W.K., KEUSCH, G.T., BARRETT, T.J., GRIFFIN, P.M., STROCKBINE, N.A., SWAMINATHAN, B., 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. (1996)
Proposed new nomenclature for SLT (VT) family
ASM News 62 (3), 118-119
- CALICIOGLU, M., FAITH, N.G., BUEGE, D.R., LUCHANSKY, J.B. (2001)
Validation of a manufacturing process for fermented, semidry Turkish soudjouk to control *Escherichia coli* O157:H7.
J. Food. Prot. 64 (8) 1156-1161
- CAPRIOLI, A. und TOZZI, A.E. (1998)
Epidemiology of shiga toxin-producing *Escherichia coli* Infections in continental Europe
In: KAPER, J.B., O'BRIEN, A.D.: *Escherichia coli* O157:H7 and other shiga toxin-producing *E. coli* strains, ASM Press, Washington D.C.

- CARTER, A.O., BORCZYK, A.A., CARLSON, J.A.K., HARVEY, B., HOCKIN, J.C., KARMALI, M.A., KRISHNAN, C., KORN, D.A., LIOR, H.(1987)
A severe outbreak of *Escherichia coli* O157:H7-associated hemorrhagic colitis in a nursing home
New. Engl. J. Med. 317 (24), 1496-1500
- CEBULA, T.A., PAYNE, W.L., FENG, P. (1995)
Simultaneous identification of strains of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and their shiga-like toxin type by mismatch amplification mutation assay-multiplex PCR
J. Clin. Microbiol. 33 (1), 248-250
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (1993)
UPDATE: Multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections from hamburgers - Western United States, 1992-1993
Morb. Mort. Weekl. Rep. 42, 258-263
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (1994)
Escherichia coli O157:H7 outbreak linked to home-cooked hamburger - California, July 1993
Morb. Mort. Weekl. Rep. 43, 213-216
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (1995)
Escherichia coli O157:H7 outbreak linked to commercially distributed dry-cured salami - Washington and California, 1994
Morb. Mort. Weekl. Rep. 44 (9), 157-160
- CHAPMAN, P.A. (1989)
Evaluation of a commercial latex slide test for identifying *Escherichia coli* O157
J. Clin. Pathol. 42, 1109-1110
- CHAPMAN, P.A. (1994)
Isolation, identification and typing of Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* O157
PHLS Microbiol. Dig. 11 (1), 13-17
- CHAPMAN, P.A. und SIDDONS, C.A. (1996)
Evaluation of a commercial enzyme immunoassay (EHEC-Tek) for detecting *Escherichia coli* O157 in beef and beef products
Food Microbiol. 13, 175-182
- CHAPMAN, P.A., SIDDONS, C.A., ZADIK, P.M., JEWES, L. (1991)
An improved selective medium for the isolation of *Escherichia coli* O157
J. Med. Microbiol. 35, 107-110
- CHAPMAN, P.A., SIDDONS, C.A., WRIGHT, D.J., NORMAN, P., FOX, J., CRICK, E. (1993)
Cattle as a possible source of verotoxin-producing *Escherichia coli* O157 infections in man
Epidem. Infect. 111, 439-447

- CHAPMAN, P.A., WRIGHT, D.J., SIDDONS, C.A. (1994)
A comparison of immunomagnetic separation and direct culture for the isolation of verotoxin-producing *Escherichia coli* O157 from bovine faeces
J. Med. Microbiol. 40, 424-427
- CHAPMAN, P.A. und SIDDONS, C.A. (1996)
A comparison of immunomagnetic separation and direct culture for the isolation of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 from cases of bloody diarrhoea, non bloody diarrhoea and asymptomatic contacts
J. Med. Microbiol. 44, 267-271
- CHAPMAN, P.A., CERDAN MALO, A.T., SIDDONS, C.A., HARKIN, M. (1997)
Use of commercial enzyme immunoassays and Immunomagnetic separation systems for detecting *Escherichia coli* O157 in bovine fecal samples
Appl. Environ. Microbiol. 63, 2549-2553
- CHAPMAN, P.A., CERDÁN MALO, A. T., ELLIN, M., ASHTON, R., HARKIN, M. A. (2001)
Escherichia coli O157 in cattle and sheep at slaughter, on beef and lamb carcasses and in raw beef and lamb products in South Yorkshire, UK
Int. J. Food Microbiol. 64, 139-150
- CHEN, J., JOHNSON, R., GRIFFITHS, M. (1998)
Detection of verotoxigenic *Escherichia coli* by magnetic capture-hybridisation PCR
Appl. Environ. Microbiol. 64 (1), 147-152
- CIESLAK, P.R., BARRETT, T.J., GRIFFIN, P.M., GENSHEIMER, K.F., BECKETT, G., BUFFINGTON, J., SMITH, M.G. (1993)
Escherichia coli O157:H7 infection from a manured garden
Lancet 342 (8), 367
- 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 (9), 3268-3273
- CLAVERO, M.R.S. und BEUCHAT, L. (1996)
Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in broth and processed salami as influenced by pH, water activity and temperature and suitability of media for its recovery
Appl. Environ. Microbiol. 62 (8), 2735-2740
- CUDJOE, K.S., PATEL, P.D., OLSEN, E., SKJERVE, E., OLSVIK, O. (1993)
Immunomagnetic separation techniques for the detection of pathogenic bacteria in foods
New Techniques in Food and Beverage Microbiology 2, 17-29
- DATZ, M., JANETZKI-MITTMANN, C., FRANKE, S., GUNZER, 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 (3), 791-797

- DEV, V.J., MAIN, M., GOULD, I. (1991)
Waterborne outbreak of *Escherichia coli* O157
Lancet 337 (6), 1412
- DONOHUE-ROLFE, A., KEUSCH, G.T., EDSON, C., THORLEY-LAWSON, D., JACEWITZ, M. (1984)
Simplified high yield purification of *Shigella* toxin and characterization of subunit-specific monoclonal and polyclonal antibodies
J. Exp. Med. 160, 1767-1781
- DONOHUE-ROLFE, A., ACHESON, D.W.K., KANE, A.V., KEUSCH, G.T. (1989)
Purification of shiga toxin and shiga-like toxins I and II by receptor analog affinity chromatography with Immobilized P1 glycoprotein and production of cross-reactive monoclonal antibodies
Infect. Immun. 57 (12), 3888-3893
- DOWNES, F.P., BARRETT, T.J., GREEN, J.H., ALOISIO, C.H., SPIKA, J.S., STROCKBINE, N.A., WACHSMUTH, I.K. (1988)
Affinity purification and characterization of shiga-like toxin II and production of toxin-specific monoclonal antibodies
Infect. Immun. 56 (8), 1926-1933
- DOWNES, F.P., GREEN, J.H., GREENE, K., STROCKBINE, N., WELLS, J.G., WACHSMUTH, I.K. (1989)
Development and evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays for detection of shiga-like toxin I and shiga-like toxin II
J. Clin. Microbiol. 27 (6), 1292-1297
- 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
- DYLLA, B.M., VETTER, E.A., HUGHES, J.G., COCKERILL III, F.R. (1995)
Evaluation of an immunoassay for direct detection of *Escherichia coli* O157 in stool specimens
J. Clin. Microbiol. 33, 222-224
- FENG, P.C.S. und HARTMAN, P.A. (1982)
Fluorogenic assays for immediate confirmation of *Escherichia coli*
Appl. Environ. Microbiol. 43 (6), 1320-1329
- FRATAMICO, P.M., SCHULTZ, R.L., BUCHANAN, R.L. (1992)
Rapid isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from enrichment cultures of foods using an immunomagnetic separation method
Food Microbiol. 9, 105-113
- FRATAMICO, P.M., SACKITEY, S.K., WIEDMANN, M., DENG, M.Y. (1995)
Detection of *Escherichia coli* O157:H7 by multiplex PCR
J. Clin. Microbiol. 33 (8), 2188-2191

- FROST, J.A., SMITH, H.R., WILLSHAW, G.A., SCOTLAND, S.M., GROSS, R.J., ROWE, B. (1989)
Phage-typing of verocytotoxin (VT) producing *Escherichia coli* O157 isolated in the United Kingdom
Epidem. Infect. 103, 73-81
- FROST, J.A., CHEASTY, T., THOMAS, A., ROWE, B. (1993)
Phage-typing of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 isolated in the United Kingdom:1989-1991
Epidem. Infect. 110, 469-475
- FUJISAWA, T., SATA, S., AIKAWA, K., TAKAHASHI, T., YAMAI, S., SHIMADA, T. (2000)
Modification of sorbitol MacConkey medium containing Cefixime and Tellurite for isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from radish sprouts
Appl. Environ. Microbiol. 66 (7), 3117-3118
- FUKUSHIMA, H. und GOMYODA, M. (1999)
Hydrochloric acid treatment for rapid recovery of shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26, O111 and O157 from faeces, food and environmental samples
Zbl. Bakt. 289, 285-299
- GALLIEN, P., KLIE, H., LEHMANN, S., PROTZ, D., HELMUTH, R., (1994)
Nachweis verotoxinbildender *E. coli* in Feldisolaten von Haus- und landwirtschaftlichen Nutztieren in Sachsen-Anhalt
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 107, 331-334
- GALLIEN, P., KLIE, H., PERLBERG, K.-W., PROTZ, D. (1996)
Einsatz von Nylonmembranen zur gezielten Isolierung und Charakterisierung Verotoxin-bildender *Escherichia coli* mittels DNA-Sonden
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 109, 431-433
- GALLIEN, P., RICHTER, H., KLIE, H., TIMM, M., KARCH, H., PERLBERG, K.-W., (1997a)
Detection of STEC and epidemiological investigations in surrounding of a HUS patient
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 110, 342-346
- GALLIEN, P., KLIE, H., RICHTER, H., PERLBERG, K.-W., PROTZ, D. (1997b)
Genotypischer Nachweis von verotoxin-bildenden Krankheitserregern in Kot- und Milchproben von Rindern mittels PCR
Boehringer Mannheim PCR-Bibliographie, 71-73
- 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. 41, 26-30

- GALLIEN, P., RICHTER, H., KLIE, H., TIMM, M., PERLBERG, K.-W. (1999a)
Nachweis von STEC (VTEC) in Lebensmitteln und Charakterisierung entsprechender Isolate
Bundesgesundhbl. 42, 239-240
- GALLIEN, P., MUCH, C., PERLBERG, K.W., PROTZ, D. (1999b)
Subtypisierung von stx-Genen in Shigatoxin-produzierenden *Escherichia coli* (STEC)
Fleischwirtschaft 79 (6), 99-103
- GALLIEN, P., MUCH, C., MÜLLER, M., PERLBERG, K.-W., PROTZ, D. (2000a)
Kontrollmöglichkeiten für Screeningtests zum Nachweis von Shigatoxin-produzierenden *Escherichia coli* (STEC) mittels PCR
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 113 (7/8), 271-275
- GALLIEN, P., KARCH, H., MUCH, C., STEINRÜCK, H., LEHMANN, S., TIMM, M., RICHTER, H., PERLBERG, K.-W., PROTZ, D. (2000b)
Subtypisierung von eae-Genen in Shigatoxin-produzierenden *Escherichia coli* (STEC)
Fleischwirtsch. 80 (2), 84-89
- GANNON, V.P.J., 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. Gener. Microbiol. 136, 1125-1135
- GANNON, V.P.J., KING, R.K., KIM, J.K., THOMAS, F.J. (1992)
Rapid and sensitive method for detection of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* in ground beef using the polymerase chain reaction
Appl. Environ. Microbiol. 58 (12), 3809-3815
- GAREIS, M., PICHNER, R., BREY, N., STEINRÜCK, H. (2000)
Nachweis Verotoxin-bildender *E. coli* (VTEC) bei gesunden Mitarbeitern eines Fleisch verarbeitenden Betriebes
Bundesgesundhbl 43 (10), 781-787
- GASSER, C., GAUTIER, E., STECK, A., SIEBENMANN, R.E., OECHSLIN, R. (1955)
Hämolytisch-urämische Syndrome: bilaterale Nierenrinden-Nekrosen bei akuten erworbenen Hämolytischen Anämien
Schweiz. Med. Wochenschr. 85, 905-909
- GERRITZEN, A., CORNELLY, C., HÖVENER, B., BEUTIN, L. (1996)
EHEC-Diagnostik per ELISA ?
Proc. 48. Jahrestagung Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie
08.-11. 10. 1996 in Bonn
- GERRITZEN, A., HÖVENER, B., CORNELLY, C. (1998)
Flüssige Vorkultur von Stuhlproben verbessert den EHEC-Toxinnachweis mit ELISA und Zytotoxizitätstest
J. Lab. Med. 22 (2), 097-101

- GLASS, K.A., LOEFFELHOLZ, J.M., FORD, J.P., DOYLE, M.P. (1992)
Fate of *Escherichia coli* O157:H7 as Affected by pH or Sodium Chloride and in Fermented, Dry Sausage
Appl. Environ. Microbiol. 58, 2513-2516
- GRIFFIN, P.M. (1998)
Epidemiology of shiga toxin-producing *Escherichia coli* Infections in humans in the United States
In: KAPER, J.B., O'BRIEN, A.D.: *Escherichia coli* O157:H7 and Other Shiga Toxin-Producing *E. coli* Strains, ASM Press, Washington D.C.
- 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 hemolytic uremic syndrome.
Epidemiol. Rev. 13, 60-98
- GRIMONT, P.A.D. (1999)
Bacteriology-Taxonomy and Classification of Bacteria
In: MURRAY, P.R., FORBES, B.A.: Manual of Clinical Microbiology 7th Ed., ASM Press, Washington D.C.
- GUNZER, F., BÖHM, H., RUSSMANN, H., BITZAN, M., ALEKSIC, S., KARCH, H. (1992)
Molecular detection of sorbitol fermenting *Escherichia coli* O157 in patients with hemolytic uremic syndrome
J. Clin. Microbiol. 30 (7), 1807-1810
- HALDANE, D.J.M., DAMM, M.A.S., ANDERSON, J.D. (1986)
Improved biochemical screening procedure for small clinical laboratories for vero (shiga-like)-toxin-producing strains of *Escherichia coli* O157:H7
J. Clin. Microbiol. 24 (4), 652-653
- HARRIS, A.A., KAPLAN, L.J., GOODMAN, L.J., DOYLE, M., LANDAU, W., SEGRET, J., MAYER, K., LEVIN, S. (1985)
Results of a screening method used in a 12-month stool survey for *Escherichia coli* O157:H7
J. Infect. Dis. 152 (4), 775-777
- HARSONO, K.D., KASPAR, C.W., LUCHANSKY, J.B. (1993)
Comparison and genomic sizing of *Escherichia coli* O157:H7 isolates by pulsed-field gel electrophoresis
Appl. Environ. Microbiol. 59 (9), 3141-3144
- HARTUNG, M. (1998)
Meldungen der Länder über *E. coli* VTEC für den Deutschen Trendbericht über Zoonosen von 1997
Bundesgesundhbl. 41, 40-44

HAYES, P.S., BLOM, K., FENG, P., LEWIS, J., STROCKBINE, N.A., SWAMINTHAN, B. (1995)

Isolation and characterisation of a β -D-glucuronidase-producing strain of *Escherichia coli* serotype O157:H7 in the United States
J. Clin. Microbiol. 33 (12), 3347-3348

HECKELMANN, H. (1985)

Mikrobiell verursachte Fehlfabrikate bei Rohwurst und Rohschinken
In: Mikrobiologie und Qualität von Rohwurst und Rohschinken, Bundesanstalt für Fleischforschung, Kulmbacher Reihe Band 5, S. 103-127

HECKÖTTER, S. (1999)

Vergleichende Untersuchungen zum Nachweis von *E. coli* O157:H7-Stämmen aus künstlich kontaminiertem Rinderhackfleisch unter besonderer Berücksichtigung der immunomagnetischen Separation
Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades beim Fachbereich Veterinärmedizin, der Justus-Liebig-Universität Gießen

HECKÖTTER, S. UND BÜLTE, M. (1998)

Aspekte des VTEC-Nachweises unter Routinebedingungen sowie lebensmittelrechtliche Beurteilung
Proc. 39. Arbeitstagung Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft e.V., Arbeitsgebiet Lebensmittelhygiene, Garmisch-Partenkirchen 21.-25.09.1998

HECKÖTTER, S., SCHUY, C., BÜLTE, M. (1996)

Immunomagnetische Separation von *E. coli* O157-Stämmen aus Lebensmitteln
Proc. 48. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie 08.-11. 10. 1996 in Bonn

HECKÖTTER, S., BÜLTE, M., LÜCKER, E. (1997a)

Detection of *Escherichia coli* serogroup O157 in foods by immunomagnetic separation (IMS). 1st communication: Recovery trials in model experiments
Arch. Lebensmittelhyg. 48, 85-87

HECKÖTTER, S., BÜLTE, M., LÜCKER, E. (1997b)

Detection of *Escherichia coli* serogroup O157 in foods by immunomagnetic separation (IMS). 2nd communication: Suitability of immunomagnetic separation for the detection of *E. coli* O157 in frozen food
Arch. Lebensmittelhyg. 49, 27-29

HEUVELINK, A.E., VAN DE KAR, N.C.A.J., MEIS, J.F.G.M., MONNENS, L.A.H., MELCHERS, W.J.G. (1995)

Characterization of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 isolates from patients with haemolytic uraemic syndrome in Western Europe
Epidemiol. Infect. 115, 1-14

HEUVELINK, A.E., WERNARS, K., DE BOER, E. (1996)

Occurrence of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 and other verocytotoxin-producing *E. coli* in retail raw meats in the Netherlands
J. Food Prot. 59 (12), 1267-1272

- HÖRZER, J. und AWAD-MASALMEH, M. (2000)
Vorkommen Shigatoxin-bildender *Escherichia coli* (STEC) bei verschiedenen Arten von Fleischfressern und Geflügel sowie einigen anderen Tierarten
Wien. Tierärztl. Wschr. 87, 154-158
- HU, Y., ZHANG, Q., MEITZLER, J.C. (1999)
Rapid and sensitive detection of *Escherichia coli* O157:H7 in bovine faeces by a multiplex PCR
J. Appl. Microbiol. 87, 867-876
- HULL, A., ACHESON, D.W.K., ECHEVERRIA, P., DONOHUE-ROLFE, A., (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
- IZUMIYA, H., TERAJIMA, J., WADA, A., INAGAKI, Y., ITOH, K.-I., TAMURA, K., WATANABE, H. (1997)
Molecular typing of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 isolates in Japan by using pulsed-field gel electrophoresis
J. Clin. Microbiol. 35 (7), 1675-1680
- JERSE, A.E., YU, J., TALL, B.D., KAPER, J.B. (1990)
A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 7839-7843
- JINNEMAN, K.C., TROST, P.A., HILL, W.E., WEAGANT, S.D., BRYANT, J.L., KAYSNER, C.A., WEKELL, M.M. (1995)
Comparison of template preparation methods from food for amplification of *Escherichia coli* O157 shiga-like toxins type I and II DNA by multiplex polymerase chain reaction
J. Food Prot. 58 (7), 722-726
- 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 diseases (VTe) by the polymerase chain reaction
J. Clin. Microbiol. 28 (10), 2351-2353
- JOHNSON, J.L., ROSE, B.E., SHARAR, A.K., RANSOM, G.M., LATTUADA, C.P., MCNAMARA, A.M. (1995a)
Methods used for detection and recovery of *Escherichia coli* O157:H7 associated with a foodborne disease outbreak
J. Food Prot. 58 (6), 597-603
- JOHNSON, R.P., DURHAM, R.J., JOHNSON, S.T., MACDONALD, L.A., JEFFREY, S.R., BUTMAN, B.T. (1995b)
Detection of *Escherichia coli* O157:H7 in meat by an enzyme-linked immunosorbent assay, EHEC-Tek
Appl. Environ. Microbiol. 61 (1), 386-388

- KANG, D.H. und FUNG, D.Y.C. (1999)
Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 by stimulated *Pediococcus acidilacti*
Lett. Appl. Microbiol. 29, 206-210
- KAPER, J.B., ELLIOTT, S., SPERANDIO, V., PERNA, N.T., MAYHEW, G.F., BLATTNER, F.R. (1998a)
Attaching-and-effacing intestinal histopathology and the locus of enterocyte effacement
In: KAPER, J.B., O'BRIEN, A.D.: *Escherichia coli* O157:H7 and other shiga toxin-producing *E. coli* strains, ASM Press, Washington D.C.
- KAPER, J.B., GANSHEROFF, L.J., WACHTEL, M.R., O'BRIEN, A.D. (1998b)
Intimin-mediated adherence of shiga toxin-producing *Escherichia coli* and attaching-and-effacing pathogens
In: KAPER, J.B., O'BRIEN, A.D.: *Escherichia coli* O157:H7 and other shiga toxin-producing *E. coli* Strains, ASM Press, Washington D.C.s
- KARCH, H. und MEYER, T. (1989a)
Evaluation of oligonucleotide probes for identification of shiga-like toxin-producing *Escherichia coli*
J. Clin. Microbiol. 27, 1180-1186
- 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., GORONCY-BERMES, P., OPFERKUCH, W., KROLL, H.-P., O'BRIEN, A. (1985)
Subinhibitory concentrations of antibiotics modulate amount of shiga-like toxin produced by *Escherichia coli*
In: The Influence of antibiotics on the host-parasite relationship II: D. Adam, H. Hahn, W. Opferkuch; Springer Verlag, Berlin-Heidelberg
- KARCH, H., STROCKBINE, N.A., O'BRIEN, A.D. (1986)
Growth of *Escherichia coli* in the presence of trimetoprim-sulfamethoxazole facilitates detection of Shiga-toxin producing strains by colony blot assay
FEMS Microbiol. Lett. 35, 141-145
- KARCH, H., HEESEMANN, J., LAUFS, R., O'BRIEN, A.D., TACKET, C.O., LEVINE, M.M. (1987)
A plasmid of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 is required for the expression of a new fimbrial antigen and the adhesion to epithelial cells
Infect. Immun. 55 (2), 455-461
- KARCH, H., WIß, R., GLONING, H., EMMRICH, P., ALEKSIC, S., BOCKEMÜHL, J. (1990)
Hämolytisch-urämisches Syndrom bei Kleinkindern durch Verotoxin-produzierende *Escherichia coli*
Dtsch. Med. Wschr. 115, 489-495

- KARCH, H., BÖHM, H., SCHMIDT, H., GUNZER, F., ALEKSIC, S., HEESEMANN, J. (1993)
Clonal structure and pathogenicity of shiga-like toxin-producing sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157:H-
J. Clin. Microbiol. 31 (5), 1200-1205
- KARCH, H., JANTETZKI-MITTMANN, C., ALEKSIC, S., DATZ, M. (1996)
Isolation of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 Strains from Patients with Hemolytic-Uremic Syndrome by Using Immunomagnetic Separation, DNA-Based Methods, and Direct Culture
J. Clin. Microbiol. 34 (3), 516-519
- KARCH, H., SCHMIDT, H., BRUNDER, W. (1998)
Plasmid-encoded determinants of *Escherichia coli* O157:H7
In: KAPER, J.B., O'BRIEN, A.D.: *Escherichia coli* O157:H7 and Other Shiga Toxin-Producing *E. coli* Strains, ASM Press, Washington D.C.
- KARMALI, M.A. (1989)
Infection by verotoxin-producing *Escherichia coli*
Clin. Microbiol. Rev. 2, 15-37
- KARMALI, M.A., PETRIC, M., LIM, C., FLEMING, P.C., ARBUS, G.S., LIOR, H. (1985a)
The association between hemolytic uremic syndrome and infection by verotoxin-producing *Escherichia coli*
J. Infect. Dis. 151 (5), 775-782
- KARMALI, M.A., PETRIC, M., LIM, C., CHEUNG, R., ARBUS, G.S. (1985b)
Sensitive method for detecting low numbers of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* in mixed cultures by use of colony sweeps and polymyxin extraction of Verocytotoxin
J. Clin. Microbiol. 22 (4), 614-619
- KARMALI, M.A., LINGWOOD, C.A., PETRIC, M., BRUNTON, J., GYLES, C. (1996)
Maintaining the existing phenotype nomenclatures for *E. coli* cytotoxins
ASM News 62, 167-169
- KAUFFMANN, F. (1966)
The bacteriology of *Enterobacteriaceae*
Munksgaard Verlag, Kopenhagen
- KEENE, W.E., SAZIE, E., KOK, J., RICE, D.H., HANCOCK, D.D., BALAN, V.K., ZHAO, T., DOYLE, M.P. (1997)
An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections traced to jerky made from deer meat
JAMA 277 (15), 1229-1231
- 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 (8), 2051-2054

- KHAKHRIA, R., DUCK, D., LIOR, H. (1990)
Extended phage-typing scheme for *Escherichia coli* O157:H7
Epidem. Infect. 105, 511-520
- KIM, M.S. und DOYLE, M.P. (1992)
Dipstick immunoassay to detect enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in retail ground beef
Appl. Environ. Microbiol. 58, 1764-1767
- KLIE, H., TIMM, M., RICHTER, H., GALLIEN, P., PERLBERG, K.-W., (1997)
Nachweis und Vorkommen von Verotoxin- bzw. Shigatoxin-bildenden *Escherichia coli* (VTEC bzw. STEC) in Milch
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 110, 337-341
- KOCH, H. (1982)
Rohwurst
In: Die Fabrikation feiner Wurstwaren, Verlagshaus Spronholz, Farnkfurt/M. S. 171-260
- KOFOTH, C.M. (1998)
Antagonistische Wirkung von *L. lactis* auf *E. coli* O157:H7
Fleischwirtschaft 78, 818-819
- KOFOTH, C.M. (1999)
Überlebens- und Wachstumsfähigkeit von enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC) in Rohwurstherzeugnissen
Inaugural-Dissertation zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München
- KONOWALCHUK, J., SPEIRS, J.I., STAVRIC, S. (1977)
Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*
Infect. Immun. 18 (3), 775-779
- KRÄMER, J. (1997)
Lebensmittelvergiftungen - *Enterobacteriaceae*
in: KRÄMER, J. Lebensmittelmikrobiologie, Verlag Eugen Ulmer Stuttgart
- KRAUSE, U., THOMSON-CARTER, F.M., PENNINGTON, T.H. (1996)
Molecular epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 by pulsed-field gel electrophoresis and comparison with that by bacteriophage typing
J. Clin. Microbiol. 34 (4), 959-961
- KREIENBROCK, L. und BROLL, S. (1999)
Methodische Aspekte zur Qualitätssicherung veterinärepidemiologischer Studien
Dtsch. tierärztl. Wschr. 106, 373-416
- KRISHNAN, C., FITZGERALD, V.A., DAKIN, S.J., BEHME, R.J. (1987)
Laboratory investigation of outbreak of hemorrhagic colitis caused by *Escherichia coli* O157:H7
J. Clin. Microbiol. 25 (6), 1043-1047

- KUNTZE, H., BECKER, H., MÄRTLBAUER, E., BAUMANN, C., BUROW, H. (1996)
Nachweis von verotoxinbildenden *E. coli* in Rohmilch und Rohmilchkäse
Arch. Lebensmittelhyg. 47, 141-144
- KUSUNOKI, H., LATIFUL BARI, M., KITA, T., SUGII, S., UEMURA, T. (2000)
Short communication: flow cytometry for the detection of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 with latex beads sensitized with specific antibody
J. Vet. Med. B. 47, 551-559
- LAW, D. und CHART, H. (1998)
A Review - enteroaggregative *Escherichia coli*
J. Appl. Microbiol. 84, 685-697
- LAW, D., GANGULI, L.A., DONOHUE-ROLFE, A., ACHESON, D.W.K. (1992)
Detection by ELISA of low numbers of shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* in mixed cultures after growth in the presence of mitomycin C
J. Med. Microbiol. 36, 198-202
- LAW, D., HAMOUR, A.A., ACHESON, D.W.K., PANIGRAHI, H., GANGULI, L.A., DENNING, D.W. (1994)
Diagnosis of infection with shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* by use of enzyme-linked immunosorbent assays for Shiga-like toxins on cultured stool samples
J. Med. Microbiol. 40, 241-245
- LEVINE, M.M. (1987)
Escherichia coli that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent
J. Infect. Dis. 155 (3), 377-389
- LEVINE, M.M., XU, J.G., KAPER, J.B., LIOR, H., PRADO, V., TALL, B., NATARO, J., KARCH, H., WACHSMUTH, I.K. (1987)
A DNA-probe to identify enterohemorrhagic *Escherichia coli* of O157:H7 and other serotypes that cause hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome
J. Infect. Dis. 156 (1), 175-182
- LEYER, G.J., WANG, L.-L., JOHNSON, E.A. (1995)
Acid adaption of *Escherichia coli* O157:H7 increases survival in acidic foods
Appl. Environ. Microbiol. 61 (10), 3752-3755
- LIESEGANG, A., SACHSE, U., PRAGER, R., CLAUS, H., STEINRÜCK, H., ALEKSIC, S., RABSCH, W., VOIGT, W., FRUTH, A., KARCH, H., BOCKEMÜHL, J., TSCHÄPE, H. (2000)
Clonal diversity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7/H⁻ in Germany – A ten-year study
Int. J. Med. Microbiol. 290, 269-278
- LIN, J., SMITH, M.P., CHAPIN, K.C., BAIK, H.S., BENNET, G.N., FOSTER, J.W. (1996)
Mechanisms of acid resistance in enterohemorrhagic *Escherichia coli*
Appl. Environ. Microbiol. 62, 3094-3100

- LIOR, H. und BORCZYK, A.A. (1987)
False positive identification of *Escherichia coli* O157
Lancet 7, 333
- LOPEZ, E.L., CONTRINI, M.M., DE ROSA, M.F. (1998)
Epidemiology of shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in south america
In: KAPER, J.B., O'BRIEN, A.D.: *Escherichia coli* O157:H7 and other shiga toxin-producing *E. coli* strains, ASM Press, Washington D.C.
- LÜCKE, F.-K. (1985)
Mikrobiologische Vorgänge bei der Herstellung von Rohwurst und Rohschinken
In: Mikrobiologie und Qualität von Rohwurst und Rohschinken, Bundesanstalt für Fleischforschung, Kulmbacher Reihe Band 5 S. 85-102
- LÜCKE, F.-K. und HECHELMANN, H. (1985)
Starterkulturen für Rohwurst und Rohschinken - Zusammensetzung und Wirkung
In: Mikrobiologie und Qualität von Rohwurst und Rohschinken, Bundesanstalt für Fleischforschung, Kulmbacher Reihe Band 5, S. 193-218
- LUZZI, I., MINELLI, F., GIANVITI, A., CAPRIOLI, A. (1992)
Impaired detection of faecal verocytotoxin in the presence of *Clostridium difficile* cytotoxin in patients with haemolytic uraemic syndrome
Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 11, 934-936
- MACRAE, M., REBATE, T., JOHNSTON, M., OGDEN, I.D. (1997)
The sensitivity of *Escherichia coli* O157 to some antimicrobials by conventional and conductance assays
Lett. Appl. Microbiol. 25, 135-137
- MÄDE, D. und STARK, R. (1996)
Untersuchung von Rohmilch auf Shiga-like Toxin bildende *Escherichia coli* durch Polymerasekettenreaktion
Dtsch. Tierärztl. Wschr. 103, 511-512
- MADICO, G., AKOPYANTS, N.S., BERG, D.E. (1995)
Arbitrarily primed PCR DNA fingerprinting of *Escherichia coli* O157:H7 strains by using templates from boiled cultures
J. Clin. Microbiol. 33 (6), 1534-1536
- MARCH, S.B. und RATMAN, 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 (7), 1675-1677
- 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

- MARTIN, I.E., TYLER, S.D., TYLER, K.D., KHAKHRIA, R., JOHNSON, W.M. (1996)
Evaluation of ribotyping as epidemiological tool for typing *Escherichia coli* serogroup O157 isolates
J. Clin. Microbiol. 34 (3), 720-723
- 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
- MELTON-CELSA, A.R. und O'BRIEN, A.D. (1998)
Structure; biology, and toxicity of shiga toxin family members für cells and animals
In: KAPER, J.B., O'BRIEN, A.D.: *Escherichia coli* O157:H7 and Other Shiga Toxin-Producing *E. coli* Strains, ASM Press, Washington D.C.
- MENG, J., ZHAO, S., ZHAO, T., DOYLE, M.P. (1995)
Molecular characterization of *Escherichia coli* O157:H7 isolates by the pulsed-field electrophoresis and plasmid DNA analysis
J. Med. Microbiol. 42, 258-263
- MENG, J., ZHAO, S., DOYLE, M.P., MITCHELL, S.E., KRESOVICH, S. (1996)
Polymerase chain reaction for detection *Escherichia coli* O157:H7
Int. J. Food Microbiol. 32, 103-114
- MENG, J., ZHAO, S., DOYLE, M.P., MITCHELL, S.E., KRESOVICH, S. (1997)
A multiplex PCR for identifying shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7
Lett. Appl. Microbiol. 24, 172-176
- MILLEY, D.G. und SEKLA, L.H. (1993)
An enzyme-linked immunosorbent assay-based isolation procedure for verotoxigenic *Escherichia coli*
Appl. Environ. Microbiol. 59 (12), 4223-4229
- MOHAMMED, A., PEIRIS, J.S.M., WIJEWANTA, E.A. (1986)
Serotypes of verocytotoxigenic *Escherichia coli* isolated from cattle and buffalo calf diarrhea
FEMS Microbiol. Lett. 35, 261-265
- MONTENEGRO, M.A., BÜLTE, M., TRUMPF, T., ALEKSIC, S., REUTER, G., BULLING, E., HELMUTH, R. (1990)
Detection and characterization of fecal verotoxin-producing *Escherichia coli* from healthy cattle
J. Clin. Microbiol. 28, 1417-1421
- MORTLOCK, S. (1994)
Recovery of *Escherichia coli* O157:H7 from mixed suspensions: evaluation and comparison of pre-coated immunomagnetic beads and direct-plating.
Brit. J. Biomed. Sc. 51, 207-214
- MOSSEL, D.A.A. und STRUIJK, C.B. (1999)
Workshop on risk assessment of human exposure to pathogenic microorganisms
Int. J. Food Microbiol. 18, 239-244

- MÜLLER, F. (1992)
Infektionsimmunologischer Teil – Reaktionen zum Nachweis von Antikörpern und Antigenen - Agglutinationsreaktionen
in: F. BURKHARDT (Hrsg.): Mikrobiologische Diagnostik, Georg Thieme Verlag, 563-566
- MÜLLER, A., BÜLTE, M., MACK, H. (1998)
Überlebenskinetik und Virulenzfaktoren von verotoxinogenen bzw. enterohämorrhagischen *Escherichia coli*- (VTEC-/EHEC-) Stämmen in Rohwurst
Proc. 39. Arbeitstagung Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft e.V., Arbeitsgebiet Lebensmittelhygiene, Garmisch-Partenkirchen 21.-25.09.1998
- NEILL, M.A., AGOSTI, J., ROSEN, H. (1985)
Hemorrhagic colitis with *Escherichia coli* O157:H7 preceding adult hemolytic uremic syndrome
Arch. Intern. Med. 145 (12), 2215-2217
- NEWLAND, J.W. und NEILL, R.J. (1988)
DNA probes for shiga-like toxins I and II and for toxin-converting bacteriophages
J. Clin. Microbiol. 26 (7), 1292-1297
- NEWLAND, J.W., STROCKBINE, N.A., MILLER, S.F., O'BRIEN, A.D., HOLMES, R.K. (1985)
Cloning of shiga-like toxin structural genes from a toxin converting phage of *Escherichia coli*
Science 230 (10), 179-181
- O'BRIEN, A.D. und HOLMES, R.K. (1987)
Shiga and shiga-like toxins
Microbiol. Rev. 51 (2), 206-220
- 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 (6), 763-769
- O'BRIEN, A.D., LIVELY, T.A., CHEN, M.E., ROTHMAN, S.W., FORMAL, S.B. (1983)
Escherichia coli O157:H7 strains associated with haemorrhagic colitis in the United States produce a *Shigella dysenteriae* I (shiga)-like cytotoxin
Lancet 26, 702
- 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 (3), 249-252
- OKREND, A.J.G., ROSE, B.E., MATNER, R. (1990b)
An improved screening method for the detection and isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from meat, incorporating the 3M Petrifilmtest kit - EHEC - for haemorrhagic *Escherichia coli*
J. Food Prot. 53 (11), 936-940

- OKREND, A.J.G., ROSE, B.E., LATTUADA, C.P. (1992)
Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 using O157 specific antibody coated magnetic beads
J. Food Prot. 55, 214-217
- OLSVIK, O., RIMSTAD, E., HORNES, E., STROCKBINE, N.A., WASTESON, Y., LUND, A., WACHSMUTH, K. (1991)
A nested PCR followed by magnetic separation of amplified fragments for detection of *Escherichia coli* shiga-like toxin genes
Mol. Cell. Probes 5, 429-435
- OSTROFF, S.M., TARR, P.I., NEILL, M.A., LEWIS, J.H., HARGRETT-BEAN, N., KOBAYASHI, J.M. (1989)
Toxin genotypes and plasmid profiles as determinants of systemic sequelae in *Escherichia coli* O157:H7 infections.
J. Infect. Dis. 160 (6), 994-998
- PADHYE, N.V. und DOYLE, M.P. (1991a)
Production and characterization of a monoclonal antibody specific for enterohemorrhagic *Escherichia coli* of serotypes O157:H7 and O26:H11
J. Clin. Microbiol. 29 (1), 99-103
- PADHYE, N.V. und DOYLE, M.P. (1991b)
Rapid procedure for detecting enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in food
Appl. Environ. Microbiol. 57 (9), 2693-2698
- PARK, C.H., HIXON, D.L., MORRISON, W.L., COOK, C.B. (1994)
Rapid diagnosis of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 directly from fecal specimens using immunofluorescence stain
Am. J. Clin. Pathol. 101, 91-94
- PARK, C.H., VANDEL, N., HIXON, D.L. (1996)
Rapid immunoassay for detection of *Escherichia coli* O157 directly from stool specimens
J. Clin. Microbiol. 34, 988-990
- PARK, C.H. und JAFIR, A. (1997)
Revised abstract - evaluation of the LMD ELISA for the detection of shiga-like toxins of *Escherichia coli*
Poster at 3rd intern Symp. on Shiga Toxin-prod. *E.coli* Inf. 22.-26.06.97
- PAROS, M., TARR, P.I., KIM, H., BESSER, T.E., HANCOCK, D.D. (1993)
A comparison of human and bovine *Escherichia coli* O157:H7 isolates by toxin genotype, plasmid profile and bacteriophage lambda-restriction fragment length polymorphism profile
J. Infect. Dis. 168, 1300-1303
- PARRY, S.M., SALMON, R.L., WILLSHAW, G.A., CHEASTY, T., LUND, L.J., WEARDEN, P., QUORAISHI, A.H., FITZGERALD, T. (1995)
Haemorrhagic colitis in child after visit to farm visitor centre
Lancet 346 (8), 572

- 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 (11), 3063-3067
- PATON, A.W., RATCLIFF, R.M., DOYLE, R.M., SEYMOUR-MURRAY, J. (1996)
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
- 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 for mentally retarded persons: Clinical and epidemiologic observations
J. Pediatr. 116 (4), 544-551
- PERERA, L.P., MARQUES, L.R.M., O'BRIEN, A.D. (1988)
Isolation and characterisation of monoclonal antibodies to Shiga-like toxin II of enterohemorrhagic *Escherichia coli* and use of the monoclonal antibodies in a colony enzyme linked immunosorbent assay
J. Clin. Microbiol. 26 (10), 2127-2131
- PETRIC, M., KARMALI, M.A., ARBUS, S., ROSCOE, M., LOUIE, S., CHEUNG, R. (1987)
Effects of cycloheximide and puromycin on cytotoxic activity of *Escherichia coli* verocytotoxin (Shiga like toxin)
J. Clin. Microbiol. 25 (7), 1265-1268
- PICHNER, R., HECHELMANN, H., GAREIS, M. (2000)
Bedeutung von E. coli und Verotoxinbildnern in frischen, streichfähigen Mettwürsten
Proc. 41. Arbeitstagung Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft e.V.,
Arbeitsgebiet Lebensmittelhygiene, Garmisch-Partenkirchen 25.-28.09.2000
- PIÉRARD, D., VAN DAMME, L., MORIAU, L., STEVENS, D., LAUWERS, S. (1997)
Virulence factors of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* isolated from raw meats
Appl. Environ. Microbiol. 63, 4585-4587
- PIÉRARD, 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 (11), 3317-3322
- POLLARD, D.R., JOHNSON, W.M., LIOR, H., TYLER, S.D., ROZEE, K.R. (1990)
Rapid and specific detection of verotoxin genes in *Escherichia coli* by the polymerase chain reaction
J. Clin. Microbiol. 28 (3), 540-545

- POZZI, W., BEUTIN, L., WEBER, H. (1996)
Überleben und Nachweis von enterohämorrhagischen *Escherichia coli* in streichfähiger Rohwurst
Fleischwirtschaft 76 (12), 1300-1311
- PRAGER, R., REISSBRODT, R., HOLLER, H., GERICKE, B., ALEKSIC, S., CLAUS, H., WAGNER, H., TSCHÄPE, H. (1998)
Isolierung und Charakterisierung von Shigatoxin-produzierenden *E. coli*-Stämmen aus Stuhlproben: Ergebnisse einer Sentinel-Studie
Bundesgesundhbl. 41, 6-13
- PÜHLER, A., REGITZ, M., SCHMID, R.D. (1999)
Römpp kompakt Lexikon - Biochemie und Molekularbiologie
Georg Thieme Verlag Stuttgart
- PULZ, M. (1997) (1996)
Zur Epidemiologie und aktuellen Bedeutung enterohämorrhagischer *Escherichia coli* (EHEC) in Nordbayern
Ges. Wesen 59, 656-660
- RADU, S., MUTALIB, S.A., RUSUL, G., AHMAD, Z., MORIGAKI, T., ASAI, N., KIM, Y.B., OKUDA, J., NISHIBUCHI, M. (1998)
Detection of *Escherichia coli* O157:H7 in Beef Marketed in Malaysia
Appl. Environ. Microbiol. 64 (3), 1153-1156
- RAMOTAR, K., WALDHARDT, B., CHURCH, D., SZUMSKI, R., LOUIE, T. (1995)
Direct detection of verotoxin-producing *Escherichia coli* in stool samples by PCR
J. Clin. Microbiol. 33 (3), 519-524
- RANDALL, L.P., WRAY, C., MCLAREN, I.M. (1997)
Studies on the development and use of a monoclonal sandwich ELISA for the detection of verotoxic *Escherichia coli* in animal faeces
Vet. Rec. 1, 112-115
- RATNAM, S., MARCH, S.B., AHMED, R., BEZANSON, G.S., KASATIYA, S. (1988)
Characterization of *Escherichia coli* serotype O157:H7
J. Clin. Microbiol. 26 (10), 2006-2012
- READ, S.C., CLARKE, R.C., MARTIN, A., DE GRANDIS, S.A., HII, J., MCEWENS, S., GYLES, C.L. (1992)
Polymerase chain reaction for detection of verocytotoxigenic *Escherichia coli* isolated from animal and food sources
Mol. Cell. Probes 6, 153-161
- REIDA, P., WOLFF, M., POHLS, H.-W., KUHLMANN, W., LEHMACHER, A., ALEKSIC, S., KARCH, H., BOCKEMÜHL, J. (1994)
An outbreak due to enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in a children Day care centre characterized by person-to-person transmission and environmental contamination
Zbl. Bakt. 281, 534-543

- RESTAINO, L., FRAMPTON, E.W., IRBE, R.M., ALLISON, D.R.K. (1997)
A 5-h screening and 24-h confirmation procedure for detecting *Escherichia coli* O157:H7 in beef using direct epifluorescent microscopy and immunomagnetic separation
Lett. Appl. Microbiol. 24, 401-404
- RESTAINO, L., FRAMPTON, E.W., TURNER, K.M., ALLISON, D.R.K. (1999)
A chromogenic plating medium for isolating *Escherichia coli* O157:H7 from beef
Lett. Appl. Microbiol. 29, 26-30
- RICE, E.W., JOHNSON, C.H., WILD, D.K., REASONER, D.J. (1992)
Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in drinking water associated with a waterborne disease outbreak of hemorrhagic colitis
Lett. Appl. Microbiol. 15, 38-40
- RICHTER, H., KLIE, H., TIMM, M., GALLIEN, P., STEINRÜCK, H. (1997)
Verotoxin-bildende *E. coli* (VTEC) im Kot von Schlachtrindern aus Deutschland
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 110, 121-127
- RILEY, L.W., REMIS, R.S., HELGERSON, S.D., MCGEE, H.B., WELLS, J.G., DAVIS, B.R., HEBERT, 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
N. Engl. J. Med. 308 (12), 681-685
- RITCHIE, M., PARTINGTON, S., JESSOP, J., KELLY, M.T. (1992)
Comparison of a direct fecal Shiga-like toxin assay and sorbitol-MacConkey agar culture for laboratory diagnosis of enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection
J. Clin. Microbiol. 30 (2), 461-464
- RIVERA-BETANCOURT, M. und KEEN, J.E. (2000)
Murine monoclonal antibodies specific for lipopolysaccharide of *Escherichia coli* O26 and O111
Appl. Environ. Microbiol. 66 (9), 4124-4127
- RODRIGUE, D.C., MAST, E.E., GREENE, K.D., DAVIS, J.P., HUTCHINSON, M.A., WELLS, J.G., BARRETT, T.J., GRIFFIN, P.M. (1995)
A university outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with roast beef and an unusually benign clinical course
J. Infect. Dis. 172, 1122-1125
- RÜSSMANN, H., KOTHE, E., SCHMIDT, H., FRANKE, S., HARMSSEN, D., CAPRIOLI, A., KARCH, H. (1995)
Genotyping of shiga-like toxin genes in non-O157 *Escherichia coli* strains associated with haemolytic uraemic syndrome
J. Med. Microbiol. 42, 404-410

- RYAN, C.A., TAUXE, R.V., HOSEK, G.W., WELLS, J.G., STOEZ, P.A. MCFADDEN, H.W. JR., SMITH, P.W., WRIGHT, G.F., BLAKE, P.A. (1986)
Escherichia coli O157:H7 diarrhea in a nursing home: clinical, epidemiological, and pathological findings
J. Infect. Dis. 154 (4), 631-638
- SAMADPOUR, M. und LISTON, J. (1990)
Evaluation of DNA probes for detection of shiga-like-toxin-producing *Escherichia coli* in food and calf fecal samples
Appl. Environ. Microbiol. 56 (5), 1212-1215
- SAVARINO, S.J., MCVEIGH, A., WATSON, J., CRAVIOTO, A., MOLINA, J., ECHEVERRIA, P., BHAN, M.K., LEVINE, M.M., FASANO, A. (1996)
Enterohemolytic *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin is not restricted to enterohemolytic *E. coli*
J. Infect. Dis. 173, 1019-1022
- SCHALCH, B. und STOLLE, A. (2000)
Zur Untersuchung von rohem Fleisch auf *E. coli* O157 unter Einsatz des EiaFoss Systems
41. Arbeitstagung Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft e.V., Arbeitsgebiet Lebensmittelhygiene, Garmisch-Partenkirchen 25.-28.09.2000
- SCHMIDT, U. (1985)
Salmonellen - Bedeutung bei Rohwurst und Rohschinken
In: Mikrobiologie und Qualität von Rohwurst und Rohschinken, Bundesanstalt für Fleischforschung, Kulmbacher Reihe Band 5, S. 128-151
- 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 (10), 2364-2367
- 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 (3), 1055-1061
- SCHMIDT, H., SCHEEF, J., MORABITO, S., CAPRIOLI, A., WIELER, L. H., KARCH, H. (2000)
A new shiga toxin 2 variant (Stx2f) from *Escherichia coli* isolated from pigeons
Appl. Environ. Microbiol. 66 (3), 1205-1208

- SCHUY, C., HECKÖTTER, S., BÜLTE, M. (1998)
Nachweis, Isolierung und Identifizierung verotoxinogener *E. coli* (VTEC) durch kulturelle, immunologische und molekularbiologische Methoden
Proc. 39. Arbeitstagung Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft e.V., Arbeitsgebiet Lebensmittelhygiene, Garmisch-Partenkirchen 21.-25.09.1998
- SCOTLAND, S.M., SMITH, H.R., ROWE, B. (1985)
Two distinct toxins active on vero cells from *Escherichia coli* O157
Lancet 19, 885-886
- SCOTLAND, S.M., WILLSHAW, G.A., SMITH, H.R., ROWE, B. (1987)
Properties of strains of *Escherichia coli* belonging to serogroup O157 (serotype O157:H7) with special reference to production of verocytotoxins VT1 and VT2.
Epidem. Infect. 99, 613-624
- SCOTLAND, S.M., ROWE, B., SMITH, H.R., WILLSHAW, G.A., GROSS, R.J. (1988)
Vero cytotoxin-producing strains of *Escherichia coli* from children with haemolytic uraemic syndrome and their detection by specific DNA probes
J. Med. Microbiol. 25, 237-243
- SCOTLAND, S.M., CHEASTY, T., THOMAS, A., ROWE, B. (1991)
Beta-glucuronidase activity of verocytotoxin-producing strains of *Escherichia coli*, including serogroup O157, isolated in the United Kingdom
Lett. Appl. Microbiol. 13, 42-44
- SELBITZ, H.-J. (2002)
Gramnegative fakultativ anaerobe Stäbchenbakterien – *Escherichia*
In: ROLLE, M., MAYR, A.: Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre, Enke Verlag, Stuttgart, 7. Auflage
- SERIWATA, J., BROWN, J.E., ECHEVERRIA, P., TAYLOR, D.N., SUTHIENKUL, O., NEWLAND, J. (1988)
DNA probes to identify shiga-like toxin I- and II-producing enteric bacterial pathogens isolated from patients with diarrhea in Thailand
J. Clin. Microbiol. 26 (8), 1614-1615
- SHAH, S., HOFFMAN, R., SHILLAM, P., WILSON, B. (1996)
Prolonged fecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7 during an outbreak at a day care center
Clin. Infect. Dis. 23, 835-836
- SMITH, H.R., WILLSHAW, G.A., THOMAS, A., ROWE, B. (1991)
Applications of DNA probes for verocytotoxin-producing *Escherichia coli*.
J. Hosp. Infect. 18, 438-442
- SMITH, H.R., ROWE, B., ADAK, G.K., REILLY, W.J. (1998)
Shiga toxin (verocytotoxin)-producing *Escherichia coli* in the United Kingdom
In: KAPER, J.B., O'BRIEN, A.D.: *Escherichia coli* O157:H7 and other shiga toxin-producing *E. coli* strains, ASM Press, Washington D.C.

- SOWERS, E.G., WELLS, J.G., STROCKBINE, N.A. (1996)
Evaluation of commercial latex reagents for identification of O157 and H7 antigens of *Escherichia coli*
J. Clin. Microbiol. 34 (5), 1286-1289
- SPIKA, J.S., PARSONS, J.E., NORDENBERG, D., WELLS, J.G., GUNN, R.A., BLAKE, P.A. (1986)
Hemolytic uremic syndrome and diarrhea associated with *Escherichia coli* O157:H7 in a day-care center
J. Pediatr. 109 (2), 287-291
- SPIKA, J.S., KHAKHRIA, R., MICHEL, P., MILLEY, D., WILSON, J., WATERS, J. (1998)
Epidemiology of shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in Canada
In: KAPER, J.B., O'BRIEN, A.D.: *Escherichia coli* O157:H7 and other shiga toxin-producing *E. coli* strains, ASM Press, Washington D.C.
- STAHL, A. und BÜLTE, M. (2000)
Enhancer zum verbesserten Nachweis von verotoxinbildenden *E. coli* (VTEC)
Proc. 41. Arbeitstagung Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft e.V., Arbeitsgebiet Lebensmittelhygiene, Garmisch-Partenkirchen 25.-28.09.2000
- STEPHAN, R. und HOELZLE, L.E. (2000)
Characterization of shiga toxin 2 variant B-subunit in *Escherichia coli* strains from asymptomatic human carriers by PCR-RFLP
Lett. Appl. Microbiol. 31, 139-142
- STEPHAN, R. und UNTERMANN, F. (1999)
Virulence factors and phenotypical traits of verotoxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from asymptomatic human carriers
J. Clin. Microbiol. 37 (5)
- STIEBING, A., VOGT, N., BAUMGART, J., PUTZFELD, K., BERGT, J. (2000)
EHEC - Überlebensfähigkeit in Rohwurst 2. Schnittfeste Rohwurst
Fleischwirtschaft 6, 107-110
- STROCKBINE, N.A., MARQUES, L.R.M., HOLMES, R.K., O'BRIEN, A.D. (1985)
Characterization of monoclonal antibodies against shiga-like toxin from *Escherichia coli*
Infect. Immun. 50 (3), 695-700
- STROCKBINE, N.A., MARQUES, L.R.M., NEWLAND, J.W., SMITH, H.W., HOLMES, R.K., O'BRIEN, A.D. (1986)
Two toxin-producing phages from *Escherichia coli* O157:H7 strain 933 encode antigenically distinct toxins with similar biological activities
Infect. Immun. 53 (1), 135-140
- STROCKBINE, N.A., WELLS, J.G., BOPP, C.A., BARRETT, T.J. (1998)
Overview of detection and subtyping methods
In: KAPER, J.B., O'BRIEN, A.D.: *Escherichia coli* O157:H7 and other shiga toxin-producing *E. coli* strains, ASM Press, Washington D.C.

- STROEHER, U.H., BODE, L., BEUTIN, L., MANNING, P.A. (1993)
Characterization and sequence of a 33-kDa enterohemolysin (Ehly 1)-associated protein in *Escherichia coli*
Gene 132, 89-94
- STUART, F.A. und CORBEL, M.J. (1982)
Identification of a serological cross-reaction between *Brucella abortus* and *Escherichia coli* O157
Vet. Rec. 110, 202-203
- SWAMINATHAN, B. und BARRETT, T.J. (1995)
Amplification methods for epidemiologic investigations of infectious diseases
J. Microbiol. Methods 23, 129-139
- SWERDLOW, D.L., WOODRUFF, B.A., BRADY, R.C., GRIFFIN, P.M., TIPPEN, S., DONNELL JR., H.D., GELDREICH, E., PAYNE, B.J., MEYER JR., A., WELLS, J.G., GREENE, K.D., BRIGHT, M., BEAN, N.H., BLAKE, P.A. (1992)
A waterborne outbreak in Missouri of *Escherichia coli* O157:H7 associated with bloody diarrhea and death
Ann. Intern. Med. 117 (10), 812-819
- SYNGE, B.A., HOPKINS, G.F., REILLY, W.J., SHARP, J.C.M. (1993)
Possible link between cattle and *Escherichia coli* O157 infection in a human
Vet. Rec. 13, 507
- SZABO, R.A., TODD, E.C.D., JEAN, A. (1986)
Method to isolate *Escherichia coli* O157:H7 from food
J. Food Prot. 49 (10), 768-772
- TAMURA, K., SAKAZAKI, R., MURASE, M., KOSAKO, Y. (1996)
Serotyping and categorisation of *Escherichia coli* strains isolated between 1958 and 1992 from diarrheal diseases in Asia
J. Med. Microbiol. 45, 353-358
- TARR, P.I. (1995)
Escherichia coli O157:H7: clinical, diagnostic, and epidemiological aspects of human infection
Clin. Infect. Dis. 20 (10), 1-8
- TARR, P.I. und BILGE, S.S. (1998)
Intimin-independent adherence mechanisms of *Escherichia coli* O157:H7 and other shiga toxin-producing *E. coli* strains
In: KAPER, J.B., O'BRIEN, A.D.: *Escherichia coli* O157:H7 and other shiga toxin-producing *E. coli* strains, ASM Press, Washington D.C.
- TENOVER, F.C., ARBEIT, R.D., GOERING, R.V., MICKELSEN, P.A., MURRAY, B.E., PERSING, D.H., SWAMINATHAN, B. (1995)
Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing
J. Clin. Microbiol. 33 (9), 2233-2239

- TEUFEL, P., BÖHMER, L., WEBER, C. (1997)
Bundesweite Erhebung zum mikrobiologischen Status von frischen Mettwürsten
Abschlußbericht des BgVV, April 1997 (Durchführung erbeten durch Ausschuß für
Lebensmittelüberwachung der Länder [AfLMÜ] und dem Arbeitskreis
Lebensmittelhygienischer Tierärztlicher Sachverständiger [ALTS])
- 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
Bundesgesundhbl. 41, 31-36
- THOMAS, A., SMITH, H.R., WILLSHAW, G.A., ROWE, B. (1991)
Non-radioactively labeled polynucleotide and oligonucleotide DNA probes, for
selectively detecting *Escherichia coli* strains producing verocytotoxin VT1, VT2 and
VT2 variant.
Molec. Cellul. Probes 5, 129-135
- THOMAS, A., SMITH, H.R., ROWE, B. (1993)
Use of digoxigenin labelled oligonucleotide DNA probes for VT2 and VT2 human
variant genes to differentiate Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* strains of
serogroup O157
J. Clin. Microbiol. 31 (7), 1700-1703
- 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 (10), 2165-2168
- TIETZE, E. und TSCHÄPE, H. (1983)
Plasmid patterns analysis of natural bacterial isolates and its epidemiological
implication
J. Hyg. Camb. 90, 475-488
- 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, 270-272
- TIMM, M., KLIE, H., RICHTER, H., GALLIEN, P., PERLBERG, K.-W., LEHMANN, S.,
PROTZ, D. (1998)
Verfahren zum Nachweis von Verotoxin-produzierenden *Escherichia coli* (VTEC) in
Lebensmitteln und Fäzes
Bundesgesundhbl. 41, 20-25
- TIMM, H., KLIE, H., RICHTER, H., GALLIEN, P., PERLBERG, K.-W., LEHMANN, S.,
PROTZ, D. (1999)
Untersuchungen zum Nachweis und Vorkommen von Verotoxin-bildenden
Escherichia coli (VTEC) in Rohwurst
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 112, 385-389

- TODD, E.C.D., SZABO, R.A., PETERKIN, P., SHARPE, A.N., PARRINGTON, L., BUNDLE, D., GIDNEY, M.A., PERRY, M.B. (1988)
Rapid hydrophobic grid membrane filter-enzyme-labeled antibody procedure for identification and enumeration of *Escherichia coli* O157 in foods
Appl. Environ. Microbiol. 54 (10), 2536-2540
- TREVENA, W.B., HOOPER, R.S., WRAY, C., WILLHAW, G.A., CHEASTY, T., DOMINGUE, G. (1996)
Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 associated with companion animals
Vet. Rec. 138 (4), 400
- TRUMPF, T., HERZBERG, A., HIRSCH, J., JENTZEN, A., KRAHMER, B., ROHWER, W., VOGELSANG, B., STENGEL, G. (2000)
Nachweis von Shiga-Toxin bildenden *Escherichia coli* (STEC) in amtlichen Lebensmittelproben des Landes Schleswig-Holstein in der Zeit von 1995-1998
Amtstierärztlicher Dienst und Lebensmittelkontrolle 7, 18-21
- TSCHÄPE, H., BENDER, L., OTT, M., WITTIG, W., HACKER, J. (1992)
Restriction fragment length polymorphism and virulence pattern of veterinary pathogen *Escherichia coli* O139:K82:H1
Zbl. Bakt. 276, 264-272
- TSCHÄPE, H., PRAGER, R., STRECKEL, W., FRUTH, A., TIETZE, E., BÖHME, G. (1995)
Verotoxinogenic *Citrobacter freundii* associated with severe gastroenteritis and cases of haemolytic uremic syndrome in a nursery school: green butter as the infection source
Epidemiol. Infect. 114, 441-450
- TSEN, H.-Y. und JIAN, L.-Z. (1998)
Development and use of a multiplex PCR-system for the rapid screening of heat labile toxin I, heat stable toxin II and shiga-like toxin I and II genes of *Escherichia coli* in water
J. Appl. Microbiol. 84, 585-592
- TYLER, S.D., JOHNSON, W.M., LIOR, H., WANG, G., ROZEE, K.R. (1991)
Identification of 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 (7), 1339-1343
- TYLER, K.D., WANG, G., TYLER, S.D., JOHNSON, W.M. (1997)
Factors affecting reliability and reproducibility of amplification-based DNA fingerprinting of representative bacterial pathogens
J. Clin. Microbiol. 35 (2), 339-346
- TZIPORI, S., KARCH, H., WACHSMUTH, K.I., ROBINS-BROWN, R.M., O'BRIEN, A.D., LIOR, H., COHEN, M.L., SMITHERS, J., LEVINE, M.M. (1987)
Role of a 60-Megadalton plasmid and shiga-like toxins in the pathogenesis of infections caused by enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in gnotobiotic piglets
Infect. Immun. 55 (12), 3117-3125

- UPTON, P. und COIA, J.E. (1994)
Outbreak of *Escherichia coli* O157 infection associated with pasteurised milk supply
Lancet 344, 1015
- 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.
(1997)
Detection of *Escherichia coli* O157 in French food samples using an
immunomagnetic separation method and the VIDAS *E. coli* O157
Lett. Appl. Microbiol. 25, 442-446
- WALLACE, J.S., CHEASTY, T., JONES, K. (1997)
Isolation of vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 from wild birds
J. Appl. Microbiol. 82, 399-404
- WANG, G., WHITTAM, T.S., BERG, C.M., BERG, D.E. (1993)
RAPD (arbitrary primer) PCR is more sensitive than multilocus enzyme
electrophoresis for distinguishing related bacterial strains.
Nucleic. Acids. Res. 21 (25), 5930-3
- WEAGANT, S.D., BRYANT, J.L., JINNEMAN, K.G. (1995)
An improved rapid technique for the Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from foods
J. Food Prot. 58, 7-12
- WEAVER, J.W. und ROWE, M.T. (1997)
Effect of non-target cells on the sensitivity of the PCR for *Escherichia coli* O157:H7
Lett. Appl. Microbiol. 25, 109-112
- WEBER, H. (1996)
Mikrobiologie der Rohwurst
In: H. Weber (Hrsg.): Mikrobiologie der Lebensmittel - Fleisch und
Fleischerzeugnisse-, Behr's Verlag GmbH&Co. Hamburg S. 313-338
- WEBER, A., KLIE, H., RICHTER, H., GALLIEN, P., TIMM, M., PERLBERG, K.-W.
(1997)
Über die derzeitigen Probleme zum Auffinden von Infektionsquellen und
Infektionsketten beim enterohämorrhagischen *E. coli* (EHEC)
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 110, 211-213
- WHITTAM, T.S., WOLFE, M.L., WACHSMUTH, I.K., ORSKOV, F., ORSKOV, F.,
WILSON, R.A. (1993)
Clonal relationships among *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic colitis
and infantile diarrhea
Infect. Immun. 61 (5), 1619-1629

- WIELER, L.H., BAUERFEIND, R., BALJER, G. (1992)
Characterization of shiga-like toxin producing *Escherichia coli* (SLTEC) isolated from calves with and without diarrhea
Zbl. Bakt. 276, 243-253
- WIELER, L.H., VIELER, E., ERPENSTEIN, C., SCHLAPP, T., STEINRÜCK, H., BAUERFEINDT, 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 (12), 2980-2984
- WIELER, L.H., McDANIEL, T.K., WHITTAM, T.S., KAPER, J.B. (1997)
Insertion site of the locus of enterocyte effacement in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* differs in relation to the clonal phylogeny of the strains.
FEMS Microbiol. Lett. 156(1), 49-53
- WIELER, L.H., SCHWANITZ, A., VIELER, E., BUSSE, B. (1998)
Virulence properties of shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains of Serogroup O118, a major group of STEC pathogens in calves
J. Clin. Microbiol. 36 (6), 1604-1607
- 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., and the *E. coli* O157:H7 Working Group (2000)
Illness outbreak associated with *Escherichia coli* O157:H7 in Genoa salami
Can. Med. Assoc. J. 16 (5), 1409-1413
- WILLSHAW, G.A., SMITH, H.R., SCOTLAND, S.M., ROWE, B. (1985)
Cloning of genes determining the production of verocytotoxin by *Escherichia coli*
J. Gener. Microbiol. 131, 3047-3053
- WILLSHAW, G.A., SMITH, H.R., SCOTLAND, S.M., FIELD, A.M., ROWE, B. (1987)
Heterogeneity of *Escherichia coli* phages encoding vero cytotoxins: comparison of cloned sequences determining VT1 and VT2 and development of specific gene probes
J. Gener. Microbiol. 133, 1309-1317
- WILLSHAW, G.A., SMITH, H.R., ROBERTS, D., THIRLWELL, J., CHEASTY, T., ROWE, B. (1993)
Examination of raw beef products for the presence of Verocytotoxin-producing *Escherichia coli*, particularly those of serogroup O157.
J. Appl. Bacteriol. 75, 420-426
- WILLSHAW, G.A., THIRLHELL, J., JONES, A.P., PARRY, S., SALMON, R.L., HICKEY, M. (1994)
Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in beefburgers linked to an outbreak of diarrhoea, haemorrhagic colitis and haemolytic uraemic syndrome in Britain
Lett. Appl. Microbiol. 19, 304-307

- WILLSHAW, G.A., SMITH, H.R., CHEASTY, T., WALL, P.G., ROWE, B. (1997)
Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 outbreaks in England and Wales, 1995: Phenotypic methods and genotypic subtyping
Emerg. Infect. Dis. 3 (4), 561-564
- WITHAM, P.K., YAMASHIRO, C.T., LIVAK, K., BATT, C. (1996)
A PCR-based assay for the detection of *Escherichia coli* shiga-like toxin genes in ground beef
Appl. Environ. Microbiol. 62 (4), 1347-1353
- WRIGHT, D.J., CHAPMAN, P.A., SIDDONS, C.A. (1994)
Immunomagnetic separation as a sensitive method for isolating *Escherichia coli* O157 from food samples
Epidem. Infect. 113, 31-39
- YU, H. und BRUNO, J.G. (1996)
Immunomagnetic-electrochemiluminescent detection of *Escherichia coli* O157 and *Salmonella typhimurium* in foods and environmental water samples
Appl. Environ. Microbiol. 62, 587-592
- ZADIK, P.M., CHAPMAN, P.A., SIDDONS, C.A. (1993)
Use of tellurite for the selection of verotoxigenic *Escherichia coli* O157
J. Med. Microbiol. 39, 155-158

Danksagung

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

Ebenso danke ich sehr herzlich meinen Vorgesetzten, Herrn Flottenarzt Dr. Bergmann, Herrn Oberstveternär Dr. Pott, Herrn Oberfeldveternär Dr. Wachsmuth und Herrn Oberfeldveternär Dr. Langfeldt ohne deren ständige Unterstützung es nicht möglich gewesen wäre, diese Dissertation anzufertigen. Die fachlichen Diskussionen und insbesondere die stets gewährte Unterstützung waren bei der Bearbeitung dieser Fragestellung unerlässlich.

Des weiteren gilt mein herzlicher Dank Herrn Oberfeldveternär PD Dr. H. Neubauer sowie Herrn PD Dr. P. Gallien, die mich mit viel Geduld und Diskussionsbereitschaft in die Geheimnisse der Molekularbiologie eingeführt haben.

Auch danken möchte ich Frau Oberstabsveternär Dr. B. Kohnen-Gaupp und Frau Dr. L. Sprague, die mir bei der Erstellung des Summary sehr schnell und konstruktiv geholfen haben.

Ein ebensolcher Dank gilt den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Laborabteilung II - Veterinärmedizin des ZInstSanBw KIE für Ihre Geduld mit einem gestressten Doktoranden. Genauso danke ich Herrn Hauke Schröder, ohne dessen Unterstützung die Literaturrecherche wesentlich aufwendiger geworden wäre.

Ein großer Dank gilt meinen Eltern und meinen Geschwistern. Ohne ein stets verständnisvolles aber auch zur Selbstkritik anleitendes Elternhaus stünde ich nicht dort, wo ich heute stehe.

Den größten Dank schulde ich meiner lieben Frau Charlotte. Sie hat mir trotz eigener Promotion stets den Rücken frei gehalten, immer Verständnis gehabt, wenn es mal wieder „an die Platte“ ging, um etwas für die ersehnten „zwei Buchstaben“ zu tun. Ohne ihre ständige Unterstützung hätte ich es nicht in diesem Zeitraum geschafft.