

**Nachweis und Charakterisierung von
Shigatoxin-bildenden *Escherichia coli*
in Wildwiederkäuern**

Marlene Eggert

München 2011

Aus dem
Department für Veterinärwissenschaften
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Arbeit angefertigt unter der Leitung von
Univ.Prof. Dr. Dr. h.c. E. Märtlbauer

Nachweis und Charakterisierung von Shigatoxin-bildenden *Escherichia coli* in Wildwiederkäuern

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

von

Marlene Eggert
aus Bad Säckingen

München 2011

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun
Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. Märtlbauer
Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Klee

Tag der Promotion: 12. Februar 2011

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VII
1 Einleitung	1
2 Literatur	3
2.1 Wildwiederkäuer – Jagd und Verzehr	3
2.2 Shigatoxin-bildende <i>Escherichia coli</i> (STEC)	6
2.2.1 Eigenschaften	8
2.2.2 Virulenzgene	10
2.2.3 Shigatoxin	17
2.2.4 Serovare	19
2.3 STEC beim Menschen	22
2.4 Reservoir für STEC	23
2.4.1 Haustiere	23
2.4.2 Wildtiere	24
2.5 Infektionswege	26
2.6 Rechtliche Bestimmungen	30
2.6.1 Wildbrethygiene	30
2.6.2 STEC im nationalen und europäischen Recht	31
2.7 Anreicherungsmedien für STEC	33
2.8 Polymerasekettenreaktion (PCR) für den Nachweis von STEC	35

3	Material und Methoden	39
3.1	Material	39
3.1.1	Proben	39
3.1.2	Nährmedien	41
3.1.3	Referenzstämme	41
3.1.4	PCR-Materialien	42
3.2	Methoden	43
3.2.1	Probennahme	43
3.2.2	Screening auf die Shigatoxingene <i>stx1</i> und <i>stx2</i>	44
3.2.3	Real-Time PCR Etablierung	47
3.2.4	Screening auf die Gene <i>eae</i> , <i>hlyA</i> , <i>saa</i> und <i>stx</i> -Subtypen	49
3.2.5	Serotypisierung	50
3.2.6	Vergleich von Anreicherungsmedien	50
3.2.7	Statistik	51
4	Ergebnisse	53
4.1	STEC bei Rothirschen und Rehen	53
4.1.1	Prävalenz	53
4.1.2	Alters- und Geschlechtsverteilung <i>stx</i> -positiver Proben	54
4.1.3	Isolate	56
4.1.4	Phänotypische Eigenschaften	57
4.2	Verteilung der Virulenzgene	58
4.3	Ergebnisse der Serotypisierung	60
4.4	PCR-Etablierung	61
4.5	Vergleich der Anreicherungsmedien	65
5	Diskussion	67
5.1	Prävalenz	67
5.2	Alters-und Geschlechtsverteilung	70
5.3	Genausstattung und Serovare der gewonnenen Isolate	71
5.4	PCR-Etablierung	73
5.5	Anreicherungsmedien im Vergleich	74
5.6	Schlussfolgerung	75
6	Zusammenfassung	77

7	Summary	79
8	Anhang	81
8.1	Anhang zu Material und Methoden	81
8.2	Anhang zu Ergebnisse	85
	Literaturverzeichnis	97
	Gesetzesverzeichnis	135
	Danksagung	137

Abbildungsverzeichnis

2.1	Männliche Exemplare von Reh (<i>Capreolus capreolus</i>) und von Rothirsch (<i>Cervus elaphus</i>)	4
2.2	Verwandtschaft pathogener <i>E. coli</i>	7
2.3	Aufbau des Shigatoxins	18
2.4	Mögliche Übertragungswege von STEC auf den Menschen	27
3.1	Vorgehen bei <i>stx</i> -positiven Bouillons	47
4.1	Amplifikationskurven der Virulenzgene und <i>stx</i> -Subtypen bei 56 °C	62
4.2	Gelelektrophorese der DNA-Amplifikate (Negativabbildung) . . .	63
4.3	Schmelzkurven der multiplex Real-Time PCR für <i>stx2e</i> und <i>stx2f</i> .	64
8.1	Api 20E einiger STEC	92
8.2	Schmelzkurven der <i>stx1</i> - und <i>stx2</i> -positiven Probe von Rothirsch Nr. 12	93
8.3	Schmelzkurven der Virulenzgene und <i>stx</i> -Subtypen bei 56 °C	93
8.4	Amplifikationskurven des Subtypen <i>stx1c</i>	94
8.5	Schmelzkurven des Subtypen <i>stx1c</i>	94

Tabellenverzeichnis

2.1	Phänotypische Eigenschaften von STEC im Vergleich zu <i>E. coli</i> . . .	9
2.2	Virulenzgene von STEC	17
2.3	Vorkommen von EHEC-Serovaren in Europa 2007/08	20
2.4	Vorkommen von EHEC-Serovaren in Deutschland und Bayern 2009	21
2.5	Vorkommen von STEC bei Wildwiederkäuern in Deutschland . . .	26
2.6	Auflistung einiger EHEC-Ausbrüche mit Infektionsursache	28
2.7	<i>Stx</i> -Screening mittels multiplex Real-Time PCR	36
2.8	PCR-Nachweisverfahren für Virulenzgene und <i>stx</i> -Subtypen	38
3.1	Probenmaterial	39
3.2	Überblick über die Tierdaten der beprobten Rothirsche	40
3.3	Überblick über die Tierdaten der beprobten Rehe	40
3.4	Referenzstämme für Positivkontrollen der Real-Time PCR	42
3.5	Primer für die Real-Time PCR	43
3.6	PCR-Ansätze für multiplex <i>stx</i> -Screening	45
3.7	Protokoll für Real-Time PCR	46
3.8	PCR-Ansatz für Virulenzgene und <i>stx</i> -Subtypen	48
3.9	PCR-Protokoll für die Etablierung	48
4.1	Prävalenz von <i>stx</i> -positiven Rothirschen und Rehen	54
4.2	Geschlechtsverteilung <i>stx</i> -positiver Rothirsche	54
4.3	Verteilung der <i>stx</i> -positiven Rothirschproben in Bezug zum Geschlecht	55
4.4	Verteilung der <i>stx</i> -positiven Rothirschproben in Bezug zum Alter .	55
4.5	Verteilung der <i>stx</i> -positiven Rehe hinsichtlich Geschlecht und Alter	56
4.6	<i>Stx</i> -positive Nährmedien und gewonnene Isolate aus Rothirsch- und Rehproben	57
4.7	Phänotypische Eigenschaften der 41 Isolate von Rothirschen und Rehen	57

4.8 Genkombinationen der 41 Isolate von Rothirschen und Rehen	58
4.9 Ergebnisse der 29 subtypisierten Isolate von 15 Rothirschen	59
4.10 Vergleich der Genkombinationen und der Serovare von Direkt- und Overnight-Platte	60
4.11 C_t -Werte der Primerpaare bei verschiedenen Annealingtemperaturen	62
4.12 Ermittelte Schmelztemperaturen der Virulenzgene und <i>stx</i> -Subtypen	64
4.13 Ergebnisse der Anreicherungsmedien mTSB+N und BPW	65
8.1 Geräte	81
8.2 Verbrauchsmaterialien und Reagenzien	82
8.3 Daten der untersuchten Rothirsche	83
8.4 Daten der untersuchten Rehe	84
8.5 Übersicht der positiven Proben bei Reh und Rothirsch	85
8.6 Probenmatrizes der <i>stx</i> -positiven Rothirschproben in Bezug zum Geschlecht	86
8.7 Probenmatrizes der <i>stx</i> -positiven Rothirschproben in Bezug zum Alter	86
8.8 Ergebnisse der Bestätigung mittels Api 20E	87
8.9 Virulenzgene und <i>stx</i> -Subtypen der 29 Isolate von Rothirschen und der 12 Isolate von Rehen	89
8.10 Serovare der 29 Isolate von Rothirschen und der 12 Isolate von Rehen	91
8.11 Ergebnisse des Fisher-Tests	95

Abkürzungsverzeichnis

ASU	Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
bp	Basenpaare
BPW	Buffered peptone water/ gepuffertes Peptonwasser
BRILA	Brillantgrün-Galle-Lactose-Bouillon
cfu	colony forming units/ koloniebildende Einheiten
C_t	Threshold Cycle
DAEC	Diffus adherente <i>E. coli</i>
DNA	Deoxyribonucleic Acid
D-Platte	Direkt-Platte
eae	<i>E. coli</i> attaching and effacing
EAEC	Enter aggregative <i>E. coli</i>
EAST 1	enteroaggregatives thermostabiles Enterotoxin
EC	<i>E. coli</i> Broth
ECD	<i>E. coli</i> Direct
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EFSA	European Food Safety Authority
EHEC	Enterohämorrhagische <i>E. coli</i>
Ehly	EHEC-Enterohämolysin
Ehx	EHEC- <i>E. coli</i> -toxin
EIEC	Enteroinvasive <i>E. coli</i>
EPEC	Enteropathogene <i>E. coli</i>
Esp	Extrazelluläre Serinprotease
ETEC	Enterotoxische <i>E. coli</i>
Gb3	Globotriaosylceramid
Gb4	Globotetraosylceramid

HC	Hämorrhagische Colitis
HUS	Hämolytisch-urämisches Syndrom
IfSG	Infektionsschutzgesetz
Iha	Iron-regulated gene A homologue adhesin
IrgA	Iron-regulated gene A
KatP	Katalase-Peroxidase
LEE	Locus of enterocyte effacement
LFGB	Lebensmittel- Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch
M.B.G.	Molecular Biology Grade Water
Water	
mTSB	modified Tryptic Soy Broth
MUG	4-Methylumbelliferyl-beta-D-Glucuronid
NMEC	Neonatal meningiale <i>E. coli</i>
NRL	Nationales Referenzlabor
ON-Platte	Overnight-Platte
Pas	Protein associated with secretion
PCR	Polymerase Chain Reaction/Polymerasekettenreaktion
RKI	Robert Koch-Institut
Saa	STEC Autoagglutinations-Adhesin
SMAC	Sorbitol-MacConkey
STEC	Shigatoxin-bildende <i>E. coli</i>
Stx	Shigatoxin
SubAB	Subtilase Zytotoxin
Tm	Melting Temperature/Schmelztemperatur
TSA	Tryptic Soy Agar
TSB	Tryptic Soy Broth
UPEC	Uropathogene <i>E. coli</i>
VTEC	Verotoxin-bildende <i>E. coli</i>
Vtx	Verotoxin

1 Einleitung

Shigatoxin-bildende *Escherichia coli* (STEC) erreichen als lebensmittelhygienisch-relevante Krankheitserreger zunehmend an Bedeutung (OLIVEIRA et al., 2007). Sie können beim Menschen Erkrankungen auslösen, die von milder Diarrhoe bis zum lebensbedrohlichen hämolytisch-urämischen Syndrom (HUS) reichen (JENKINS et al., 2003; WERBER et al., 2008). Hauptverantwortlich für das humanpathogene Potential von STEC ist das zytotoxische Shigatoxin (Stx) (MIKO und BEUTIN, 2009). Daneben wurden einige weitere Gene entdeckt, die in der Literatur als Pathogenitätsfaktoren diskutiert werden. Der Nachweis von STEC erfolgte schon aus zahlreichen Säugetieren, aber auch aus Vögeln und Muscheln (PIERARD et al., 1997; GOURMELON et al., 2006; LEOTTA et al., 2006; TASARA et al., 2008). Jedoch werden vor allem Hauswiederkäuer als Hauptreservoir für STEC angesehen. Insbesondere Rinder wurden häufig als Infektionsquelle für den Menschen identifiziert. In den letzten Jahren hat sich herausgestellt, dass Wildwiederkäuer als STEC-Ausscheider und als mögliche Infektionsquelle für den Menschen nicht zu unterschätzen sind (BARTELS und BÜLTE, 2010). Bisher sind in der Literatur jedoch nur wenige Studien vorhanden, die die STEC-Prävalenz und eine Charakterisierung von STEC-Isolaten bei Wildwiederkäuern untersucht haben.

Aus diesem Grund war das Ziel dieser Arbeit das Vorkommen von STEC in bayerischen Wildwiederkäuern zu untersuchen. Des Weiteren sollten gewonnene STEC-Isolate sowohl genotypisch, als auch phänotypisch näher charakterisiert werden. Hierfür erfolgte ein Screening der Proben mittels multiplex Real-Time PCR auf die Shigatoxingene *stx1* und *stx2*. *Stx*-positive Isolate wurden auf die weiteren Virulenzgene *eae*, *hlyA* und *saa*, sowie auf die *stx*-Subtypen *stx1c*, *stx1d* und *stx2c*, *stx2d*, *stx2e* sowie *stx2f* untersucht. Des Weiteren wurden die gewonnenen Isolate serotypisiert.

2 Literatur

2.1 Wildwiederkäuer – Jagd und Verzehr

Wildwiederkäuer gehören zoologisch der Ordnung Artiodactyla (Paarhufer) und der Unterordnung Ruminantia (Wiederkäuer) an. Weiter wird in die beiden Familien Cervidae (Geweihträger) und Bovidae (Hornträger) unterteilt. In Europa sind die Cervidae Reh (*Capreolus capreolus*), Sikahirsch (*Cervus nippon*), Damhirsch (*Dama dama*), Rothirsch (*Cervus elaphus*) und Elch (*Alces alces*), sowie die Bovidae Gams (*Rupicapra rupicapra*), Steinbock (*Capra ibex*) und Mufflon (*Ovis orientalis*) heimisch (CLAUSSEN und DAVID, 2000; N.N., 2008a). Der kleinste Geweihträger in Deutschland ist das Reh, gefolgt vom Sika-, Dam-, Rothirsch und Elch (N.N., 2008a).

Das Reh erreicht durch seine hohe Anpassungsfähigkeit in Mitteleuropa den größten Bestand unter den Cervidae (Abbildung 2.1). In Deutschland leben ca. zwei Millionen Rehe (CLAUSSEN und DAVID, 2000; N.N., 2010c). Das Sikawild kommt ursprünglich aus dem asiatischen Raum, importierte, ausgesetzte oder aus Gehegen ausgebrochene Tiere haben sich jedoch in den europäischen Wäldern angesiedelt. Bei den Damhirschen wird angenommen, dass sie vor ca. 130 000 Jahren in Europa weit verbreitet waren, durch die Eiszeit jedoch in den Mittelmeerraum gedrängt wurden. Daher sind die heutzutage wildlebenden Damhirsche ebenfalls auf Aussetzungen zurückzuführen. In Deutschland wird der Damhirschbestand auf etwa 80 000 Tiere geschätzt. In Mitteleuropa ist der Rothirsch heutzutage, im Gegensatz zu früher, ein reiner Bewohner der großen Wälder (Abbildung 2.1). Aktuell liegt der Rothirschbestand bei etwa 90 000 Stück in Deutschland (CLAUSSEN und DAVID, 2000; N.N., 2010a). Der Elch ist die größte Hirschart der Welt. Früher war er in den Wäldern Eurasiens weit verbreitet. In der heutigen Zeit ist der Elch in Skandinavien,

in der Gemeinschaft Unabhängiger Staaten der ehemaligen Sowjetunion und in Polen anzutreffen. In Mecklenburg-Vorpommern und Brandenburg wurden in letzter Zeit eingewanderte Elche aus Polen gesichtet (CLAUSSEN und DAVID, 2000). In Bayern sind die genannten Cervidae bis auf den Elch gleichfalls vertreten. Der Nationalpark Bayerischer Wald bietet vor allem Lebensraum für Rehe und Rothirsche (HEURICH et al., 2010). Die Rehdichte wird auf ein bis fünf Rehe pro km^2 geschätzt, der Rothirschbestand beträgt etwa 430 Tiere (HEURICH, 2010).



Abbildung 2.1 Männliche Exemplare von Reh (*Capreolus capreolus*) (Foto: Norbert Wimmer) und von Rothirsch (*Cervus elaphus*)

Im Bundesjagdgesetz (BJG) § 2 Absatz 1 sind alle in Deutschland jagdbaren Tierarten aufgelistet. Diese Tierarten definieren den Begriff Wild. Dem Haarwild gehört jedes Wild an, das ein Fell trägt (KUJAWSKI, 2009). In der Jägersprache werden die Paarhufer als Schalenwild bezeichnet. Dieses zählt, mit Ausnahme des Rehs, zum Hochwild. Das Reh gehört dem Niederwild an. Ein weiterer Fachbegriff ist die Jagdstrecke. Sie definiert die Gewichtsmenge oder die Stückzahl des erlegten Wildes in einem Jagdrevier bezogen auf das Jagdjahr (KUTZER, 2000). Im Jagdjahr

2006/07 betrug die Jagdstrecke in Deutschland 27 678 t. Über die letzten Jahre hinweg betrachtet sind die Menge an Wildbret aus heimischer Jagd sowie der Import angestiegen (GERING, 2004; N.N., 2010b). Wildbret vom Reh weist mit etwa 11 000 t im Jahr 2006/07 die größte Menge auf. Deutlich niedriger liegt das andere Haarwild, wie Rothirsche mit ca. 3 500 t und Damhirsche mit ca. 1 600 t (N.N., 2010b).

Das Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz geht von einem Jahresverbrauch pro Kopf von 450 g Wildfleisch aus (KUJAWSKI, 2009). 450 g entsprechen ungefähr 1 Prozent des gesamten Fleischkonsums eines Bundesbürgers pro Jahr (KUJAWSKI, 2009). Trotz der niedrigen Prozentzahl bedeutet dies, dass der Wildfleischkonsum in den letzten zehn Jahren in Deutschland zugenommen hat. Diese Zunahme ist auch in Zusammenhang mit Gammelfleischskandalen und der Nachfrage nach qualitativem 'Ersatzfleisch' zu sehen (GERING, 2004; LEHMANN et al., 2006).

Laut HURLIN und SCHULZE (2007) wird in Deutschland ein Selbstversorgungsgrad an Wildfleisch von etwa 64 Prozent erreicht, wobei ca. 3 Prozent aus landwirtschaftlicher Wildhaltung stammen. NADERER und HUBER (2005) zufolge bietet die landwirtschaftliche Wildhaltung besonders Zu- und Nebenerwerbslandwirten einen sich lohnenden Betriebszweig, sodass in Zukunft mit einem höheren Selbstversorgungsgrad für Wildfleisch gerechnet werden kann. Derzeit kommt Wildbret vom Reh größtenteils aus heimischen Gebieten. Anderes Haarwild wird dagegen meist importiert, wobei Neuseeland als bedeutendstes Exportland aufzuführen ist (GOLZE, 2005; RIEMELMOSER und RIEMELMOSER, 2006; KUJAWSKI, 2009). Nach FREUDENREICH (2000) ist Deutschland weltweit der größte Importeur von Wildbret.

Da Wildfleisch nach wissenschaftlichen Erkenntnissen ein hochwertiges, fettarmes, mineralstoffreiches und proteinhaltiges Produkt darstellt, wird es in Deutschland gerne als Nahrungsmittel verzehrt. Weitere Vorzüge ergeben sich aus der naturgemäßen Ernährung der Tiere und dem fehlenden Einsatz von Hormonen. Allerdings wird als Nachteil das hygienische Risiko von Wildfleisch aufgeführt (HURLIN und SCHULZE, 2007). Durch fehlerhaftes Aufbrechen und Handling des erlegten Wildes kann es zu bakteriellen Kontaminationen des Fleisches führen. Zusätzlich treten beim Wildtier zahlreiche Infektionen auf, die beim Menschen ebenfalls zu

Erkrankungen führen können, sogenannte Zoonosen. Zoonosen beim Wildtier können verminöser, bakterieller oder virologischer Natur sein. Bezüglich bakterieller Infektionen können *Salmonellen*, *Listerien* und Shigatoxin-bildenden *E. coli* (STEC) zu gefährlichen Erkrankungen beim Menschen führen (CLAUSSEN und DAVID, 2000; CONRATHS et al., 2004).

2.2 Shigatoxin-bildende *Escherichia coli* (STEC)

Der deutsche Kinderarzt Theodor Escherich isolierte 1885 aus dem Stuhl von Säuglingen ein bis dahin unbekanntes Bakterium und bezeichnete es *Bacterium coli commune* (ESCHERICH, 1885). 1958 wurde es zu Ehren seines Entdeckers offiziell in *Escherichia coli* (*E. coli*) umbenannt (KUHNERT et al., 2000). Taxonomisch wird das Genus *Escherichia* wie zahlreiche andere gram-negative Bakterien in die Familie Enterobacteriaceae eingeordnet (NATARO und KAPER, 1998). Neben den apathogenen, intestinal kommensalisch lebenden *E. coli* entstanden im Laufe der Evolution Stämme mit pathogenem Potenzial für Mensch und Tier (Abbildung 2.2). So vermutete LAURELLE (1889) schon einen Zusammenhang von *E. coli* mit einem Durchfallgeschehen. Mittlerweile konnte dargelegt werden, dass nicht nur enteropathogene, sondern auch extraintestinal pathogene *E. coli* vorkommen. Letztere unterteilt man in die Gruppe der uropathogenen *E. coli* (UPEC) und der neonatal meningialen *E. coli* (NMEC). Die enteropathogenen *E. coli* werden in folgende Kategorien aufgeführt (KUHNERT et al., 2000; KAPER et al., 2004):

- diffus adherente *E. coli* (DAEC)
- enteroaggregative *E. coli* (EAEC)
- enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC)
- enteroinvasive *E. coli* (EIEC)
- enteropathogene *E. coli* (EPEC)
- enterotoxische *E. coli* (ETEC)
- Shigatoxin-bildende *E. coli* (STEC)

Shigatoxin-bildende *E. coli* erhielten ihre Bezeichnung aufgrund der Entdeckung von O'BRIEN et al. (1977). Er und seine Arbeitsgruppe konnten in EPEC-Stämmen

ein Toxin nachweisen, das eine deutlich immunologische, strukturelle und biologische Verwandtschaft mit dem Shigatoxin (Stx) von *Shigella dysenteriae* Typ 1 aufwies.

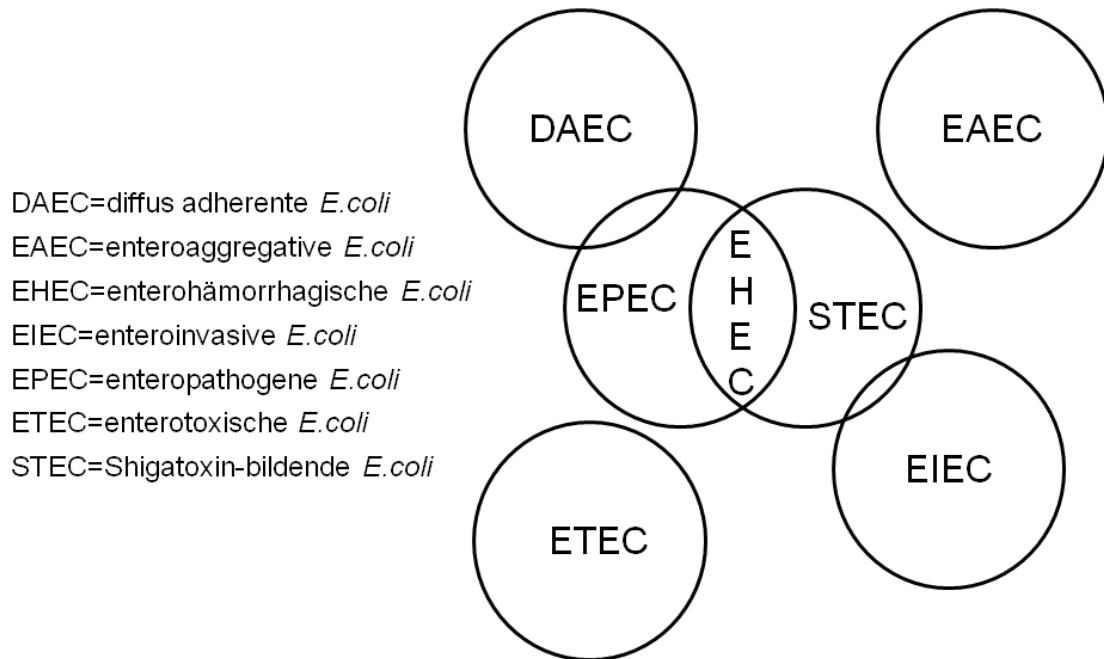


Abbildung 2.2 Verwandtschaft pathogener *E. coli*, nach O'SULLIVAN et al. (2006)

Im gleichen Zeitraum wurde ein Toxin, das auf Verozellen (Nierenzellen von afrikanischen Meerkatzen) zytotoxisch wirkte, als Verotoxin (Vtx) charakterisiert und der Bakterienstamm als Verotoxin-bildende *E. coli* (VTEC) bezeichnet (KONOWALCHUK et al., 1977). Es konnte bald nachgewiesen werden, dass es sich beim Stx und Vtx biochemisch um eine nahezu identische Verbindung handelt. Aus dieser Erkenntnis heraus können die Begriffe STEC und VTEC, einschließlich des Toxins, synonym verwendet werden (CALDERWOOD et al., 1996). Im Jahr 1982 wurde nach zwei Ausbrüchen mit blutigem Durchfall in Oregon und Michigan erstmals die humanpathogene *E. coli*-Seroovar O157:H7 beschrieben, das als Prototyp der enterohämorrhagischen *E. coli* (EHEC) gilt (RILEY et al., 1983; PANDA et al., 2010). Schon bald stellte sich heraus, dass diese Seroovar Stx produziert und somit zu den STEC gezählt werden kann. Daher ist das Robert Koch-Institut (RKI) der

Ansicht, dass EHEC synonym zu STEC/VTEC verwendet werden kann (BUSCH et al., 2007a). Andere Autoren bezeichnen nur solche Stämme als EHEC, die beim Menschen das hämolytisch-urämische Syndrom (HUS) oder eine hämorrhagische Colitis (HC) hervorrufen (LEVINE, 1987; PROULX et al., 2001; BÜLTE, 2002). So verweisen auch BÜLTE und GOLL (2006) darauf, dass der Begriff EHEC auf der klinischen Symptomatik basiert und nicht auf dem Virulenzfaktor Stx/Vtx. In dieser Dissertation wird der Begriff STEC für die *stx*-positiven Stämme und, in Anlehnung an LEVINE (1987) und BÜLTE (2002), der Begriff EHEC nur für humanpathogene Stämme verwendet.

2.2.1 Eigenschaften

E. coli ist 2,0 bis 6,0 μm lang, 1,1 bis 1,5 μm breit, gram-negativ, Oxidase und Urease negativ und bildet häufig eine Kapsel. Mit einem Wachstumsoptimum von 37 °C zählt es zu den mesophilen geraden Stäbchenbakterien. Die Generationszeit ist mit ca. 20 min im Vergleich zu anderen Bakterien relativ kurz. Es gibt sowohl *E. coli*, die peritrich Fimbrien besitzen und somit motil sind, als auch unbewegliche (SCHEUTZ und STROCKBINE, 2005). Die serologischen Eigenschaften basieren auf der Bestimmung von sogenannten Oberflächen (O)-, Kapsel (K)- und Hauch (H)-Antigenen. Die Bezeichnung Hauch rührt von dem charakteristischen Wachstum von begeißelten *E. coli* her (ORSKOV und ORSKOV, 1983; GYLES, 2007). Als Inhabitant des Darmtraktes von Mensch und Tier können sie aerob und anaerob wachsen. Im Kot ist *E. coli* mit 10^7 bis 10^9 koloniebildenden Einheiten (colony forming units, cfu) pro Gramm präsent und spielt daher auch als Index- bzw. als Indikatororganismus eine bedeutende Rolle (GYLES et al., 2004; BÜLTE und GOLL, 2006). *E. coli* zeigt zu etwa 98 Prozent eine positive Indolreaktion und kann zahlreiche Kohlenhydrate wie Glukose, Laktose und D-Sorbit fermentieren (GYLES, 1994; BÜLTE und GOLL, 2006; N.N., 1998). Etwa 95 Prozent der *E. coli*-Bakterien besitzen das Enzym beta-D-Glucuronidase und können das Substrat 4-Methylumbelliferyl-beta-D-Glucuronid (MUG) in das bei Anregung mit 366 nm Wellenlänge fluoreszierende 4-Methylumbelliferon umsetzen (KILIAN und BÜLOW, 1979; EFSA, 2009) (Tabelle 2.1).

STEC besitzen bis auf wenige Ausnahmen die gleichen charakteristischen Eigenschaften wie apathogene *E. coli*. Im Gegensatz zum α -Hämolysin von *E. coli*,

Tabelle 2.1 Phänotypische Eigenschaften von STEC im Vergleich zu *E. coli*

Eigenschaften	STEC	<i>E. coli</i>	Quelle
Sorbit-Fermentation	O157:H7 negativ	90-100 % positiv	ALEKSIC et al. (1992); SCHEUTZ und STROCKBINE (2005); SANCHEZ et al. (2009)
	O157:H- 50 % negativ		
Beta-D-Glucuronidase	O157:H7 negativ	96-97 % positiv	KEHL (2002); CHEEPHTAM und LAL (2009)
Enterohämolysin	ca. 70-95 % positiv	negativ	BÜLTE und GOLL (2006)
Rhamnose-Fermentation	O26 positiv	negativ	EFSA (2009)

das phänotypisch eine breite, klare Hämolysezone zeigt, besitzen einige STEC-Stämme als Besonderheit das Enterohämolysin. Phänotypisch stellt sich dies als eine schmale, trübe Hämolysezone dar (KAPER und O'BRIEN, 1998; SCHEUTZ und STROCKBINE, 2005; BÜLTE und GOLL, 2006).

Für EHEC O157:H7 konnten jedoch einige Besonderheiten festgestellt werden. Im Gegensatz zu 90 bis 100 Prozent der *E. coli* fermentiert die Serovar O157:H7 und etwa 50 Prozent der Serovar O157:H- kein Sorbit (ALEKSIC et al., 1992; SCHEUTZ und STROCKBINE, 2005; SANCHEZ et al., 2009). Ein weiteres Charakteristikum der Serovar O157:H7 ist das Fehlen der beta-D-Glucuronidase und somit kann diese Serovar nicht zur Fluoreszenz angeregt werden. Die Serovar O26 zeichnet sich dagegen durch die Schlüsselreaktion aus, als einziger *E. coli* den Zucker Rhamnose umzusetzen (EFSA, 2009). Da bis auf O157:H7 und O26 keine eindeutigen phänotypischen Erkennungsmerkmale für EHEC und STEC entdeckt worden sind, können diese bis heute nur durch den Nachweis ihrer Virulenzfaktoren, allen voran dem Shigatoxin, von anderen *E. coli* unterschieden werden.

2.2.2 Virulenzgene

Bei STEC/EHEC können zahlreiche Virulenzgene vorkommen. Für STEC ist das *stx*-Gen namensgebend und somit das bedeutendste Virulenzgen. Ein weiteres wichtiges Virulenzgen ist das *eae*, da dessen Genprodukt Intimin mit einer hohen Humanpathogenität assoziiert ist (FITZHENRY et al., 2002; TRAMUTA et al., 2008). Im Folgenden werden diese und weitere Virulenzgene näher beschrieben (Tabelle 2.2).

stx

Das *stx*-Gen kodiert für das Shigatoxin und wird als phagencodiertes Gen durch horizontalen Transfer in das chromosomale Bakteriengenom übertragen (KUHNERT et al., 2000; O'CLIVER und RIEMANN, 2002). Da eine Neutralisation durch Antiseren gegen das *Shigella dysenteriae* Typ 1 Toxin nur bei der Shigatoxin 1 Varianten stattfindet, unterscheidet man in die beiden Toxine Stx1 und Stx2 (BÜLTE und GOLL, 2006). Während Stx2 nur zu 56 Prozent mit der Aminosäuresequenz des Shigella-Toxins identisch ist, liegt bei Stx1 eine fast vollständige Übereinstimmung vor (JACKSON et al., 1987). Das *stx*-Gen kann des Weiteren auch bei Bakterienstämmen von *Citrobacter freundii* und *Enterobacter* spp. vorkommen (SCHMIDT et al., 1993).

Lange Zeit wurde angenommen, dass nur bei *stx2* Sequenzvariationen existieren und *stx1* ein hochkonserviertes Gen darstellt (NATARO und KAPER, 1998). *Stx2* wird in die Subtypen *stx2c*, *stx2d*, *stx2e*, *stx2f* und *stx2g* unterteilt, wobei bei einzelnen Subtypen nochmals Varianten vorkommen können (MELTON-CELSA et al., 2007). Von *stx1* wurde 1995 der Subtyp *stx1c* und im Jahr 2002 der Subtyp *stx1d* entdeckt (PATON et al., 1995; BÜRK et al., 2003).

Stx1c wurde von PATON et al. (1995) erstmals beschrieben. Bisher wurde *stx1c* vor allem aus humanen und ovinen und nur selten aus bovinen Isolaten gewonnen. Diese Isolate besaßen alle kein *eae*-Gen (KOCH et al., 2001; ZHANG et al., 2002a; KUCZIUS et al., 2004). BRETT et al. (2003) konnten bei fünf mit HUS assoziierten Isolaten, deren Serovare häufig auch beim Schaf detektiert werden, *stx1c* nachweisen. Eine weitere Studie fand nur *stx1c*-positive Isolate, die mit unblutiger Diarrhoe oder asymptomatisch beim Menschen verliefen (FRIEDRICH et al., 2002).

Im Jahr 2002 konnte am Institut für Hygiene und Technologie der Lebensmittel tierischen Ursprungs der Tierärztlichen Fakultät, LMU München, aus dem Bakterienstamm ONT:H19 aus bovinen Fäzes die Variante *stx1d* beschrieben werden. Die Übereinstimmung der Aminosäuresequenz mit dem bekannten Stx1 betrug nur 91 Prozent und wies eine Abweichung von 27 Aminosäuren auf (BÜRCK et al., 2003).

SCHMITT et al. (1991) entdeckten bei O157:H-, dass für die Heterogenität bezüglich dessen Antigenität neben *stx2* eine neue Variante, nämlich *stx2c* verantwortlich ist. Die Variante *stx2c* ist ebenso wie *stx2* meist assoziiert mit HUS und HC beim Menschen. Sie konnte alleine, aber auch oft mit *stx2* kombiniert, in bovinen Isolaten und in humanen klinischen Isolaten nachgewiesen werden (BÜLTE, 2002; FRIEDRICH et al., 2002).

Die Variante *stx2d* konnte bisher aus bovinen, ovinen, cerviden und humanen Fäzes isoliert werden, allerdings bisher nicht in Verbindung mit dem *eae*-Gen (PIERARD et al., 1998; RAMACHANDRAN et al., 2001; GOBIUS et al., 2003; LEHMANN et al., 2006; TASARA et al., 2008). Humane *stx2d*-positive Stämme konnten sowohl von erkrankten als auch von gesunden Menschen gewonnen werden (KESKIMAKI et al., 1998; STEPHAN und HÖLZLE, 2000). Ob die postulierte geringe Virulenz von *stx2d* allein bedingt ist durch den Subtyp oder aber durch das Fehlen weiterer Virulenzgene, ist noch nicht geklärt (BÜLTE und GOLL, 2006). Zudem entdeckten ZHANG et al. (2005) *stx2d*-Stämme, die zwar das vollständige Gen besaßen, jedoch das Toxin nicht exprimierten.

Die Ödemkrankheit der Absatzferkel wird durch *stx2e* hervorgerufen und ist der am längsten bekannte *stx*-Subtyp (WEINSTEIN et al., 1988). Dieser Subtyp bindet bevorzugt an den Globotetraosylceramid(Gb4)-Rezeptor und nicht wie alle anderen *stx*-Subtypen an den Globotriaosylceramid(Gb3)-Rezeptor. Da der Gb4-Rezeptor nur bei Schweinen vorkommt, wird angenommen, dass *stx2e* nur selten beim Menschen zu Erkrankungen führt (DE GRANDIS et al., 1989; FRIEDRICH et al., 2002). Laut KRAUSE und BEUTIN (2008) ist *stx2e* dennoch für knapp ein Prozent der EHEC-Erkrankungen beim Menschen verantwortlich.

Am Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg wurde im Jahr 2000 eine Prävalenz von 12,5 Prozent der bis dahin unbekanntem Variante *stx2f* in Taubenkot mittels PCR nachgewiesen (SCHMIDT et al., 2000). Oft besitzen

stx2f-positive STEC auch das *eae*-Gen, sie konnten jedoch einige Jahre lang nicht in Zusammenhang mit Erkrankungen beim Menschen gebracht werden (GROSSMANN, 2000; FRIEDRICH et al., 2002). GROSSMANN et al. (2005) betonten dennoch, dass im Hinblick auf den engeren Kontakt zwischen Mensch und Rassetaube *stx2f* eine humanmedizinische Beachtung erfordert. PRAGER et al. (2008) stellten schließlich den Bezug von *stx2f* zu Diarrhoe-assoziierten *E. coli* beim Menschen her.

Aus den STEC-Serovaren O2:H25 und Ont:H- wurde die Variante *stx2g* isoliert. Beide STEC-Stämme waren *eae*-negativ und konnten zwar aus bovinen, aber nicht aus humanen STEC-Isolaten nachgewiesen werden (LEUNG et al., 2003).

Da alle genannten *stx*-Varianten auf temperenten lambdoiden Phagen lokalisiert sind, können durch horizontalen Transfer apathogene *E. coli* zu STEC transduziert werden und umgekehrt STEC-Stämme das *stx*-Gen verlieren (KARCH et al., 1992; SCHMIDT et al., 1999; BIELASZEWSKA et al., 2007). Auf diesem Hintergrund basierend, können immer neue Virulenzgen-Variationen bei STEC entstehen. Hohe Humanpathogenität wird STEC mit den Virulenzgenen *stx2*, *stx2c* und *eae* in allen Kombinationen zugesprochen (FITZHENRY et al., 2002; UHLICH et al., 2006; PERSSON et al., 2007; TRAMUTA et al., 2008; CHASSAGNE et al., 2009).

eae

Auf dem LEE (locus of enterocyte effacement), einer chromosomalen Pathogenitätsinsel, liegt das Virulenzgen *eae*. Es kodiert für das 94 bis 97 kDa große Membranprotein Intimin, das eine stabile N-terminale Region und eine variable C-terminale Region aufweist. Das *eae*-Gen kann zusammen mit der Pathogenitätsinsel LEE nicht nur bei STEC, sondern auch bei EPEC, *Citrobacter rodentium* und *Hafnia alvei* vorkommen (JORES et al., 2003). *Eae* steht dabei für *E. coli* attaching and effacing, da durch das Genprodukt Intimin eine enge Adhäsion an das Darmepithel (attaching) und lokale Degenerationen (effacing) der Mikrovilli zustande kommen. Ein TypIII-Sekretionssystem transloziert den Intiminrezeptor Tir (die entsprechenden Gene sind ebenfalls auf LEE kodiert) in die Darmepithelzelle. Intimin kann somit an Tir binden, die Polymerisation von Aktin bewirken und typische Darmläsionen hervorrufen (GALLIEN et al., 2000; JORES et al., 2003; SHARMA, 2006).

1998 wurden mehrere Subtypen des *eae*-Gens entdeckt. Dabei wurden vier verschiedene Intimintypen als α , β , γ und δ -Intimin definiert. α -Intimin und δ -Intimin werden im Gegensatz zu dem weitverbreiteten β -Intimin seltener bei STEC gefunden. γ -Intimin wird meist in Verbindung mit den Serovaren O157:H7 und O157:H-nachgewiesen (ADU-BOBIE et al., 1998; OSWALD et al., 2000) Der Subtyp ϵ wurde erstmals in der Serovar O103:H2 von OSWALD et al. (2000) beschrieben und ist vor allem in den Serovaren O8, O11, O45, O103, O121 und O165 präsent. Aus Isolaten von spanischen Rindern konnte die neue Variante ξ bestimmt werden. Diese wurde von anderen Wissenschaftlern schon von vier STEC-Isolaten aus Kälbern in Deutschland und Belgien sequenziert, jedoch fälschlicherweise als Intimin ϵ angesehen. In dieser Studie konnte zudem bestätigt werden, dass ebenso wie bei STEC vom Menschen, die Intiminvarianten β und γ bei bovinen Isolaten am häufigsten vertreten sind (BLANCO et al., 2004). Zwischenzeitlich sind 18 Intimin-Subtypen entdeckt worden, die ZHANG et al. (2002b) mit griechischen Buchstaben von α (alpha) bis σ (sigma) versehen haben.

Bei Patienten mit HUS oder HC werden meist EHEC-Isolate ermittelt, die das *eae*-Gen beherbergen. Aus diesem Grund wird dem Virulenzfaktor Intimin in Zusammenhang mit schwerwiegenden Krankheitsverläufen eine bedeutende Rolle zugewiesen. Die Serovare O157:H7/H-, O26:H11/H-, O111:H2/H-, O103:H2/H8/H-, O145:H28/H- und O118:H16 sind regelmäßig mit *eae* assoziiert (BÜLTE, 2002). BEUTIN et al. (2004) konnten in Deutschland bei etwa 95 Prozent der HUS-Isolate das *eae*-Gen nachweisen. Daher sind BLANCO et al. (2006) der Ansicht, dass die Untersuchung auf Intimin für die Charakterisierung von klinischen Isolaten sowohl für die Epidemiologie als auch für die Routinediagnostik wertvoll ist.

hlyA

Ein weiteres wichtiges Virulenzgen ist das *hlyA*, das sich auf einem 60 MDa großen Plasmid befindet (SCHMIDT et al., 1995; BEUTIN et al., 2007). Es kodiert für das Enterohämolysin (EhlyA). Andere Autoren verwenden dagegen synonym die Bezeichnung Ehx (EHEC-*E. coli*-toxin und zugehörig das *ehxA*-Gen) (NATARO und KAPER, 1998). Als porenbildendes Zytolysin zerstört das Enterohämolysin eukaryotische Zellen (JÜRGENS et al., 2002). Des Weiteren wird vermutet, dass das Enterohämolysin STEC im Intestinum einen Selektionsvorteil bietet, indem es durch Erythrozytenlyse Eisen bereitstellt (GYLES et al., 2004). Das *hlyA* wurde erstmals bei EPEC von BEUTIN et al. (1988) beschrieben. Seitdem wurde *hlyA* häufig bei

EHEC und somit in Verbindung mit HUS und HC nachgewiesen (BIELASZEWSKA et al., 2008; PRADEL et al., 2008).

Dennoch ist die klinische Bedeutung dieses Virulenzfaktors umstritten. Untersuchungen von BOERLIN et al. (1999) zeigten keinen signifikanten Zusammenhang von *hlyA* mit klinischen Erscheinungen. In einer Studie von PRADEL et al. (2008) konnte jedoch das Enterohämolysin bei 60 Prozent der Patienten mit HUS oder mit HC beobachtet werden. SCHREIBER (2008) konnte bei 70 Prozent der STEC-Isolate aus humanen Stuhlproben *hlyA* detektieren, bei 45 Prozent wurden *hlyA* und *eae* bestätigt. Laut BÜLTE (2001) sind in Deutschland ca. 90 Prozent aller EHEC-Isolate von Patienten mit HUS oder mit HC *hlyA*-positiv, allerdings gilt dieser Prozentsatz auch für STEC-Isolate von symptomlosen Ausscheidern. Phänotypisch lassen sich *hlyA*-positive STEC auf gewaschenem Schafblutagar durch eine trübe Hämolysezone nachweisen. BOCKEMÜHL et al. (1997) zeigten jedoch, dass bis zu 16 Prozent der *hlyA*-Gen tragenden EHEC keine Hämolyse zeigen und somit ein 'stilles' *hlyA*-Gen besitzen.

saa

In Australien konnten PATON et al. (2001) aus der für einen HUS-Ausbruch verantwortlichen Serovar O113:H21 ein neues Gen bestimmen, das STEC Autoagglutinations-Adhesin-Gen (*saa*). Bei zwei weiteren mit HUS und drei mit blutiger Diarrhoe assoziierten Fällen wurde ebenfalls das *saa*-Gen gefunden (PATON et al., 2001; PATON und PATON, 2002). Dieses Gen ist auf einem Plasmid lokalisiert, kodiert das äußere Membranprotein STEC-Autoagglutinations-Adhesin (Saa) und ist durchweg mit LEE-negativen, aber überwiegend *hlyA*-positiven Stämmen assoziiert. Die Fähigkeit zur Adhärenz konnte an Hep2-Zellen bewiesen werden. *Saa*-positive STEC zeigten hierbei gegenüber *saa*-negativen Klonen eine deutlich höhere Anhaftung an die eukaryotischen Zellen. In der Studie von PATON et al. (2001) konnte ferner herausgestellt werden, dass das Saa ca. 25 Prozent Ähnlichkeit mit dem äußeren Membranprotein YadA, einem bedeutenden Virulenzfaktor von *Yersinia enterocolitica* besitzt. Aufgrund dieser Ergebnisse, könnte *saa* ein bedeutender Marker für humanpathogene LEE-negative STEC darstellen (PATON und PATON, 2002).

JENKINS et al. (2003) untersuchten zwei Jahre später das Vorkommen von *saa* aus bovinen und humanen STEC. Die Ergebnisse wiesen in diesem Fall auf keinen

Zusammenhang von *saa* mit STEC-Isolaten aus HUS-Patienten oder Durchfall-Patienten hin. Bemerkenswert war jedoch, dass 32 der 56 bovinen Stämmen *saa*-positiv waren. Wie auch bei den Untersuchungen von ORDEN et al. (2005) konnte hier bestätigt werden, dass *saa* mit LEE-negativen und *hlyA*-positiven STEC assoziiert ist. Bisher erwiesen sich ovine und caprine STEC als *saa*-negativ, dagegen bovine Stämme mit 50 Prozent und mehr als *saa*-positiv (JENKINS et al., 2003; ORDEN et al., 2005). In Südamerika wurde bei Wasserbüffeln *saa* sogar bei über 80 Prozent der STEC-Isolate gefunden (OLIVEIRA et al., 2007). *Stx1c*-positive Stämme aus Stuhlproben kamen zu 96 Prozent in Verbindung mit *saa* vor. Diese stammten sowohl von asymptomatischen Trägern als auch von Diarrhoe betroffenen Patienten (FRIEDRICH et al., 2003). Die Rolle des *saa*-Gens als Virulenzfaktor für STEC bleibt somit fraglich und liefert weiteren Forschungsbedarf (ORDEN et al., 2005).

astA

SAVARINO et al. (1996) beschrieben das *astA*-Gen, das ein enteroaggregatives thermostabiles Enterotoxin (EAST 1) kodiert. Dieses wirkt durch Aktivierung einer Guanylatzyklase enterotoxisch. EAST 1 konnte sowohl bei EHEC als auch bei EAEC und EPEC nachgewiesen werden (PAIVA DE SOUSA und DUBREUIL, 2001). Allerdings konnten STEPHAN und HÖLZLE (2000) bei STEC, die von asymptomatischen Trägern aus Stuhlproben isoliert wurden, ebenfalls bei etwa 6 Prozent das Gen *astA* bestätigen.

katP

Das Gen *katP* für die Katalase-Peroxidase KatP wurde von BRUNDER et al. (1996) auf dem Plasmid von O157:H7 entdeckt. Es wird davon ausgegangen, dass KatP reaktive Sauerstoffverbindungen der Abwehrzellen spaltet und so die Bakterienzelle vor Schäden bewahrt (BRUNDER et al., 1996).

iha

Ein weiteres Virulenzgen stellt das Gen *iha* dar. Es kodiert für das Membranprotein IrgA homologe Adhesin (Iha). Die Bezeichnung rührt von dem ähnlichen Eisen-regulierten Gen A (IrgA) von *Vibrio cholera* her. TARR et al. (2000) stellten die Vermutung auf, dass Iha bei *eae*-negativen *E. coli* die Adhärenz an Zielzellen steigern könnte. WU et al. (2010) konnten das *iha*-Gen bei STEC, die von Menschen und Kühen isoliert wurden, zu etwa 95 Prozent detektieren.

sepA-I, pas und esp

Die Gene *sepA-I*, *pas* und *esp* kodieren für Proteine des TypIII-Sekretionssystems. Die Gene für das Sekretionssystem liegen auf der Pathogenitätsinsel LEE (JARVIS und KARPER, 1996; BRUNDER et al., 1997; HAYASHI et al., 2001). TypIII-Sekretionssysteme kommen bei zahlreichen virulenten gram-negativen Bakterien vor und stellen bekannte Pathogenitätsfaktoren dar. Das TypIII-Sekretionssystem von STEC setzt sich aus einer Reihe von Proteinen zusammen, die für die Sekretion der Esp-Proteine zuständig sind. Zusammen spielen sie eine Rolle bei der Entstehung von Darmläsionen im Rahmen einer EHEC-Infektion (HAYASHI et al., 2001). FERNANDO DOS SANTOS et al. (2010) konnten die Gene *espP* und *espI* bei der Serovar O113:H21 zu 62 bzw. 35 Prozent identifizieren. KRESSE et al. (1998) konnte beweisen, dass das Protein Pas für die Sekretion der Esp-Proteine notwendig ist.

subA, subB

Das *subA*- und *subB*-Gen für das Subtilase Zytotoxin (SubAB) konnte bisher nur bei STEC nachgewiesen werden. Das Protein weist jedoch eine Homologie zur Subtilase von *Bacillus anthracis* auf (PATON und PATON, 2005; GYLES, 2007). Bisher konnten die toxischen Effekte von SubAB nur anhand von in vivo Versuchen in Mäusen erforscht werden. Bemerkenswerter Weise konnten bei den Mäusen die für HUS typischen Veränderungen festgestellt werden (WANG et al., 2007). Die Bedeutung dieses Zytotoxins für die Pathogenese der EHEC-Infektion beim Menschen ist noch nicht vollständig geklärt (PATON und PATON, 2010).

Tabelle 2.2 Virulenzgene von STEC

Gen	Protein	Quelle
<i>astA</i>	EAST 1 (enteroaggregatives thermostabiles Enterotoxin)	SAVARINO et al. (1991); PAIVA DE SOUSA und DUBREUIL (2001)
<i>eae</i>	Intimin	JERSE et al. (1990)
<i>esp</i>	Esp (extrazelluläre Serinprotease)	BRUNDER et al. (1997); JARVIS und KARPER (1996)
<i>hlyA</i>	EhlyA (Enterohämolysin)	KARCH et al. (1987); TOTH et al. (1990)
<i>iha</i>	Iha (iron-regulated gene A homologue adhesine)	TARR et al. (2000)
<i>katP</i>	KatP (Katalase Peroxidase)	BRUNDER et al. (1996)
<i>pas</i>	Pas (Protein associated with secretion)	KRESSE et al. (1998)
<i>saa</i>	Saa (STEC Autoagglutinations-Adhesin)	PATON et al. (2001)
<i>sepA-I</i>	TypIII-Sekretionssystem (secretion of <i>E. coli</i> proteins)	JARVIS und KARPER (1996); HAYASHI et al. (2001)
<i>stx</i>	Stx (Shigatoxin)	TESH und O'BRIEN (1991)
<i>subA</i> <i>subB</i>	SubAB (Subtilase Zytotoxin)	PATON et al. (1999); PATON und PATON (2010)
<i>tir</i>	Tir (Intiminrezeptor)	JORES et al. (2003)

2.2.3 Shigatoxin

Das Shigatoxin ist eines der potentesten Bakterientoxine. O'BRIEN und LAVECK (1983) ermittelten einen LD50-Wert in Mäusen von 2 µg/20 g Körpergewicht. Stx1 und seine Varianten zeigen verstärkte Toxinsynthese bei niedrigem Eisenlevel, die Stx2-Produktion wird dagegen deutlich durch Antibiotika wie Mitomycin C gesteigert (KIMMITT et al., 2000; GYLES et al., 2004; SHIMIZU et al., 2009). Stx2 löst im Vergleich zu Stx1 schwerwiegendere Erkrankungen beim Menschen aus (SIEGLER et al., 2003). Eine intra venam Infusion von Stx2 bei Mäusen stellte sich als 400 mal potenter als Stx1 heraus (TESH et al., 1993). Da Stx2 den Hauptvirulenzfaktor beim HUS darstellt, wird an der Entwicklung eines humanen Impfstoffes gegen diesen Subtyp gearbeitet. BENTANCOR et al. (2009) konnten eine DNA-Vakzine herstellen, die zu einer systemischen Antikörperbildung gegen Stx2 führte und auch in vivo das Toxin neutralisierte.

Das Shigatoxin besteht aus einer A-Untereinheit und fünf B-Untereinheiten (LACY und STEVENS, 1998) (Abbildung 2.3). Bei der 32 kDa großen A-Untereinheit kann ein ca. 28 kDa großes Peptid (A1) und ein 4 kDa großes Peptid (A2) unterschieden werden, wobei das A1- und A2-Fragment durch eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind (KURMANOVA et al., 2007). Die von zwei Cysteinmolekülen gebildete Disulfidbrücke stabilisiert die A-Kette und verhindert die Dissoziation von A1 vom Toxin-Rezeptor-Komplex (SAMUEL und GORDON, 1994; GARRED et al., 1997).

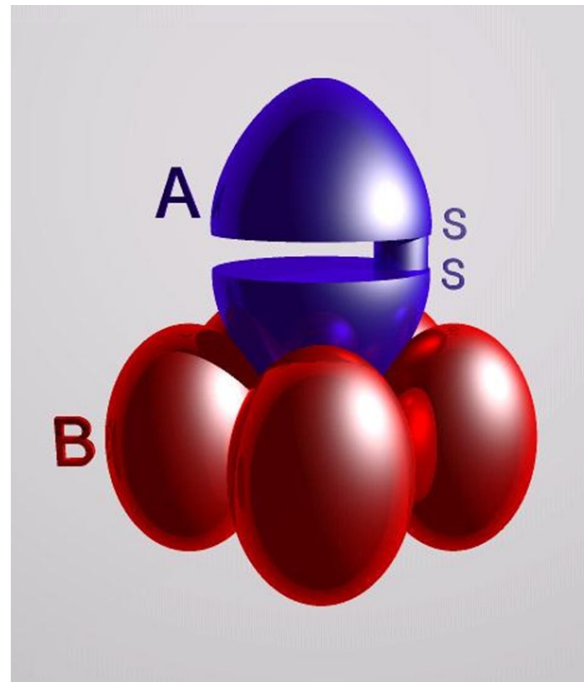


Abbildung 2.3 Aufbau des Shigatoxins (BORELL, 2005)

Jedes B-Monomer ist aus zwei antiparallelen β -Faltblättern und einer α -Helix aufgebaut und bewirkt als B-Pentamer die Bindung an den spezifischen Gb3-Rezeptor (FRASER et al., 2004). Eine Ausnahme hiervon stellt Stx2e dar, weil es eine deutlich höhere Affinität zu dem Gb4-Rezeptor besitzt (NATARO und KAPER, 1998; PHILPOTT und EBEL, 2003; CORNICK, 2006). Durch rezeptorvermittelte Endozytose wird das Holotoxin retrograd über den Golgi-Apparat zum endoplasmatischen Reticulum transportiert (ARAB und LINGWOOD, 1998; SANDVIG und VANDEURS, 2002). An diesem intrazellulären Transport von Stx sind Mikrotubuli, Dynein, ein Nuklearfaktor und die Proteinkinase δ maßgeblich beteiligt (HEYDERMAN et al., 2001; TORGERSEN et al., 2007). Nachdem die A-Untereinheit proteolytisch

gespalten wurde, kann das A1-Peptid, eine N-Glycosidase, an der Position A-4324 der 28S rRNA des 60S Ribosoms ein Adenin entfernen. Als Folge kann die Aminoacyl-tRNA nicht mehr andocken und die Proteinbiosynthese fortführen, was letztendlich im Zelltod endet (LINGWOOD, 1996; KARMALI, 2004). Dieses Phänomen konnte auch bei bakteriellen Ribosomen beobachtet werden, was zu der Vermutung führt, dass das Shigatoxin STEC gegenüber anderen intestinalen Bakterien einen Selektionsvorteil bietet (SUH et al., 1998).

Eukaryotische Zielzellen des Shigatoxins sind die zu den Gb3-reichen Geweben zählenden Endothelien, das ZNS und die Nierenzellen (OBRIG et al., 1993; PROULX et al., 2001; KARMALI, 2004). Das Toxin erreicht die Zellen, indem es die Darm-schranke passiert und sich an Leukozyten gebunden vom Blutkreislauf zu den Zielorganen transportieren lässt (TE LOO et al., 2001).

2.2.4 Serovare

Die Serotypisierung ist eine gängige Methode in der Epidemiologie und der medizinischen Diagnostik (KUHNERT et al., 2000). Kauffmann war im Jahr 1944 der erste Wissenschaftler, der *E. coli* serologisch klassifizierte und 20 O-Antigene beschrieb (GYLES, 1994). Seitdem wurde das Kauffmann-White-Schema auf heute 170 O-, 100 K- und 56 H-Antigenen für *E. coli*-Serovare erweitert (BÜLTE und GOLL, 2006). Mittlerweile sind mehr als 100 Serovare der STEC mit Erkrankungen beim Menschen assoziiert (BROOKS et al., 2005). Dies ist darin begründet, dass STEC-Serovare durch horizontalen Gentransfer Virulenzfaktoren übertragen bekommen können. So sind z.B. die beiden Serovare O100:H- und O127:H40 erst seit 2000 in Europa als Krankheitsverursacher in Erscheinung getreten (ORTH et al., 2006).

O157:H7 war die erste Serovar der STEC, das als Ursache für eine lebensmittelbedingte Infektion beim Menschen entdeckt wurde (KARMALI et al., 1983; RILEY et al., 1983). Diese Serovar ist in den **USA** für die meisten EHEC-Erkrankungen verantwortlich und seit 1994 meldepflichtig. Es wird geschätzt, dass in den USA jährlich 73 000 Krankheitsfälle und 61 Todesfälle durch O157:H7 verursacht werden (MEAD et al., 2008; MARLER, 2009). In **Europa** sind der Statistik des European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) zufolge zehn Serovare für humane

Erkrankungen am bedeutendsten (Tabelle 2.3). Insgesamt konnten in Europa für das Jahr 2008 3 159 Fälle bestätigt werden. Im Vergleich zum Vorjahr bedeutet dies einen Anstieg von fast neun Prozent (LAHUERTA et al., 2010). Aufgrund der ansteigenden EHEC-Fälle empfiehlt die European Food Safety Authority (EFSA), dass die EU Mitgliedstaaten ein einheitliches Überwachungsprogramm für STEC bei Tier- und Lebensmittelproben durchführen. Neben der Serovar O157 sollten auch O26, O103, O111 und O145 in das Monitoring-Programm aufgenommen werden (EFSA, 2009).

Tabelle 2.3 Vorkommen von EHEC-Serovaren in Europa 2007/08 (nach ECDC (2008))

Serovar	1.Quartal 2008		1.Quartal 2007	
	Fälle	Prozent	Fälle	Prozent
O157	171	66,8	100	59,2
O103	7	2,7	3	1,8
O26	6	2,3	21	12,4
O117	4	1,6	4	2,4
O128	3	1,2	1	0,6
O146	3	1,2	2	1,2
O11	2	0,8	0	0,0
O121	2	0,8	1	0,6
O5	2	0,8	0	0,0
O111	1	0,4	0	0,0
andere	55	21,4	37	21,8
Gesamt	256	100,0	169	100,0

In den europäischen Ländern variiert das Vorkommen von humanbedeutenden Serovaren in Abhängigkeit vom Land und Zeitraum. So wurde in Ungarn während des Zeitraums 2000 bis 2006 in fast 50 Prozent der Krankheitsfälle O157:H- nachgewiesen (MAG et al., 2010). Diese neue Sorbit-fermentierende Variante O157:H- wurde erstmals bei einem HUS Ausbruch in Bayern bestimmt (KARCH und BIELASZEWSKA, 2001). In der Schweiz konnten bei gesunden Menschen in 3,5 Prozent STEC gefunden werden. Diese Isolate gehörten einer Vielzahl verschiedener Serovare an, unter anderem auch O157. Die Isolate O91, O103, O128 und O157 stimmten in ihren serologischen Eigenschaften mit Isolaten aus HUS Patienten überein (STEPHAN und HÖLZLE, 2000). In Dänemark wurden nicht-O157 Serovare dreimal so häufig gefunden wie O157 (SCHEUTZ et al., 2000). In Spanien wurde

neben O157 vor allem O26 bei EHEC-Erkrankungen nachgewiesen (BLANCO et al., 2003). In Zentralfrankreich konnten alle Isolate aus Lebensmittelproben, Rindern und HUS-Patienten auf nur vier Serovare zurückgeführt werden: O91:H10/21 und OX3:H-/H21 (PRADEL et al., 2001). In **Deutschland** ist ebenfalls eine Abweichung von der Statistik des ECDC zu vermerken. Hier sind andere als O157 EHEC-Serovare für 80 Prozent der Gastroenteritis-Fälle verantwortlich (RKI, 2010). Untersuchungen von WERBER et al. (2008) ergaben, dass die in Deutschland am häufigsten isolierten Serovare aus Patienten, O157, O103 und O26, nur drei Prozent der Serovarisolat aus Lebensmitteln repräsentieren. Die Serovar O157:H- konnte in 13,5 Prozent der Fälle für HUS und in 0,45 Prozent der Fälle für Durchfall bei Patienten in Deutschland verantwortlich gemacht werden (KARCH und BIELASZEWSKA, 2001). BEUTIN et al. (2007) konnten zeigen, dass die in Deutschland seltener vorkommenden EHEC-Serovare O8:H19, O22:H8, O91:H21; O113:H21, O174:H2, O174:H21, O178:H19 und O179:H8 sowohl aus Rindern als auch aus Diarrhoe- und HUS-Patienten aller Altersklassen isoliert werden können. Zudem sind diese Serovare überwiegend in Kombination mit *stx2* und *stx2d* vertreten. In Bayern waren im Jahr 2009 die Serovare O26 und O157 bei EHEC-Infektionen am meisten vertreten, gefolgt von O145 und O103 (RKI, 2010). In der Tabelle 2.4 sind für das Jahr 2009 die in Bayern am häufigsten vorgekommenen EHEC/STEC-Serovare beim Menschen im Vergleich zu Deutschland insgesamt gelistet.

Tabelle 2.4 Vorkommen von EHEC-Serovaren in Deutschland und Bayern 2009 (nach RKI (2010))

Serovar	Deutschland	Bayern
O26	52	8
O157	45	8
O103	35	2
O91	28	-
O145	13	3
O111	6	1
andere	656	115
Gesamt	835	139

2.3 STEC beim Menschen

1983 wurde STEC als lebensmittelbedingte Infektion erstmals von RILEY et al. (1983) dokumentiert. Seitdem ist die Zahl der EHEC-Erkrankungsausbrüche beim Menschen weltweit drastisch gestiegen (BETTELHEIM, 2003). 2007 wurden 2905 EHEC-Fälle beim Menschen in 23 EU Ländern bestätigt (EFSA, 2009). In Deutschland wurden im Jahr 2009 836 EHEC-Fälle festgestellt (RKI, 2010). Etwa die Hälfte der übermittelten EHEC-Erkrankungen, einschließlich HUS, betraf Kinder unter fünf Jahren. Neben Kindern ist vor allem die Altersgruppe über 60 Jahre mit ca. zehn Prozent betroffen (RKI, 2006). Eine entscheidende Rolle für eine EHEC-Infektion spielt neben Alter und Immunstatus die geringe Infektionsdosis von etwa 100 Keimen (KARCH et al., 2000; CAPRIOLI et al., 2005).

Die Klinik einer EHEC-Erkrankung kann sich mit unblutiger Diarrhoe, HC, bis hin zum lebensgefährlichen HUS äußern (CHART et al., 1993; PRADEL et al., 2008). HUS besteht aus der Triade akute hämolytische Anämie, Thrombozytopenie und akutes Nierenversagen. Hinzu können sich Fieber und neurologische Ausfälle manifestieren (BONNET et al., 1998; WONG et al., 2000). Meist leiden die Patienten zunächst unter einer HC. Infolge der Inflammation des Dickdarms können Stx und Lipopolysaccharide die Blut-Darmschranke überwinden und zur Endothelschädigung, sowie zur Dysfunktion von Organen führen. Im Nierengewebe kommt es durch Thrombenbildung zur Ischämie mit Nierenzellschädigungen, bis hin zur Kortikalnekrose (KARPMAN et al., 1998; GILLESPIE und WONG, 2009). In Europa stellt HUS die Hauptursache für akutes Nierenversagen bei Kindern dar und endet in bis zu zehn Prozent der Fälle tödlich (GERBER et al., 2002; PERELLE et al., 2007). Therapeutisch sind vor allem supportive Maßnahmen wie Flüssigkeits- und Elektrolytersatz zur Forcierung der Diurese notwendig. Da Antibiotikaeinsatz vermehrt zu extraintestinalen Komplikationen führte, sind sie in der akuten Phase kontraindiziert (RKI und BGVV, 1997; RKI, 1999b).

2.4 Reservoirs für STEC

2.4.1 Haustiere

STEC konnte bei zahlreichen Nutztieren wie Hühnern, Schweinen, Pferden und Wiederkäuern nachgewiesen werden. Untersuchungen bei dänischen Legehennen und Masthähnchen auf die Serogruppe O157 im Zeitraum von 1996 bis 2000 ergaben eine Prävalenz von 0,5 bzw. 1,7 Prozent (SCHOUTEN et al., 2005). Bei Schweinen konnten in den USA ebenfalls STEC-Serovare isoliert werden, die mit Erkrankungen beim Menschen assoziiert sind (FRATAMICO et al., 2004). In Deutschland dagegen wiesen STEC-Isolate aus Schweinen nur Serovare auf, die typischerweise die Ödemkrankheit oder Schweinedysenterie auslösen (WIELER, 2009; MÜFFLING et al., 2007). Auch bei Pferden sind schon STEC ermittelt worden. 1999 stellte das RKI im Zuge einer HUS-Erkrankung bei einem Kleinkind aus Bayern als wahrscheinlichste Infektionsursache Ponys fest (RKI, 1999a).

Als Hauptreservoir für STEC werden jedoch Wiederkäuer angesehen (ASAKURA et al., 1998; NAGANO et al., 2004; VU-KHAC und CORNICK, 2008). Mehr als 400 verschiedene STEC-Serovare konnten bei gesunden Rindern isoliert werden und somit scheint STEC zur normalen Darmflora beim Wiederkäuer zu gehören (BLANCO et al., 2004; NAYLOR et al., 2005). Bei STEC-infizierten Kälbern konnte jedoch in einigen Fällen Durchfall beobachtet werden (SEPEHRISERESHT et al., 2009). Eine Studie in den USA ergab bei allen untersuchten Kälbern ein positives Ergebnis für STEC (CHRISTANCHO et al., 2008). WIELER et al. (2007) beprobten in Deutschland 221 Kälber im Alter von einer bis zwölf Wochen mittels rektalem Tupfer und wiesen dagegen nur bei 4,5 Prozent der Tiere STEC nach. Bei einer weiteren Studie in drei deutschen Mastbullenbetrieben und einem Milchviehbetrieb lag die durchschnittliche Prävalenz von STEC-positiven Rindern zwischen 40 und 60 Prozent. Darunter konnten auch Serovare wie O157, O103 und O26 identifiziert werden, die in Deutschland eine bedeutende Rolle hinsichtlich humaner Erkrankungen spielen (GEUE et al., 2002) (Tabelle 2.3). PERELLE et al. (2007) konnten diese bedeutenden Serovare ebenfalls bei 2,6 Prozent des beprobten Rinderhackfleischs und bei 4,8 Prozent der Rohmilchproben feststellen. BEUTIN et al. (2000) konnten sowohl von Rindern als auch von an Durchfall oder HUS erkrankten Menschen

die Serovar O116:H16/NM isolieren und somit die Bedeutung von Rindern als EHEC-Quelle bestätigen. Die fäkale Ausscheidung von STEC ist Untersuchungen zufolge bei Rindern von der Jahreszeit und der Ernährung abhängig (CIZEK et al., 1999; STEVENS et al., 2002; VANSELOW et al., 2005).

2.4.2 Wildtiere

Untersuchungen von PIERARD et al. (1997) auf STEC bei Wildfleisch führten zu positiven Nachweisen bei Wildkaninchen, Wildschweinen, Antilopen und Wildvögeln wie Rebhühner, Tauben, Strauße und Fasane. In Japan und Finnland konnten bei Wildvögeln jeweils bei einer Möwe bzw. bei einer Taube STEC nachgewiesen werden (MAKINO et al., 2000; KOBAYASHI et al., 2002). In England konnten bei Wildvögeln zu etwa ein bis drei Prozent die Serovar O157 identifiziert werden (WALLACE et al., 1997). Den Ergebnissen einer in Deutschland durchgeführten Studie von MIKO und BEUTIN (2009) zufolge stellt Wild ein bedeutendes Reservoir für potentiell humanpathogene STEC dar. Die Hälfte der von ihnen isolierten STEC aus Hasen, Wildschweinen und Wildwiederkäuern waren Serovare, die schon mit Erkrankungsfällen beim Menschen in Zusammenhang gebracht wurden. Das Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) bestätigte 2007, dass STEC häufiger aus Wildfleisch als aus Rindfleisch nachgewiesen wurde und es mittlerweile eine größere Gefahr als Rindfleisch für EHEC-Infektionen beim Menschen birgt (BfR, 2007).

Insbesondere Wildwiederkäuer werden neben Rindern als primäres Reservoir angesehen (BÜLTE, 2002; BARTELS und BÜLTE, 2010). In den USA konnte bei Elchen eine STEC-Prävalenz von ca. 20 Prozent festgestellt werden (GILBREATH et al., 2009). Die für dieses Land bedeutendste Serovar O157:H7 konnte beim Weißwedelhirsch laut einer Studie von RENTER et al. (2001) zu 0,25 Prozent, bei einer anderen Studie von DUNN et al. (2004) zu 0,3 bis 0,4 Prozent und nach Untersuchungen von RICE et al. (2003) zu ca. 0,8 Prozent nachgewiesen werden. FISCHER et al. (2001) infizierten sechs Weißwedelhirsche mit der Serovar O157:H7 und konnte die Übertragung auf einen nicht infizierten Weißwedelhirsch demonstrieren. Die pathologische Untersuchung der infizierten Weißwedelhirsche ergab, dass STEC vor allem im Dickdarm über längere Zeit persistieren kann. Die Ergebnisse sprechen zudem

dafür, dass cervide O157:H7-Stämme sich in einem infizierten Wildwiederkäuer schneller verbreiten und länger persistieren als bovine oder humane O157:H7-Stämme (FISCHER et al., 2001).

In Spanien wiesen drei der 206 untersuchten Rektaltupfer von Rothirschen O157:H7 auf. Einer der isolierten Stämme konnte untypischerweise Sorbit fermentieren und MUG spalten (GARCIA-SANCHEZ et al., 2007). PRITCHARD et al. (2009) konnten in Großbritannien bei 27 Kotproben von Wildwiederkäuern in einem Fall O157:H7 nachweisen. In Skandinavien führten Studien bei Rentieren, Rot- und Damhirschen, sowie bei Rehen auf O157:H7 nur zu negativen Ergebnissen (LAHTI et al., 2001; WAHLSTRÖM et al., 2003). Untersuchungen auf STEC bei Rentieren führten bei einer Studie in einem Fall, bei einer anderen Studie in drei Fällen zu positiven Ergebnissen. Dabei handelte es sich immer um STEC mit einem *stx1*-Gen (ASCHFALK et al., 2003; KEMPER et al., 2006). LILLEHAUG et al. (2005) isolierten aus zwei Rothirschen zwei *eae*-negative STEC-Stämme der Serovar O103. Der eine Stamm wurde nur *stx1* positiv, der andere dagegen *stx1* und *stx2* positiv getestet. In Belgien konnten ebenfalls nur *eae*-negative STEC bei Fleisch von Rehen, Rot- und Damhirschen detektiert werden. Hierbei lag die Nachweisrate beim Rothirsch mit 30 STEC-positiven aus 74 Tieren (ca. 41 Prozent) jedoch deutlich höher. Damhirsche waren zu 22 Prozent und Rehe zu 79 Prozent positiv (PIERARD et al., 1997).

Im Rahmen der Lebensmittelüberwachung wird Wildfleisch in Deutschland regelmäßig beprobt. Am staatlichen Veterinäruntersuchungsamt in Hannover reagierten von 53 Rehfleischproben sechs in der PCR *stx*-positiv. Davon ergab die Serotypisierung, dass zwei Stämme Serovare aufwiesen, die schon Erkrankungen beim Menschen ausgelöst hatten (THOMS, 1999). GALLIEN et al. (1999) führten bei STEC-positiven Isolaten aus u.a. Hirschbraten, Hirsch- und Wildgulasch ein Screening auf Virulenzgene und eine *stx*-Subtypisierung durch. Dabei wurden bei zwei Proben *stx2* und *stx2d*, bei einer Probe *stx1* und *stx2* detektiert. Die beiden Gulaschproben waren zudem *hlyA*-positiv. Untersuchungen von Wildfleisch im Rahmen der Lebensmittel-Planproben 2005 ergaben in ca. 15 Prozent STEC-positive Resultate. Als häufigste Serovar wurde hierbei O146 identifiziert, das zu den mit humanen Erkrankungen assoziierten Serovaren gehört (HARTUNG, 2007). LEHMANN et al. (2006) untersuchten 56 Kotproben von Rehen, Rot- und Damhirschen in Deutschland (Tabelle 2.5). Davon erwiesen sich etwa 52 Prozent STEC-positiv, alle jedoch *eae*-negativ. Keines der STEC-Isolate gehörte der Serovar O157 an, jedoch

konnten mit den Serovaren O21, O128 und O146 potentiell humanpathogene Isolate identifiziert werden (BARTELS und BÜLTE, 2010).

Tabelle 2.5 Vorkommen von STEC bei Wildwiederkäuern in Deutschland

Proben von Wild	Anzahl	STEC-positiv	Quelle
Rehfleisch	53	6 (11 %)	THOMS (1999)
Hirschfleisch	keine Angabe	2	GALLIEN et al. (1999)
Kot von Rehen, Rot- und Damhirschen	56	29 (52 %)	LEHMANN et al. (2006)
Wildfleisch ¹	162	24 (15 %)	HARTUNG (2007)
Wildfleisch ¹	123	13 (11 %)	HARTUNG (2008)
Hirsch	15	3 (20 %)	DIEPOLDER (2008)
Reh	61	19 (31 %)	DIEPOLDER (2008)
Damwild	7	0	DIEPOLDER (2008)

¹keine genaueren Angaben vorhanden

2.5 Infektionswege

Die Übertragungswege für STEC sind vielfältig (SNEDEKER et al., 2009) (Abbildung 2.4 und Tabelle 2.6). Eine Möglichkeit stellt der direkte Kontakt zu tierischen oder zu humanen Ausscheidern dar. So ereignete sich in Großbritannien 1997 ein EHEC-Ausbruch in zwei Familien, die zuvor eine Farm besucht hatten. Die Bakterienstämme der Erkrankten waren identisch mit Stämmen, die aus drei Kälbern und zwei Ziegen der Farm isoliert werden konnten (PRITCHARD et al., 2000). Von zwei ähnlichen Fällen wurde einige Jahre später aus den USA und den Niederlanden berichtet (CRUMP et al., 2002; HEUVELINK et al., 2002). In einem der beiden Fälle erkrankte ein Kind an HUS, nachdem es einen Streichelzoo besucht hatte. Die Infektion erfolgte in diesem Fall durch Schafe und Ziegen (HEUVELINK et al., 2002). Im anderen Fall konnte ein Zusammenhang von erkrankten Besuchern

mit STEC-infizierten Kühen des Betriebes hergestellt werden (CRUMP et al., 2002). Transmission von EHEC von Haustieren wie Kaninchen, Katzen und Hunde auf den Menschen sind ebenfalls möglich (GARCIA und FOX, 2003; SANCAK et al., 2004; KRAUSE et al., 2005). So konnten BUSCH et al. (2007b) bei einem an HC erkrankten Mädchen die Katze der Familie als asymptomatischen Ausscheider ermitteln. Menschen als STEC-Ausscheider sind als direkte Infektionsquelle, oder auch als indirekte, durch von ihnen kontaminierte Lebensmittel für ihre Mitmenschen nicht zu unterschätzen (WHO, 2010).

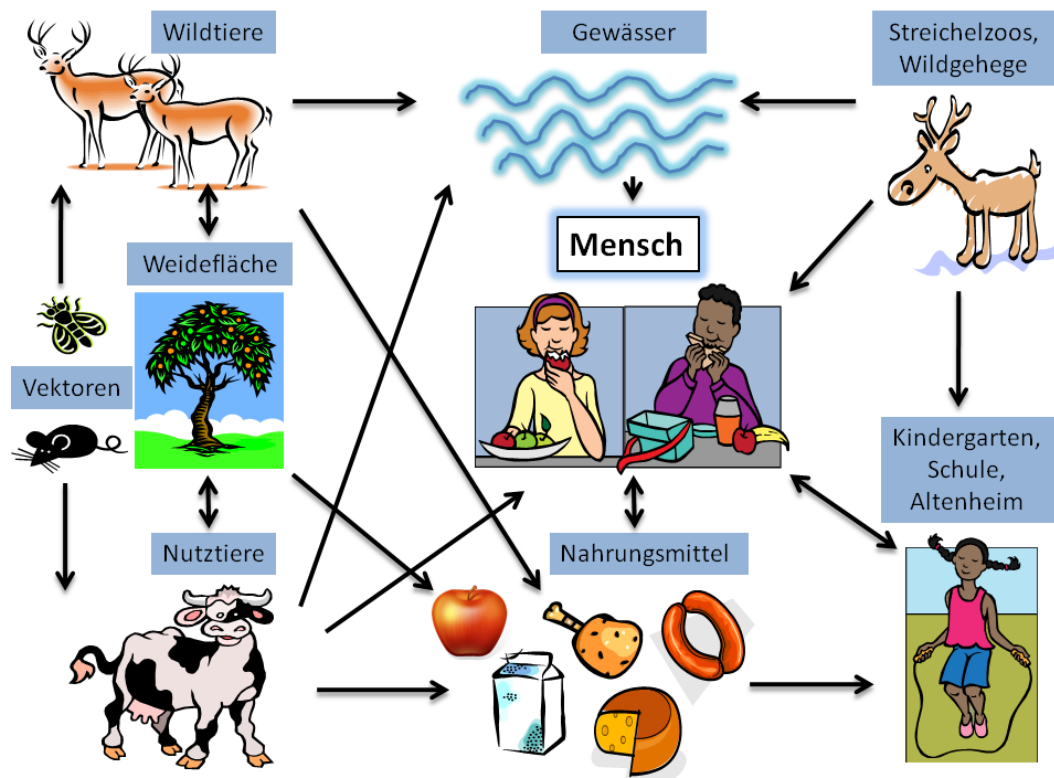


Abbildung 2.4 Mögliche Übertragungswege von STEC auf den Menschen

Häufig wurden auch EHEC-Ausbrüche beschrieben, bei denen eine Transmission von STEC durch Lebensmittel stattfand (SNEDEKER et al., 2009). Hierbei stellten vor allem rohe oder nur ungenügend gegarte Lebensmittel eine Gefahr dar. Es konnten schon STEC-Nachweise für verschiedene Gemüse, Muscheln, Rohmilch- und Rohmilchprodukte, sowie für Fleischprodukte erbracht werden (TEUFEL et al., 1998; PONTELLO et al., 2003; KUMAR et al., 2004; GOURMELON et al., 2006; MAKI, 2006; CARO und GARCIA-ARMESTO, 2007). Als Infektionsquelle für EHEC-Ausbrüche weisen tierische Lebensmittel eine hohe Signifikanz auf.

Tabelle 2.6 Auflistung einiger EHEC-Ausbrüche mit Infektionsursache

Land	Jahr	EHEC-Quelle	Transmission	Quelle
Dänemark	2007	Rinderwurst	Verzehr	ETHELBERG et al. (2009)
Deutschland	1999	Ponys	Kontakt	RKI (1999b)
Deutschland	2000	Seemerrolle (Rindfleisch)	Verzehr	WERBER et al. (2002)
Deutschland	2004	Katze	Kontakt	BUSCH et al. (2007b)
Deutschland	2006	Rohmilch	Verzehr	DREESMAN et al. (2007)
Frankreich	2002	Hammelfleisch und Geflügelpastete	Verzehr	ESPIE et al. (2006)
Großbritannien	1994	Kühe und Ziegen	Kontakt	SHUKLA et al. (1995)
Großbritannien	1997	Kälber und Ziegen	Kontakt	PRITCHARD et al. (2000)
Großbritannien	1997	Familienmitglied	Kontakt	PRITCHARD et al. (2000)
Italien	2004	Schweinesalami	Verzehr	CONEDERA et al. (2007)
Japan	1996	Rettich	Verzehr	WHO (2010)
Niederlande	2000	Schafe und Ziegen	Kontakt	HEUVELINK et al. (2002)
Niederlande	2005	Rindertartar	Verzehr	DOORDUYN et al. (2006)
USA	1995	gedörrtes Hirschfleisch	Verzehr	KEENE et al. (1997)
USA	1996	Apfelsaft	Verzehr	CODY et al. (1999)
USA	1999	Wasser	Verzehr	FELDMAN et al. (2002)
USA	2000	Kühe	Kontakt	CRUMP et al. (2002)
USA	2001	Hirschfilet	Verzehr	RABATSKY-EHR et al. (2002)
USA	2006	Spinat	Verzehr	MAKI (2006)
USA	2007	Hirschwurst	Verzehr	AHN et al. (2009)

In Deutschland kam es 2006 nach Rohmilchverzehr zu einem EHEC-Ausbruch mit 59 Beteiligten (DREESMAN et al., 2007). Der Verzehr von kontaminierten Fleischprodukten wie z.B. Salami, Wurst oder Fleischpastete stellt eine weitere Hauptursache für Erkrankungsfälle dar (ESPIE et al., 2006; CONEDERA et al., 2007; ETHELBERG et al., 2009).

Als Quelle für STEC-Infektionen standen bisher vor allem Lebensmittel, die von landwirtschaftlichen Nutztieren hergestellt wurden, im Blickpunkt (BARTELS und BÜLTE, 2010). Jedoch stellte das BfR im Rahmen von bakteriellen Lebensmitteluntersuchungen fest, dass Wildfleischproben eine dreifach so hohe Prozentzahl für STEC wie Rindfleisch aufwiesen (HARTUNG, 2008). In den USA wurden in den letzten 15 Jahren schon von vier EHEC-Ausbrüchen berichtet, die auf Wildwiederkäuerfleisch zurückgeführt werden konnten. In jedem der Fälle handelte es sich um die Serovar O157:H7 (KEENE et al., 1997; CODY et al., 1999; RABATSKY-EHR et al., 2002; AHN et al., 2009). Bei einem der Ausbrüche wurde bekannt, dass nicht der Verzehr von Hirschfleisch die Ursache war, sondern die Kontamination von verspeisten Äpfel durch Fäzes der Hirsche. Der daraus gewonnene Apfelsaft rief die Erkrankung hervor (CODY et al., 1999). Die Kontamination von Pflanzen, Früchten oder Wasser durch Fäzes von Wildtieren stellt folglich einen weiteren Übertragungsweg für EHEC dar (CODY et al., 1999; BÜLTE, 2002; FELDMAN et al., 2002).

Zwischen den verschiedenen Tierarten kann STEC durch die Nutzung gemeinsamer Weideflächen übertragen werden (SARGEANT et al., 1999). In einer Studie von RICE et al. (1995) konnte demonstriert werden, dass Hauswiederkäuer und Hirsche mit einem identischen STEC-Stamm infiziert waren. Insekten und Nagetiere können als lebende Transmissionsvektoren eine Rolle spielen. In einer Studie von AHMAD et al. (2007) wurden Fliegen mit der Serovar O157:H7 infiziert. Alle Kälber, die diesen Fliegen exponiert wurden, konnten schon tags darauf O157:H7 positiv getestet werden. Die Bedeutung von Vögeln und Nagetieren als Übertragungsvektoren konnte durch Untersuchungen von MÖLLER-NIELSEN et al. (2004) gezeigt werden. STEC-Isolate aus einem Star und einer norwegischen Ratte stimmten mit STEC-Isolaten aus Rindern von einem nahegelegenen Betrieb überein.

2.6 Rechtliche Bestimmungen

2.6.1 Wildbrethygiene

Am 1. Januar 2005 trat die Verordnung (EG) Nr. 178/2002 zur Festlegung der allgemeinen Grundsätze und Anforderungen des Lebensmittelrechts, zur Errichtung der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit und zur Festlegung von Verfahren zur Lebensmittelsicherheit in Kraft. Als Basisverordnung liefert sie die Rahmenbedingungen für die Lebensmittel- und Fleischhygiene. Das sogenannte EU-Hygienepaket umfasst neben dieser noch folgende drei Verordnungen:

- Verordnung (EG) Nr. 852/2004 über Lebensmittelhygiene
- Verordnung (EG) Nr. 853/2004 mit spezifischen Hygienevorschriften für Lebensmittel tierischen Ursprungs
- Verordnung (EG) Nr. 854/2004 mit besonderen Verfahrensvorschriften für die amtliche Überwachung von zum menschlichen Verzehr bestimmten Erzeugnissen tierischen Ursprungs

Zudem wurden 2007 auf Bundesebene Durchführungsverordnungen erlassen, die das Hygienepaket ergänzen und deren Durchführung auf dem Gebiet der Lebensmittelhygiene im Detail erläutern.

Gemäß Artikel 2 der Verordnung (EG) Nr. 178/2002 beinhaltet der Begriff Lebensmittel "alle Stoffe oder Erzeugnisse, die dazu bestimmt sind oder von denen nach vernünftigem Ermessen erwartet werden kann, dass sie in verarbeitetem, teilweise verarbeitetem oder unverarbeitetem Zustand vom Menschen aufgenommen werden". Fleisch wird im Sinne des Anhang I der Verordnung (EG) Nr. 853/2004 definiert als "alle genießbaren Teile von Tieren, einschließlich Blut". Unter den Begriff Lebensmittelunternehmer fallen nach Artikel 3 der Verordnung 178/2002 alle Unternehmer, "die mit der Produktion, der Verarbeitung und dem Vertrieb von Lebensmitteln zusammenhängende Tätigkeit ausführen".

Demzufolge unterliegt Wildbret als Lebensmittel den genannten Verordnungen. Dem Jäger bzw. Revierinhaber wird als Lebensmittelunternehmer die Verantwortung übertragen, nur Wildbret in Verkehr zu bringen, das gemäß dem EU-Hygienepaket gehandhabt wurde. Der Jäger muss im Sinne des Abschnitts IV Anhang III der Verordnung Nr. 853/2004 auf dem Gebiet der Wildpathologie, der Produktion und der Behandlung von Wildbret geschult sein, um als kundige Person eine Fleischuntersuchung durchführen und Wildbret für den menschlichen Verzehr in Verkehr bringen zu dürfen. Werden keine gesundheitlich bedenklichen Merkmale festgestellt, so legt die kundige Person einen Wildursprungsschein bei. Diese Erklärung beinhaltet zudem den Ort, das Datum und den Zeitpunkt des Erlegens. Werden hingegen auffällige Merkmale wie abnorme Verhaltensweisen, Erkrankungen oder erhebliche anatomische Abweichungen beanstandet, so ist dies der zuständigen Veterinärbehörde zu melden und das Ausstellen des Wildursprungsscheins zu unterlassen. Beim Transport von erlegtem Wild ist zu beachten, dass es bei einer Transportdauer von über zwei Stunden gekühlt werden muss, es nicht übereinander gestapelt wird und es vor Verschmutzung zu schützen ist. Nach dem Aufbrechen ist Großwild bei einer Kerntemperatur von maximal 7°C zu lagern. An den Endverbraucher und Einzelhandel darf nur ausgeweidetes und aufgebrochenes Wild zum Verzehr abgegeben werden.

Durch das EU-Hygienepaket wurden die Bestimmungen für das Erlegen, Zurichten, Untersuchen und in Verkehrbringen von Wild verschärft. Damit soll gewährleistet werden, dass Wildbret als ein sicheres und hygienisch unbedenkliches Lebensmittel den Verbraucher erreicht (BFR, 2006; N.N., 2006).

2.6.2 STEC im nationalen und europäischen Recht

In Deutschland basieren die Aufzeichnungen von Zoonoseerregern- und ausbrüchen auf dem Tierseuchengesetz, dem Lebensmittel-Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch (LFGB) und dem Gesetz zur Verhütung und Bekämpfung von Infektionskrankheiten beim Menschen (Infektionsschutzgesetz/IfSG) (HARTUNG, 2006). Seit 2000 ist der Verdacht auf HUS, die Erkrankung an HUS oder der Tod durch HUS im Sinne des § 6 IfSG meldepflichtig. Ebenso ist eine infektiös bedingte akut verlaufende Gastroenteritis meldepflichtig, sofern ein Ausbruchsgeschehen

vorliegt oder eine Person betroffen ist, die beruflich gemäß § 42 IfSG mit Lebensmittel umgeht. Im § 7 IfSG sind alle meldepflichtigen Krankheitserreger gelistet. In diesem Paragraph ist vermerkt, dass sowohl der direkte als auch der indirekte Nachweis von EHEC namentlich zu melden ist, sofern der Hinweis auf eine akute Infektion vorliegt.

Für Gemeinschaftseinrichtungen im Sinne des § 33 IfSG wie Kinderkrippen, Kindergärten, Schulen oder Heime gelten zusätzliche Auflagen. So dürfen Personen, bei denen eine EHEC-Erkrankung oder ein Verdacht vorliegt, nach § 34 IfSG in Gemeinschaftseinrichtungen keinerlei Tätigkeiten ausüben solange aus ärztlicher Sicht das Risiko einer Weiterverbreitung der Krankheit gegeben ist. Handelt es sich um Betreute einer Gemeinschaftseinrichtung oder um Personen in einer Wohngemeinschaft, die an EHEC erkrankt sind oder dessen verdächtig sind, so ist es ihnen untersagt, an Veranstaltungen teilzunehmen und Räume der Gemeinschaftseinrichtung bzw. Wohngemeinschaft zu betreten. EHEC-Ausscheider bedürfen der Zustimmung des Gesundheitsamtes um Gemeinschaftseinrichtungen besuchen zu dürfen. Zudem ist es ihnen verboten mit den in § 42 IfSG genannten Lebensmittel in Lebensmittelbetrieben, Gaststätten oder Einrichtungen zur Gemeinschaftsverpflegung umzugehen.

Um EHEC-Ausbrüche einzudämmen oder gar zu vermeiden, ist eine enge Zusammenarbeit von Gesundheitsamt, Lebensmittelbehörde und Veterinäramt erforderlich. Liegt ein EHEC-Verdacht oder eine Erkrankung vor, so ist das Gesundheitsamt schnellstens zu informieren und durch Identifizierung und Eliminierung des Infektionsagens eine EHEC-Ausbreitung zu verhindern (RKI, 2008). Dies ist nur sicherzustellen, wenn auch entsprechend qualifizierte und akkreditierte Labore die Untersuchungen durchführen. Daher wurden auf der Grundlage von Artikel 33 der Verordnung (EG) Nr. 882/2004 Nationale Referenzlaboratorien (NRL) für lebensmittelbedingte Zoonosen eingerichtet. Die Aufgaben des NRL-*E. coli* in Berlin bestehen in der Identifizierung der Infektionsquelle, Aufklärung des Infektionsweges und der näheren Charakterisierung der *E. coli*-Pathovare (ELLERBROEK et al., 2009).

Auch innerhalb der Europäischen Union wird lebensmittelrelevanten Zoonoseerregern gerade im Hinblick für die Lebensmittelsicherheit im europäischen Handel große Bedeutung beigemessen. Jedoch bestand bisher die Problematik darin, dass

keine EU-einheitlichen Überwachungs- und Untersuchungsmaßnahmen festgelegt wurden und somit Ergebnisse und Daten der einzelnen Mitgliedstaaten nicht vergleichbar waren. Mit der neuen Zoonose-Richtlinie 2003/99/EG soll das Monitoring, die Untersuchung und Berichterstattung von lebensmittelrelevanten Zoonoseerregern verbessert werden. Für alle Zoonoseerreger der Kategorie A der Richtlinie 2003/99/EG, in der auch STEC gelistet ist, ist ein Monitoring der Erkrankung sowie des Erregers, obligatorisch (SMULDERS et al., 2008). Die EFSA hat außerdem in Zusammenarbeit mit dem Scientific Panel on Biological Hazards (BIOHAZ) ein wissenschaftliches Handbuch für STEC erstellt um standardisierte Verfahren und eine harmonisierte Überwachung innerhalb der europäischen Union zu etablieren (EFSA, 2009).

2.7 Anreicherungsmedien für STEC

Für die Kultivierung von STEC stehen mehrere Anreicherungsmedien zur Verfügung. Je nach Untersuchungsmaterial werden nicht selektive Medien und mit Antibiotika supplementierte selektive Anreicherungsmedien ausgewählt (MCDONOUGH et al., 2000; HORNITZKY et al., 2001; GRANT, 2004; O'SULLIVAN et al., 2006). VIMONT et al. (2006) veröffentlichten eine Auswertung von Anreicherungsprotokollen für STEC, die in den Jahren 1997 bis 2004 in wissenschaftlichen Zeitschriften beschrieben wurden. Von den nicht selektiven Medien werden am häufigsten Tryptic Soy Broth (TSB) mit etwa 40 Prozent und gepuffertes Peptonwasser (BPW) mit etwa 15 Prozent in Studien zum STEC-Nachweis in Fleisch, Milch, Wasser, Saft und Fäzes verwendet. Für den Nachweis von STEC in anderen Matrices wurde TSB seltener als BPW eingesetzt. Zudem konnte dargelegt werden, dass BPW häufiger für den Nachweis von O157 als für andere STEC verwendet wird. Als häufigstes selektives Anreicherungsmedium wird mit etwa 25 Prozent *E. coli* Broth (EC) aufgeführt. EC beinhaltet als Selektivstoff Gallensalze, jedoch werden diese ebenfalls sehr oft anderen Anreicherungsmedien für STEC zugesetzt. Die Auswertungen ergaben des Weiteren, dass den selektiven Anreicherungsmedien meist Antibiotika zugesetzt wurden. Hierbei wurde zu etwa 90 Prozent das Antibiotikum Novobiocin, das vor allem die gram-positive Microflora hemmt, eingesetzt (VIMONT et al., 2006).

Für den Nachweis von STEC in Lebensmitteln tierischer Herkunft und in Hackfleisch gibt es in der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren (ASU) nach § 64 LFGB die Methode L 00.00-92 (2006) und L 07.18-1 (2002). Bei beiden Nachweismethoden wird als Medium zur Voranreicherung eine mit Gallensalzen modifizierte Tryptic Soy Broth (mTSB) mit 20 mg/l Novobiocin festgelegt. Bei der Methode L 00.00-92 (2006) wird eine 2. Anreicherung in mTSB mit dem Antibiotikum Mitomycin C oder Carbadox durchgeführt. Diese steigern als sogenannte Enhancer die Stx-Expression. In Deutschland durchgeführte Ringversuche zum Nachweis und Isolierung von STEC in den Jahren 2008 und 2009 zeigten, dass die teilgenommenen Labore sich überwiegend an den Empfehlungen der ASU nach § 64 LFGB orientierten (BEUTIN et al., 2010). Die EFSA (2009) hingegen geht davon aus, dass beim Nachweis von STEC aus Lebensmitteln 20 mg/l Novobiocin das Risiko falsch negativer Ergebnisse erhöht. Daher wird zur Kultivierung mTSB mit nur 16 mg/l Novobiocin, bzw. für Milchprodukte mit 12 mg/l Acriflavin empfohlen. Des Weiteren weist die EFSA (2009) darauf hin, dass für den Nachweis von STEC aus gefrorenen Lebensmitteln nicht mTSB mit 16 mg/l Novobiocin, sondern BPW als Anreicherungsmedium verwendet werden sollte. Dies konnten Untersuchungen des NRL-*E. coli* bestätigen. Denn laut einer Studie des NRL-*E. coli* führt eine Anreicherung von STEC in mTSB mit Novobiocinzusatz aus tiefgekühlten Lebensmittelproben zu deutlich schlechteren Ergebnissen, als eine Anreicherung in BPW (BEUTIN et al., 2010).

Für die Kultivierung und Untersuchung auf *E. coli* O157 sind in Europa validierte Methoden vorhanden. In der ASU nach § 64 LFGB ist der Nachweis von O157 in Lebensmitteln mit der Methode L 00.00-68 (2002) und in Fleisch und Fleischerzeugnissen mit der Methode L 06.00-44 (2004), sowie in Fleischerzeugnissen mit der Methode L 07.00-54 (2004) und in Wurstwaren mit der Methode L 08.00-47 (2004) festgelegt. Die Methode der ASU nach § 64 LFGB L 00.00-68 (2002) für das horizontale Verfahren für den Nachweis von *E. coli* O157 in Lebensmitteln hat die standardisierte Methode nach DIN EN ISO 16654 übernommen. Sie beschreibt als Anreicherungsmedium eine mTSB mit 20 mg/l Novobiocin. Für die Untersuchung von Fleischerzeugnissen und Wurstwaren wird laut der Methode L 07.00-54 (2004) bzw. L 08.00-47 (2004) zur Anreicherung die in der Methode L 06.00-44 (2004) für Fleisch und Fleischerzeugnisse beschriebene Brillantgrün-Galle-Lactose-Bouillon

(BRILA) verwendet. Die EFSA (2009) geht für den Nachweis von O157 in Lebensmitteln mit der Methode L 00.00-68 (2002) konform. Jedoch erweitert sie die DIN EN ISO 16654 auf Haut- und Fellproben. Hierbei wird jedoch vom Anreicherungsmedium abgewichen, indem für Tupferproben von Rinderhäuten und Proben von Schafwolle eine Kultivierung in 90 ml BPW beschrieben wird (EFSA, 2009).

2.8 Polymerasekettenreaktion (PCR) für den Nachweis von STEC

Für den Nachweis von STEC nehmen PCR-basierte Methoden eine bedeutende Rolle ein, da sie schnelle und sensitive Verfahren darstellen (RICH et al., 2001; ARTHUR et al., 2002; BISCHOFF et al., 2005). Hierfür sind in der Literatur (WANG et al., 2002; OSEK, 2003; KIMATA et al., 2005; MAG et al., 2010) als auch in der ASU nach § 64 LFGB mit der Methode L 07.18-1 (2002) Protokolle für das Screening auf *stx* mittels konventioneller PCR zu finden. Das Screening mittels Real-Time PCR erlangte durch seine Schnelligkeit und höhere Sensitivität eine größere Bedeutung (Tabelle 2.7).

Die erst in den neunziger Jahren entwickelte Real-Time PCR misst Fluoreszenzsignale, die durch die Einlagerung eines interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffs (z.B. SYBR[®] Green, EvaGreen[®]) in DNA-Doppelstränge entstehen. Anhand der Fluoreszenzsignale wird die Amplifikationskurve mit dem C_t -Wert (Threshold Cycle) und die Schmelzkurve mit dem T_m -Wert (Melting Temperature) ermittelt. Der C_t -Wert wird definiert als der Wert, bei dem das Fluoreszenzsignal erstmalig signifikant über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt. Der T_m -Wert bezeichnet die Temperatur, bei der die Hälfte der DNA-Doppelstränge denaturiert vorliegt (HAMADEH und AFSHARI, 2004; LOGAN et al., 2009).

Die Real-Time PCR bietet gegenüber der konventionellen PCR die Vorteile, dass die Ergebnisse unmittelbar zur Verfügung stehen und die Kontaminationsgefahr verringert ist (BUSCH, 2007c; LOGAN et al., 2009). Zudem weist die Real-Time PCR eine höhere Sensitivität auf. Dies stellt sich auch in einer von BUSCH et al. (2007a) durchgeführten Studie für den Nachweis von STEC dar, in der eine konventionelle

Tabelle 2.7 *Stx*-Screening mittels multiplex Real-Time PCR

Gene	Real-Time PCR mit		Methode	Quelle
	Sonde	SYBR® Green		
<i>stx1, stx2</i>	x		duplex	BELLIN et al. (2001)
<i>stx1, stx2</i>		x	duplex	BISCHOFF et al. (2005)
<i>stx1, stx2</i>	x		duplex	BUSCH et al. (2007a)
<i>stx1, stx2, eae</i>		x	x	CHASSAGNE et al. (2009)
<i>stx1, stx2, eae</i>		x	x	GUION et al. (2008)
<i>stx1, stx2, eae</i>	x		x	IBEKWE et al. (2002)
<i>stx1, stx2, uidA</i>	x		x	JINNEMAN et al. (2003)
<i>stx1, stx2</i>		x	duplex	JOTHIKUMAR und GRIFFITHS (2002)
<i>stx1, stx2</i>	x		duplex	REISCHL et al. (2002)
<i>stx1, stx2, eae</i>	x		x	SHARMA und DEAN-NYSTROM (2003)
<i>stx1, stx2, uidA</i>		x	x	YOSHITOMI et al. (2006)

eae=Gen für Intimin *hlyA*=Gen für Enterohämolysin *stx*=Gen für Shigatoxin
uidA=Gen für beta-D-Glucuronidase

PCR nach Vorgabe der Methode L 07.18-1 (2002) nach der ASU nach § 64 LFGB mit einer Real-Time PCR verglichen wurde. Die EFSA (2009) befürwortet für den Nachweis von STEC, mit Ausnahme von *E. coli* O157, ebenfalls die Real-Time PCR.

Um sicherzustellen, dass nur das gewünschte DNA-Produkt detektiert wird, können bei der Real-Time PCR zusätzlich zu den Primern sequenzspezifische Hybridisierungssonden eingesetzt werden. Diese Sonden sind am 3'-Ende der Nucleotidsequenz mit einem Quencherfarbstoff und am 5'-Ende mit einem fluoreszierenden Reporterfarbstoff versehen. Je mehr der gesuchte Sequenzbereich vorhanden ist, desto mehr nimmt die Fluoreszenz zu (LIVAK et al., 1995; HARBRON, 2004).

In der Literatur werden zunehmend auch multiplex PCR-Protokolle für die Real-Time PCR beschrieben (Tabelle 2.7). Bei einem solchen Verfahren kann eine Probe in einem einzigen PCR-Lauf gleichzeitig auf mehrere Gene untersucht werden. Für die Gene *stx1* und *stx2* sind sowohl nur mit Fluoreszenzfarbstoff, als auch mit Sonden durchgeführte duplex Real-Time PCR-Protokolle in der Literatur häufig vorhanden (BELLIN et al., 2001; JOTHIKUMAR und GRIFFITHS, 2002; REISCHL et al., 2002; BISCHOFF et al., 2005). Für den Nachweis von weiteren Virulenzgenen stehen neben konventionellen PCR-Protokollen auch einige Real-Time PCR-Protokolle zur Verfügung. Für den Nachweis der *stx*-Subtypen sind dagegen in der Literatur überwiegend konventionelle PCR-Protokolle zu finden (Tabelle 2.8).

Tabelle 2.8 PCR-Nachweisverfahren für Virulenzgene und *stx*-Subtypen

Gene	PCR		Methode		Quelle
	konv.	Real-Time	multiplex	single	
<i>stx2, stx2d, stx2e, astA</i>	x			x	BERTIN et al. (2001)
<i>stx1, stx1c, stx1d, stx2, stx2c-g, eae, hlyA</i>	x			x	BEUTIN et al. (2007)
<i>stx1, stx2, hlyA, eaeα - ξ</i>	x		x	x	BLANCO et al. (2004)
<i>stx1, stx1d, stx2, eae, hlyA</i>	x			x	BÜRK et al. (2003)
<i>stx, stx2d</i>	x			x	EKLUND et al. (2002)
<i>stx1, stx2, eae</i>	x		x		KIMATA et al. (2005)
<i>stx1, stx2, stx1c</i>	x			x	KOCH et al. (2001)
<i>stx1, stx1c</i>		Sonde	x		KUCZIUS et al. (2004)
<i>stx1, stx2, eae, hlyA, saa</i>	x			x	MAG et al. (2010)
<i>stx1, stx2, eae, hlyA, saa, tir, katP, espP, etpD, espD</i>		Sonde	x	x	MÖLLER-NIELSEN und THORUP-ANDERSEN (2003)
<i>stx1, stx2, stx2c-f, eae, hlyA, rfbE, fliC</i>	x		x		OSEK (2003)
<i>eae, hlyA</i>		Sonde	x		REISCHL et al. (2002)
<i>stx1, stx2, stx2d-f</i>	x			x	SCHMIDT et al. (2000)
<i>stx1, stx2, stx2c-f, eae, hly, rfbE, fliC</i>	x		x		WANG et al. (2002)

konv.=konventionell

astA=Gen für enteroaggregatives thermostabiles Enterotoxin *eae*=Gen für Intimin

esp=Gen für extrazelluläre Serinprotease *etpD*=Gen für TypII-Sekretionsprotein

fliC=Gen für Flagellum H7 *hlyA*=Gen für Enterohämolysin *katP*=Gen für Katalase Peroxidase

rfbE=Gen für O-Antigen O157 *saa*=Gen für STEC-Autoagglutinations-Adhesin

stx=Gen für Shigatoxin *tir*=Gen für Intiminrezeptor *uidA*=Gen für beta-D-Glucuronidase

3 Material und Methoden

3.1 Material

Das Probenmaterial und die wichtigsten Nährmedien, Reagenzien und Geräte, sowie die verwendeten Referenzstämme und Primer sind im Folgenden gelistet. Alle weiteren Reagenzien und Geräte sind im Anhang aufgeführt (Tabelle 8.1 und 8.2).

3.1.1 Proben

Es wurden von 30 erlegten Rothirschen Kot, Mesenteriallymphknoten, Tonsillen und von 30 Rehen Kot als Probenmaterial untersucht. Insgesamt wurden 120 Proben auf STEC getestet (Tabelle 3.1). Das Probenmaterial stammte aus dem Nationalpark Bayerischer Wald, Deutschland.

Tabelle 3.1 Probenmaterial

Tierart	Tonsille	Lymphknoten	Kot	Gesamt
Rothirsch	30	30	30	90
Reh	-	-	30	30
Gesamt	30	30	60	120

Von den Rothirschen konnten Alter, Geschlecht und Gewicht erfasst werden. Die Alterseinteilung erfolgte in die drei Kategorien Kalb, Jungtier und Altier. Tiere unter einem Jahr wurden als Kälber definiert, Tiere zwischen einem und drei Jahren

als Jungtiere. Zu den Alttieren wurden alle Tiere ab drei Jahre gezählt. Unter den beprobten Tieren waren zehn männliche und 20 weibliche Tiere. Einen Überblick über die Tierdaten der Rothirsche liefern die Tabelle 3.2 und die Tabelle 8.3 im Anhang.

Tabelle 3.2 Überblick über die Tierdaten der beprobten Rothirsche

	Anzahl	weiblich	männlich
Kälber	10	5	5
Jungtiere	8	6	2
Alttiere	12	9	3
Gesamt	30	20	10

Kalb < 1 Jahr Jungtier < 3 Jahre Alttier \geq 3 Jahre

Die Kotproben der Rehe stammten von lebenden Tieren. Im Zuge eines Projekts Rehe mit Transpondern zu versehen konnten Kotproben von mit Transpondern ausgestatteten Tieren, sowie von Gruppenmitgliedern, die sich in der näheren Umgebung aufhielten, gesammelt werden. Aus diesem Grund standen von Rehen nur teilweise Daten zur Verfügung. Das anhand der vorhandenen Daten ermittelte Geschlechterverhältnis betrug 1:1. Die Einteilung bei den Rehen erfolgte in die Kategorien Kitz, Jungtier und Alttier nach den bereits genannten Definitionen. Die Tierdaten der Rehe sind in der Tabelle 3.3 und in der Tabelle 8.4 im Anhang aufgeführt.

Tabelle 3.3 Überblick über die Tierdaten der beprobten Rehe

	Anzahl	weiblich	männlich
Kitze	8	4	4
Jungtiere	4	1	3
Alttiere	8	5	3
keine Daten	10		
Gesamt	30	10	10

Kitz < 1 Jahr Jungtier < 3 Jahre Alttier \geq 3 Jahre

3.1.2 Nährmedien

Bouillons:

- 25,5 g/l BPW (Buffered peptone water/ gepuffertes Peptonwasser) (Merck, Ismaning Artikelnummer 1.07228.0500)
- mTSB+N:
 - 30,0 g/l TSB (Tryptic Soy Broth) (Merck, Ismaning Artikelnummer 1.05459.0500)
 - 1,5 g/l Bile Salts (Oxoid, Hampshire GB Artikelnummer L56)
 - 16 mg/l Novobiocin (Sigma-Aldrich Artikelnummer N6160)
- Verdünnungsröhrchen:
 - 1,0 g/l Pepton aus Fleisch (Merck, Ismaning Artikelnummer 1.07214.1000)
 - 8,5 g/l Natriumchlorid (Merck, Ismaning Artikelnummer 1.06404.1000)

Agar-Platten:

- 51,6 g/l SMAC (Sorbitol-MacConkey)-Agar (Merck, Ismaning Artikelnummer 1.09207.0500)
- 53,1 g/l Fluorocult ECD (*E.coli* Direct)-Agar (Merck, Ismaning Artikelnummer 1.04038.0500)
- 40,0 g/l TSA (Tryptic Soy Agar) (Merck, Ismaning Artikelnummer 1.05458.0500)

3.1.3 Referenzstämme

Die verwendeten STEC-Referenzstämme sind in Tabelle 3.4 aufgeführt. Die Referenzstämme für das *stx*-Screening stammten vom Bundesamt für Risikobewertung, Dessau. Als Positivkontrollen für die weiteren Virulenzgene und die Subtypisierung wurden Stämme vom Lehrstuhl für Lebensmittelhygiene, Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch, sowie vom Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit verwendet.

Tabelle 3.4 Referenzstämme für Positivkontrollen der Real-Time PCR

Bezeichnung	positiv für	Quelle
C600J1	<i>stx1</i>	Bundesamt für Risikobewertung, Dessau
WK 184ON	<i>stx1c</i>	Lehrstuhl für Lebensmittelhygiene, Oberschleißheim
MHI 813	<i>stx1d</i>	Bundesamt für Risikobewertung, Dessau
C600W34	<i>stx2</i>	Bundesamt für Risikobewertung, Dessau
MHI 829	<i>stx2c</i>	Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch, Oberschleißheim
MHI 830	<i>stx2d</i>	Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch, Oberschleißheim
MHI 831	<i>stx2e</i>	Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch, Oberschleißheim
MHI 832	<i>stx2f</i>	Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch, Oberschleißheim
MHI 834	<i>eae</i>	Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch, Oberschleißheim
MHI 820	<i>hlyA</i>	Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch, Oberschleißheim
LGL 2010/02	<i>saa</i>	Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Oberschleißheim

3.1.4 PCR-Materialien

DNA-Extraktion:

- InstaGene™ Matrix (Bio-Rad, München Artikelnummer 732-6030)

PCR:

- SsoFast™ EvaGreen® Supermix (Bio-Rad, München Artikelnummer 172-5200)
- Molecular Biology Grade Water (M.B.G.Water) (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf Artikelnummer 0032 006.302)
- Primer (Tabelle 3.5) (Eurofins MWG Operon, Ebersberg)
- IQ5 Cyclor (Bio-Rad, München Artikelnummer 584BR4014)

Tabelle 3.5 Primer für die Real-Time PCR

Primer	Sequenzen (5'—3')	Gen	Produkt	Quelle
stx1f stx1r stx2f stx2r	GACTGCAAAGACGTATGTAGATTTCG ATCTATCCCTCTGA ATCAACTGC ATTAACCACACCCACCG GTCATGGAAACCGTTGTCAC	<i>stx1</i> <i>stx2</i>	150 bp 210 bp	SHARMA und DEAN-NYSTROM (2003)
Lin-up 1OX3	GAACGAAATAATTTATATGT CTCATTAGGTACAATTCT	<i>stx1c</i>	555 bp	KOCH et al. (2001)
VT1AvarF VT1AvarR	CTTTTCAGTTAATGCGATTGCT AACCCCATGATATCGACTGC	<i>stx1d</i>	192 bp	BÜRK et al. (2003)
stx2c-a stx2c-b stx2d-a stx2d-b stx2e-a stx2e-b stx2f-a stx2f-b	GCGGTTTTATTTGCATTAGT AGTACTCTTTCCGGCCACT GGTAAAATTGAGTTCTCTAAGTAT CAGCAAATCCTGAACCTGACG ATGAAGTGTATATTGTTAAAGTGGA AGCCACATATAAATTATTTCTG TGTCTTCAGCATCTTATGCAG CATGATTAATTACTGAAACAGAAAC	<i>stx2c</i> <i>stx2d</i> <i>stx2e</i> <i>stx2f</i>	124 bp 175 bp 303 bp 150 bp	 WANG et al. (2002)
eae-F2 eae-R ehc-F2 ehc-R Saa-F Saa-R	CATTGATCAGGATTTTTCTGGTGATA CTCATGCGGAAATAGCCGTTA CGTTAAGGAACAGGAGGTGTCAGTA ATCATGTTTTCCGCCAATGAG TGCCGCTGGTATAATTTTTTCG AACGCCTGTTCCATGTTGTG	<i>eae</i> <i>hlyA</i> <i>saa</i>	102 bp 142 bp 85 bp	MÖLLER-NIELSEN und THORUP- ANDERSEN (2003)

bp=Basenpaare

3.2 Methoden

3.2.1 Probennahme

Die Proben der Rothirsche wurden von frisch erlegten Tieren entnommen und bei 6 +/- 2 °C bis zur Untersuchung gelagert. Von den Rehen wurden im Rahmen des Kennzeichnungsprogramms (Unterabschnitt 3.1.1) möglichst frischer Kot gesammelt und bei -20 +/- 2 °C bis zur Untersuchung tiefgekühlt.

3.2.2 Screening auf die Shigatoxingene *stx1* und *stx2*

Es wurden ca. 10 g kleingeschnittene Mesenteriallymphknoten, sowie die Tonsillen (ca. 10 g) jeweils mit 90 ml BPW in Stomacher-Beutel gefüllt und im Stomacher für 1 min vermischt. Anschließend wurden die Homogenate in Erlmeyerkolben überführt und bei 37 °C für 18 +/- 2 h bebrütet. Zudem wurde direkt nach Homogenisierung von jedem Homogenat je 100 µl auf einem SMAC-Agar ausgespatelt und bei 41,5 °C für 20 +/- 2 h bebrütet. Die direkt nach Homogenisierung hergestellten SMAC-Agars werden in dieser Arbeit als Direkt-Platten (D-Platten) bezeichnet. Die aus den bebrüteten Bouillons hergestellten SMAC-Agars werden als Overnight-Platten (ON-Platten) definiert.

Aus je 100 µl Lymphknoten- und Tonsillenbouillon wurde mit InstaGene™Matrix (Bio-Rad) die DNA extrahiert. Dafür wurde das vom Hersteller empfohlene Verfahren modifiziert. 100 µl der bebrüteten Bouillon wurden in ein 1,5 ml Tube pipettiert, 1 min bei 13 400 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die InstaGene™Matrix (Bio-Rad) wurde auf dem Magnetrührer gemischt und 50 µl zum Pellet pipettiert. Nach kurzem Vortexen wurde die Suspension 15 min bei 56 °C im Thermomixer erhitzt. Nach nochmaligem 10 s Vortexen wurde sie für 8 min bei 100 °C gekocht, wieder 10 s gevortext und anschließend 3 min bei 16 200 x g zentrifugiert. 30 µl Überstand wurden in ein neues 1,5 ml Tube pipettiert und umgehend als DNA-Templat verwendet oder bei -20 °C tiefgefroren.

Von den Kotproben wurde je 1 g mit 90 ml BPW in Stomacher-Beutel gefüllt und im Stomacher für 1 min vermischt. Anschließend wurden die Homogenate ebenfalls in Erlmeyerkolben überführt und bei 37 °C für 18 +/- 2 h bebrütet. Zudem wurden auch aus den Kothomogenaten direkt nach Gewinnung je eine D-Platte hergestellt, indem je 100 µl auf einem SMAC-Agar ausgespatelt und bei 41,5 °C für 20 +/- 2 h bebrütet wurden. Aus der bebrüteten Kotbouillon wurde 1 Öse entnommen, ein 3-Ösenausstrich auf einem SMAC-Agar (ON-Platte) angefertigt und bei 41,5 °C für 20 +/- 2 h bebrütet. Am nächsten Tag wurden aus dem am dichtesten bewachsenen Areal des Agars mit einer Pipettenspitze eine kleine Menge an Bakterienkolonien abgenommen, in 100 µl Aqua dest. suspendiert und für 10 min bei 100 °C thermolysiert. Nach Zentrifugation für 3 min bei 16 200 x g wurde der Überstand unmittelbar als DNA-Templat eingesetzt.

Die Lymphknoten- und Tonsillenbouillons wurden mittels multiplex Real-Time PCR in einem 2 Step-Protokoll auf *stx1* und *stx2* untersucht. Hierfür wurde ein 20 μ l Ansatz hergestellt, der aus 10 μ l SsoFastTM EvaGreen[®] Supermix (Bio-Rad), je 2 μ l Primerpaare *stx1* und *stx2* (Tabelle 3.5), 4 μ l M.B.G.Water und 2 μ l DNA-Templat aus der InstaGeneTM Reinigung bestand (Tabelle 3.6). Der Ausstrich aus der Kotbouillon wurde ebenfalls mittels multiplex Real-Time PCR in einem 2 Step-Protokoll untersucht. Der 20 μ l Ansatz setzte sich zusammen aus 10 μ l SsoFastTM EvaGreen[®] Supermix (Bio-Rad), je 2 μ l Primerpaare *stx1* und *stx2*, sowie 5 μ l M.B.G.Water und 1 μ l DNA-Templat aus der thermischen Lyse (Tabelle 3.6).

Bei den PCR-Untersuchungen wurden sowohl Positivkontrollen, als auch Negativkontrollen mitgeführt. Als Positivkontrollen dienten die Referenzstämme aus Tabelle 3.4, als Negativkontrolle wurde anstelle eines Templats M.B.G.Water mitgeführt. Die Gewinnung der DNA-Extrakte für die Positivkontrollen erfolgte durch thermische Lyse einzelner Kolonien, die von einer TSA-Platte gewonnen wurden, und Überführen des Überstands in ein neues 1,5 ml Tube. Diese DNA-Extrakte wurden bei 6 +/- 2 °C im Kühlschrank aufbewahrt.

Tabelle 3.6 PCR-Ansätze für multiplex *stx*-Screening

PCR-Ansatz	Reaktionsvolumen		Endkonzentration
	Bouillon	Platte	
SsoFastTM EvaGreen[®] Supermix	10 μ l	10 μ l	1 x
Primerpaar <i>stx1</i>	2 μ l	2 μ l	je 200 nM
Primerpaar <i>stx2</i>	2 μ l	2 μ l	je 200 nM
M.B.G.Water	4 μ l	5 μ l	-
DNA-Templat	2 μ l	1 μ l	-
Gesamt	20 μ l	20 μ l	

M.B.G.Water=Molecular Biology Grade Water

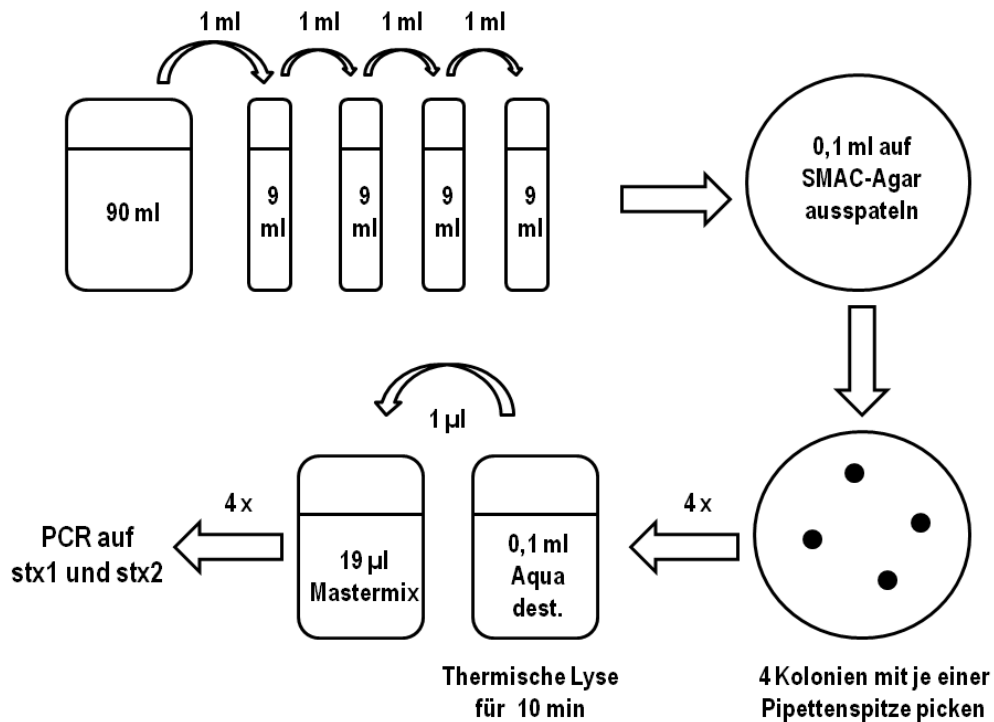
Die 20 μ l Ansätze wurden im IQ5 Cycler (Bio-Rad) amplifiziert. Die Denaturierung erfolgte bei 98 °C für 5 s, Annealing und Extension bei 58 °C für 15 s mit insgesamt 40 Zyklen. Die Schmelzkurvenanalyse fand in 0,5 °C Schritten von 65 °C bis 95 °C statt (Tabelle 3.7).

Tabelle 3.7 Protokoll für Real-Time PCR

Phasen	Temperatur/Zeit		
Pre-Denaturierung	98 °C 2 min		
40 x Denaturierung	98 °C 5 s		
Annealing und Extension	58 °C 15 s ¹	56 °C 15 s ²	54 °C 15 s ³
End-Denaturierung	95 °C 1 min		
Schmelzkurven-Start	65 °C 1 min		
Schmelzkurvenanalyse	65 °C bis 95 °C 10 s		

¹für *stx*-Screening ²für *stx1d*, *stx2c-2f*, *eae*, *hlyA*, *saa* ³für *stx1c*

Bei *stx*-positiven Proben wurde die entsprechende Bouillon mit Verdünnungsröhrchen auf 1:10 000 bzw. bei den Kotproben der Rehe auf 1:100 000 verdünnt, davon 100 µl auf einen SMAC-Agar ausgespatelt (ON-Platte) und bei 41,5 °C für 20 +/- 2 h bebrütet. Von diesem Agar, sowie von der entsprechenden D-Platte wurden je vier verschiedene Einzelkolonien mit je einer Pipettenspitze gepickt, die DNA ebenfalls durch thermischer Lyse extrahiert und mittels multiplex Real-Time PCR auf *stx1* und *stx2* analysiert (Abbildung 3.1). Positive Bakterienkolonien wurden vom SMAC-Agar als 3-Ösenausstrich auf einem ECD-Agar subkultiviert und bei 41,5 °C für 20 +/- 2 h bebrütet. Auf dem SMAC-Agar wurde die Sorbitverwertung, auf dem ECD-Agar die beta-D-Glucuronidase-Aktivität und die Tryptophan-Umsetzung des Bakterienstammes bestimmt. Zudem wurden biochemische Untersuchungen mittels Api 20E (Biomerieux) durchgeführt. Auf der TSA-Platte subkultivierte Bakterienkolonien wurden in Kryoröhrchen überführt und bei -80 +/- 2 °C gelagert.

Abbildung 3.1 Vorgehen bei *stx*-positiven Bouillons

3.2.3 Real-Time PCR Etablierung

Nach eingehender Literaturrecherche wurden die meist untersuchten und für uns interessantesten Virulenzgene und *stx*-Subtypen ausgewählt. Aus der Literatur wurden die entsprechenden Primer ausgesucht, die ein möglichst kurzes DNA-Fragment amplifizieren. Die Primer für die Gene *stx1c* (KOCH et al., 2001), *stx1d* (BÜRK et al., 2003), *stx2c*, *stx2d*, *stx2e* und *stx2f* (WANG et al., 2002) wurden für eine konventionelle PCR konstruiert, in dieser Arbeit wurden sie für eine Real-Time PCR verwendet.

Für die Real-Time PCR-Untersuchung der Virulenzgene *eae*, *hlyA*, *saa* und der *stx*-Subtypen wurde auf dem IQ5 Cycler (Bio-Rad) eine Etablierung durchgeführt. Die entsprechenden DNA-Extrakte der Referenzstämme (Tabelle 3.4) wurden durch thermische Lyse und Überführen des Überstandes in einen neuen 1,5 ml Tube gewonnen. Die Zusammensetzung der jeweiligen PCR-Ansätze mit einem Gesamtvolumen von 20 µl ist der Tabelle 3.8 zu entnehmen.

Tabelle 3.8 PCR-Ansatz für Virulenzgene und *stx*-Subtypen

PCR-Ansatz	Reaktionsvolumen	Endkonzentration
SsoFast™ EvaGreen® Supermix	10 µl	1 x
Primerpaar	2 µl	je 200 nM
M.B.G.Water	7 µl	-
DNA-Templat	1 µl	-
Gesamt	20 µl	

M.B.G.Water=Molecular Biology Grade Water

Für die Etablierung wurde ein Temperaturgradient für die Annealing- und Extensi-
onsphase von 52 °C bis 62 °C in etwa 2 °C Schritten mit anschließender Schmelzkur-
venanalyse für die Referenzstämme erstellt. In den 40 Zyklen des 2 Step-Protokolls
folgte, nach einer Denaturierung bei 98 °C für 5 s, Annealing und Extension für je
15 s bei den 6 verschiedenen Temperaturen 52,1 °C 54,1 °C 55,8 °C 58,2 °C 60,0 °C
und 61,6 °C. Die Schmelzkurvenanalyse begann bei 65 °C und stieg in 0,5 °C
Schritten bis auf 95 °C (Tabelle 3.9). Anhand des C_t - und T_m -Werts, sowie des
Kurvenverlaufs, konnte die optimale Annealing- und Extensionstemperatur für
jedes Primerpaar ermittelt werden.

Tabelle 3.9 PCR-Protokoll für die Etablierung

Phase	Temperatur/Zeit
Pre-Denaturierung	98 °C 2 min
40 x	
Denaturierung	98 °C 5 s
Annealing und Extension	52,1 °C bis 61,6 °C 15 s
End-Denaturierung	95 °C 1 min
Schmelzkurven-Start	65 °C 1 min
Schmelzkurvenanalyse	65 °C bis 95 °C 10 s

Zur Überprüfung der Amplifikatgröße wurde eine Gelelektrophorese der PCR-
Produkte durchgeführt. Um das 3,5 prozentige Gel herzustellen wurden 1,05 g

Agarose mit 1,5 ml TBE-Puffer (10 x) mit Aqua bidest. in einem Messzylinder auf 30 ml aufgefüllt. Dies wurde in der Mikrowelle bei 750 Watt bis zum völligen Lösen erhitzt. Verdunstetes Wasser wurde wieder nachgefüllt. Anschließend wurde das flüssige Gel in den Gelträger eingefüllt und der Kamm eingelegt. Nach Aushärtung des Gels und Entfernung des Kamms wurde es mit dem Gelträger in die mit TBE-Puffer (0,5 x) gefüllte Elektrophoresekammer eingesetzt. Es wurden DNA Loading Buffer im Verhältnis 1:5 mit 3 μ l PCR-Produkt auf einem Parafilm vermischt und davon 3 μ l in eine Geltasche pipettiert. In die erste und letzte Geltasche wurden jeweils 3 μ l HyperladderVTM (Bioline) als Längenstandard gegeben. Die Gelelektrophorese lief bei 140 Volt für 45 min. Anschließend wurde das Gel für etwa 10 min in Ethidiumbromidlösung (0,5 μ g/ml) gefärbt, danach für etwa 1 min gewässert, unter UV-Licht zur Fluoreszenz angeregt und fotodokumentiert.

Für *stx2e* und *stx2f* konnte eine multiplex Real-Time PCR etabliert werden. Hierfür wurde ein PCR-Ansatz analog der Tabelle 3.6 verwendet und anschließend die Amplifikations- und Schmelzkurven analysiert.

3.2.4 Screening auf die Gene *eae*, *hlyA*, *saa* und *stx*-Subtypen

Die etablierte Real-Time PCR wurde für das Screening auf die Gene *eae*, *hlyA*, *saa* und *stx*-Subtypen verwendet. Hierzu wurden von jedem Tier, sofern vorhanden, je ein D-Isolat und ein ON-Isolat untersucht. Die *stx*-positive Bakterienisolate wurden entweder von der Mikrobank oder frisch auf einem SMAC-Agar subkultiviert. Mit einer Pipettenspitze wurden mehrere Kolonien einer Reinkultur vom SMAC-Agar gepickt und eine DNA-Extraktion mittels thermischer Lyse (Unterabschnitt 3.2.2) durchgeführt. Zu 19 μ l Mastermix wurde 1 μ l DNA-Templat hinzugegeben und im Thermocycler auf die Virulenzgene und Subtypen analysiert (Tabelle 3.8).

Für *stx1d*, die *stx2*-Subtypen und *eae*, *hlyA*, *saa* wurde ein 2 Step-Protokoll mit einer Annealing- und Extensionsphase bei 56 °C für 15 s und eine Schmelzkurvenanalyse von 65 °C bis 95 °C durchgeführt (Tabelle 3.7). Für *stx1c* wurde ein 2 Step-Protokoll mit einer Annealing- und Extensionsphase bei 54 °C gefahren. *Stx1*-positive Stämme wurden auf *stx1c* und *stx1d*, *stx2*-positive Stämme auf *stx2c* und *stx2d* untersucht.

Auf *stx2e* und *stx2f* wurde als multiplex Real-Time PCR parallel zum *stx1*- und *stx2*-Screening untersucht. Dafür wurde ebenfalls ein 2 Step-Protokoll mit einer Denaturierung von 98 °C für 5 s, einer Annealing- und Extensionsphase bei 56 °C für 15 s und einer Schmelzkurvenanalyse von 65 °C bis 95 °C gefahren (Tabelle 3.7). Die Referenzstämme und Primer sind in Tabelle 3.4 und Tabelle 3.5 aufgeführt.

3.2.5 Serotypisierung

Alle gewonnenen STEC-Isolate wurden zur Serotypisierung an das NRL-*E. coli* des BfR (PD Dr. Lothar Beutin) in Berlin geschickt. Im NRL-*E. coli* erfolgte die Identifizierung der O- und H- Antigene.

3.2.6 Vergleich von Anreicherungsmedien

In der Literatur sind verschiedene Anreicherungsmedien für STEC zu finden. Für diese Arbeit wurde das selektive Anreicherungsmedium mTSB+N dem nicht selektivem Medium BPW gegenübergestellt, um festzustellen, ob ein Unterschied hinsichtlich der Isolierung von STEC zu beobachten ist. Beide Anreicherungsmedien wurden von der EFSA empfohlen. Im Scientific Report der EFSA (2009) wird die Verwendung von mTSB+N für Lebensmittelproben und BPW für Tierhaut- und Fellproben, sowie für gefrorene Lebensmittelproben angeraten.

Für den Versuch wurden zehn Kotproben von Rothirschen, sowie 30 Kotproben von Rehen in einem Doppelansatz kultiviert. Parallel zum Ansatz der Kotproben in 90 ml BPW (Unterabschnitt 3.2.2) wurde je 1 g Kot in 90 ml mTSB+N im Stomacher homogenisiert und für 18 +/- 2 h bei 37 °C bebrütet. Aus der bebrüteten mTSB+N Bouillon wurde ebenfalls eine Öse entnommen und auf einem SMAC-Agar ein 3-Ösenausstrich angefertigt. Von dem bebrüteten SMAC-Agar wurde aus dem am dichtesten bewachsenen Areal mit einer Pipettenspitze eine kleine Menge an Bakterienkolonien abgenommen und thermisch lysiert. Die PCR für das Screening auf *stx1* und *stx2*, als auch die Isolierung wurden entsprechend dem Unterabschnitt 3.2.2 durchgeführt. Die Ergebnisse der beiden Anreicherungsmedien wurden miteinander verglichen.

3.2.7 Statistik

Für die statistischen Auswertungen von 2 und 3 unabhängigen Stichproben wurde mit dem Programm R Version 2.11.1 (open source software von R.Ihaka und R.Gentleman) der Fisher-Test durchgeführt. Er diente dazu, herauszufinden, ob ein signifikanter Unterschied besteht zwischen:

- Rothirschkot und Rehkot
- männlichen und weiblichen Rothirschen bzw. Rehen
- weiblich nicht trächtigen und weiblich trächtigen Rothirschen
- Kalb bzw. Kitz, Jungtier und Alttier
- Kot, Lymphknoten und Tonsillen
- den *stx*-positiven D-Platten der Rothirsche und der Rehe
- dem Vorkommen von *stx1* und *stx2* bei Wildwiederkäuern
- BPW und mTSB+N

Dazu wurde jeweils eine Nullhypothese H_0 aufgestellt. Die Alternativhypothese wird als H_1 bezeichnet. Das Signifikanzniveau wurde bei $\alpha=0,05$ festgelegt. Dies bedeutet, dass die maximal zulässige Wahrscheinlichkeit für irrtümliches Ablehnen einer eigentlich richtigen Nullhypothese H_0 5 Prozent beträgt. H_0 wird zum Signifikanzniveau α abgelehnt, wenn der Fisher-Test einen p -Wert von $p<0,05$ ergibt. Ist dies der Fall, so besteht ein signifikanter Unterschied. Die eingegebenen Werte sind im Anhang in Tabelle 8.11 gelistet.

4 Ergebnisse

4.1 STEC bei Rothirschen und Rehen

4.1.1 Prävalenz

Es konnte für STEC eine hohe Prävalenz in Wildwiederkäuern festgestellt werden (Tabelle 4.1). Insgesamt waren 50 der 60 Wildwiederkäuer (83 Prozent) positiv für das *stx*-Gen. Von den insgesamt 120 untersuchten Proben konnten bei 70 Proben (58 Prozent) *stx* gefunden werden.

Bei den Rehkotproben ergaben 22 der 30 Tiere (73 Prozent) ein *stx*-positives Ergebnis. Im Kot der 30 Rothirsche konnte das *stx*-Gen 21 mal (70 Prozent) detektiert werden. Zwischen den beiden Tierarten konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden ($p=1$; Fisher-Test).

Da bei den Rothirschen nicht nur Kot, sondern auch Lymphknoten und Tonsille auf STEC untersucht wurden, ergab sich bei den Rothirschen mit 28 positiven Tieren eine höhere Prävalenz als bei den Rehen mit 22 positiven Tieren. Das *stx*-Gen wurde dabei am häufigsten im Kot (70 Prozent) der Rothirsche nachgewiesen, gefolgt von Lymphknoten (60 Prozent) und Tonsille (30 Prozent). Die statistischen Auswertungen ergaben, dass das *stx*-Gen signifikant häufiger im Kot und in Lymphknoten als in den Tonsillen vorkam ($p<0,05$; Fisher-Test).

Tabelle 4.1 Prävalenz von *stx*-positiven Rothirschen und Rehen

Tierart	Anzahl	<i>stx</i> -positiv	Probe	Anzahl	<i>stx</i> -positiv
Rothirsch	30	28 (93 %)	Tonsille	30	9 (30 %)
			Lymphknoten	30	18 (60 %)
			Kot	30	21 (70 %)
Reh	30	22 (73 %)	Kot	30	22 (73 %)
Gesamt	60	50 (83 %)	-	120	70 (58 %)

4.1.2 Alters- und Geschlechtsverteilung *stx*-positiver Proben

Bei den Rothirschen wurde hinsichtlich der Geschlechtsverteilung *stx*-positiver Proben kein signifikanter Unterschied festgestellt ($p=1$; Fisher-Test). Ebenso ergab die statistische Auswertung für nicht trächtige und trächtige Rothirsche keinen signifikanten Unterschied ($p=1$; Fisher-Test). Von den 28 positiven Rothirschen wurden bei neun von zehn männlichen Tieren (90 Prozent) und 19 von 20 weiblichen Tieren (93 Prozent) das *stx*-Gen festgestellt (Tabelle 4.2). Alle nicht trächtigen Tiere waren *stx*-positiv, von den zehn trächtigen Tieren waren bis auf ein Tier ebenfalls alle positiv. Bei den zwei negativen Tieren handelt es sich zum einen um ein männliches Kalb und zum anderen um ein trächtiges Alttier.

Tabelle 4.2 Geschlechtsverteilung *stx*-positiver Rothirsche

Geschlecht	Anzahl	<i>stx</i> -positiv	<i>stx</i> -negativ
Gesamt	30	28 (93 %)	2 (7 %)
Männlich	10	9 (90 %)	1 (10 %)
Weiblich gesamt	20	19 (93 %)	1 (5 %)
Weiblich (nicht trächtig)	10	10 (100 %)	0
Weiblich (trächtig)	10	9 (90 %)	1 (10 %)

Bei den männlichen Rothirschen kam das *stx*-Gen am häufigsten im Kot vor, gefolgt von Lymphknoten und Tonsille. Insgesamt wies der Kot bei den weiblichen Tieren ebenfalls die höchste Prävalenz auf (Tabelle 4.3).

Tabelle 4.3 Verteilung der *stx*-positiven Rothirschproben in Bezug zum Geschlecht

Probe	Männlich		Weiblich			
	Anzahl	+	Anzahl	+	+n.t.	+tr.
Tonsille	10	1 (10 %)	20	8 (40 %)	4 (40 %)	4 (40 %)
Lymphknoten	10	7 (70 %)	20	11 (55 %)	3 (30 %)	8 (80 %)
Kot	10	8 (80 %)	20	13 (65 %)	7 (70 %)	6 (60 %)

+=*stx*-positiv n.t.=nicht trächtig tr.=trächtig

Hinsichtlich der Altersverteilung der Rothirsche konnte bei den 3 Kategorien Kalb, Jungtier und Alttier kein signifikanter Unterschied festgestellt werden ($p=1$; Fisher-Test). Sowohl beim Kalb, als auch beim Jungtier konnte das *stx*-Gen am häufigsten im Kot nachgewiesen werden (Tabelle 4.4). Beim Alttier wurde das *stx*-Gen 9 mal im Lymphknoten (75 Prozent) und 8 mal im Kot (67 Prozent) detektiert. Die Verteilung des *stx*-Gens bei den drei verschiedenen Matrizes in Bezug zum Einzeltier sind im Anhang in Tabelle 8.5 bis 8.7 aufgeführt.

Tabelle 4.4 Verteilung der *stx*-positiven Rothirschproben in Bezug zum Alter

Probe	Kalb		Jungtier		Alttier	
	Anzahl	+	Anzahl	+	Anzahl	+
Tonsille	10	3 (30 %)	8	2 (25 %)	12	4 (33 %)
Lymphknoten	10	6 (60 %)	8	3 (38 %)	12	9 (75 %)
Kot	10	8 (80 %)	8	5 (63 %)	12	8 (67 %)

+=*stx*-positiv

Bei den Rehen wurde ebenfalls hinsichtlich der Geschlechtsverteilung *stx*-positiver Proben, als auch hinsichtlich der Altersverteilung kein signifikanter Unterschied festgestellt ($p=0,58$, $p=0,28$; Fisher-Test). Die 22 *stx*-positiven Kotproben der Rehe verteilten sich auf sieben der zehn männlichen Tiere (70 Prozent) und auf neun der zehn weiblichen Tiere (90 Prozent). Von den restlichen sechs *stx*-positiven Kotproben standen keine Tierdaten zur Verfügung. Bei den acht *stx*-negativen Tiere handelte es sich um ein männliches Kitz, zwei männliche Jungtiere und ein weibliches Alttier. Für die vier anderen *stx*-negativen Tiere konnten ebenfalls

keine Tierdaten ermittelt werden. Bezogen auf das Alter verteilten sich die sieben *stx*-positiven männlichen Tiere auf drei Kitze, ein Jungtier und drei Alttiere. Bei den neun *stx*-positiven weiblichen Tieren ergab sich eine Altersverteilung auf vier Kitze, ein Jungtier und vier Alttiere (Tabelle 4.5).

Tabelle 4.5 Verteilung der *stx*-positiven Rehe hinsichtlich Geschlecht und Alter

Geschlecht	Anzahl	<i>stx</i> -positive				<i>stx</i> -negative			
		K	J	A	Gesamt	K	J	A	Gesamt
Männlich	10	3	1	3	7 (70 %)	1	2	-	3 (30 %)
Weiblich	10	4	1	4	9 (90 %)	-	-	1	1 (10 %)
keine Daten	10	-	-	-	6 (60 %)	-	-	-	4 (40 %)
Gesamt	30	7	2	7	22 (73 %)	1	2	1	8 (27 %)

K=Kitz J=Jungtier A=Alttier

4.1.3 Isolate

Aus dem Kot der Rothirsche konnten mehr Isolate gewonnen werden, als aus Rehkot (Tabelle 4.6). Die statistische Auswertung ergab, dass ein signifikanter Unterschied zwischen den 12 *stx*-positiven D-Platten der Rothirsche und den 5 *stx*-positiven D-Platten der Rehe besteht ($p < 0,05$; Fisher-Test).

Bei den 28 *stx*-positiven Rothirschen konnten aus den drei Matrices Kot, Lymphknoten und Tonsille insgesamt 29 *stx*-positive Isolate von 15 verschiedenen Tieren gewonnen werden. Von den 30 Lymphknotenbouillons detektierte die PCR 18 *stx*-positive Bouillons. Die PCR der dazugehörigen ON-Platten ergab bei sechs Tieren positive Ergebnisse. Davon konnten fünf Isolate gewonnen werden. Die dazugehörige D-Platte war in drei Fällen positiv und es konnte ein Isolat gewonnen werden. Von den 30 Tonsillenbouillons ergab die PCR neun *stx*-positive Bouillons. Von diesen wurden fünf ON-Platten in der PCR positiv getestet und drei Isolate konnten in die Mikrobank überführt werden. Keine der entsprechenden D-Platten war positiv. Die PCR der ON-Platten von Kot führte bei 21 Tieren zu positiven Ergebnissen. Hiervon konnten 12 Isolate in die Mikrobank überführt werden.

Zwölf der 21 dazugehörigen D-Platten (40 Prozent) waren in der PCR positiv, davon konnten acht Isolate gewonnen werden (Tabelle 4.6).

Bei den Rehen konnten aus den Kotproben zwölf *stx*-positive Isolate von zehn verschiedenen Tieren gewonnen werden. Die PCR der ON-Platten von Kot führte bei 22 Tieren zu positiven Ergebnissen. Davon konnten zehn Isolate gewonnen werden. Jedoch ergaben nur 5 der entsprechenden D-Platten (17 Prozent) ein positives PCR-Ergebnis. Davon konnten zwei Isolate gewonnen werden (Tabelle 4.6).

Tabelle 4.6 *Stx*-positive Nährmedien und gewonnene Isolate aus Rothirsch- und Rehproben

Tierart	Probe	Gesamt	Bouillon	ON	Isolate	D	Isolate
Rothirsch	Tonsille	30	9 (30 %)	5 (56 %)	3 (60 %)	0	0
	Lymphknoten	30	18 (60 %)	6 (33 %)	5 (83 %)	3 (17 %)	1 (33 %)
	Kot	30	n.d.	21 (70 %)	12 (57 %)	12 (40 %)	8 (67 %)
Reh	Kot	30	n.d.	22 (73 %)	10 (46 %)	5 (17 %)	2 (40 %)

n.d.=nicht durchgeführt ON=Overnight-Platte D=Direkt-Platte

4.1.4 Phänotypische Eigenschaften

Von den insgesamt 41 *stx*-positiven Isolaten von Rothirschen und Rehen besaßen alle die Fähigkeit den Zucker Sorbit zu fermentieren und zeigten eine positive Indolreaktion. 33 Isolate (80 Prozent) wiesen beta-D-Glucuronidase-Aktivität auf. Acht Isolate (20 Prozent) zeigten keine Fluoreszenz unter UV-Licht (Tabelle 4.7).

Tabelle 4.7 Phänotypische Eigenschaften der 41 Isolate von Rothirschen und Rehen

Substrat	Substratumsatz	
	positiv	negativ
Sorbit	41	0
Tryptophan	41	0
4-Methylumbelliferyl-beta-D-Glucuronid	33	8

Die gewonnenen Isolate wurden biochemisch analysiert. Es konnten alle als *E. coli* bestätigt werden (Anhang Abbildung 8.1 und Tabelle 8.8).

4.2 Verteilung der Virulenzgene

Das *stx2*-Gen wurde signifikant häufiger als das *stx1*-Gen gefunden ($p < 0,05$; Fisher-Test). Das Screening auf *stx1* und *stx2* ergab, dass alle 70 *stx*-positiven Proben der Wildwiederkäuer das *stx2*-Gen beherbergten. Bei einem Rothirsch waren drei Isolate, davon zwei aus Kot und ein Isolat aus Lymphknoten positiv für *stx1* und *stx2* (Anhang Abbildung 8.2 und Tabelle 8.9).

Bei der *stx2*-Subtypisierung wurden zwei verschiedene Subtypen gefunden: *stx2c* und *stx2d*. Hierbei konnte das *stx2d*-Gen bei 40 der 41 gewonnenen Isolaten (98 Prozent) detektiert werden und war der häufigste *stx*-Subtyp. Der Subtyp *stx2c* wurde bei einem Isolat (2 Prozent) gefunden. Von den drei *stx1*-positiven Isolaten (7 Prozent) konnte nur ein Isolat weiter zu *stx1c* subtypisiert werden. Die Subtypen *stx1d*, *stx2e* und *stx2f* wurden bei keinem Isolat festgestellt. Das Virulenzgen *hlyA* kam bei 18 Isolaten (44 Prozent) vor. *Saa* war nur bei drei Isolaten vorhanden (7 Prozent). Das Virulenzgen *eae* konnte bei keinem Isolat nachgewiesen werden.

Hinsichtlich der Genkombinationen war das *stx2d*-Gen alleine mit 22 mal (54 Prozent) bei den Wildwiederkäuern am meisten vertreten, gefolgt von *stx2d+hlyA* 13 mal (32 Prozent). Insgesamt wurden bei den 29 gewonnenen Isolaten der Rothirsche vier verschiedene und bei den 12 Isolaten der Rehe fünf verschiedene Genkombinationen gefunden (Tabelle 4.8 und Anhang Tabelle 8.9).

Tabelle 4.8 Genkombinationen der 41 Isolate von Rothirschen und Rehen

Genkombination	Anzahl Isolate	
	Rothirsch	Reh
<i>stx2d</i>	19	3
<i>stx2d+hlyA</i>	7	6
<i>stx2d+saa</i>	0	1
<i>stx1+stx2d+hlyA</i>	2	0
<i>stx1c+stx2d+hlyA</i>	1	0
<i>stx2c+hlyA+saa</i>	0	1
<i>stx2d+hlyA+saa</i>	0	1

Isolate der Rothirsche, die nur positiv für *stx2d* waren, konnten 19 mal detektiert werden, davon 13 mal aus Kotisolaten und jeweils dreimal aus Lymphknoten- bzw. Tonsillenisolaten (Tabelle 4.9). Die Genkombination *stx2d+hlyA* wurde siebenmal gefunden, davon fünfmal aus Kotisolaten und zweimal aus Lymphknotenisolaten.

Tabelle 4.9 Ergebnisse der 29 subtypisierten Isolate von 15 Rothirschen

Probe	Isolate	Genkombinationen			
		<i>stx2d</i>	<i>stx2d+hlyA</i>	<i>stx1+stx2d+hlyA</i>	<i>stx1c+stx2d+hlyA</i>
Tonsille	3	3	0	0	0
Lymphknoten	6	3	2	1	0
Kot	20	13	5	1	1
Gesamt	29 ¹	19 ¹	7 ¹	2 ²	1 ²

¹mehrere Isolate/Tier ²Rothirsch Nr. 12

Die Kombination *stx1+stx2d+hlyA* konnte in zwei Isolaten, einmal aus Kot und einmal aus Lymphknoten des gleichen Tieres, festgestellt werden. Die Genkombination *stx1c+stx2d+hlyA* konnte nur in einem Kotisolat nachgewiesen werden (Tabelle 4.9).

Von den 41 subtypisierten und auf Virulenzgene untersuchten Isolaten stammten von zehn Tieren je ein Kotisolat von einer ON-Platte und der dazugehörigen D-Platte. Bei einem der zehn Tiere konnte zudem die Genkombination von je einem Lymphknotenisolat von einer ON-Platte und der dazugehörigen D-Platte bestimmt werden. Von den insgesamt elf Isolaten von ON-Platten stimmten sieben Isolate hinsichtlich ihrer Genkombination mit den Isolaten der D-Platte überein. Bei den restlichen vier Isolaten wurde keine Übereinstimmung festgestellt (Tabelle 4.10).

Tabelle 4.10 Vergleich der Genkombinationen und der Serovare von Direkt- und Overnight-Platte

Tiernummer ¹	Probe	Direkt-Platte	Serovar	Overnight-Platte	Serovar
Rothirsch					
8	Kot	<i>stx2d</i>	O146:H28	<i>stx2d</i>	O146:H28
11	Kot	<i>stx2d</i>	O130:[H30]	<i>stx2d</i>	O130:[H30]
11	Lymphkn.	<i>stx2d</i>	O21:H21	<i>stx2d</i>	O21:H21
12	Kot	<i>stx1+stx2d+hlyA</i>	O174:H8	<i>stx1c+stx2d+hlyA</i>	O174:[H8]
17	Kot	<i>stx2d</i>	O146:H28	<i>stx2d+hlyA</i>	O18:H49
18	Kot	<i>stx2d+hlyA</i>	O130:[H30]	<i>stx2d</i>	O130:[H30]
21	Kot	<i>stx2d</i>	Orau:H28	<i>stx2d</i>	Orau:H28
24	Kot	<i>stx2d+hlyA</i>	O18:[H49]	<i>stx2d+hlyA</i>	ONT:H49
28	Kot	<i>stx2d</i>	Orau:H28	<i>stx2d</i>	Orau:H28
Reh					
3	Kot	<i>stx2d+hlyA</i>	O21:H21	<i>stx2d+hlyA</i>	Orau:[H21]
11	Kot	<i>stx2c+hlyA+saa</i>	O142:H16	<i>stx2d+hlyA+saa</i>	O21:H21

¹siehe Anhang Tabelle 8.3 und 8.4 NT=not typable []=unbeweglich Lymphkn.=Lymphknoten

4.3 Ergebnisse der Serotypisierung

Die 41 Isolate der Wildwiederkäuer ließen sich elf verschiedenen Serovaren zuordnen. Hierbei traten acht verschiedene O-Typen (O18, O21, O88, O110, O130, O142, O146, O174) und sieben verschiedene H-Typen (H8, H16, H21, H28, H30, H31, H49) auf. Ein raues Lipopolysaccharid (Orau) wurde bei elf Isolaten gefunden. Ein Isolat wies ein nicht typisierbares O-Antigen auf (ONT). Die Serovar Orau:H28 wurde am häufigsten detektiert mit neun von 41 Isolaten (22 Prozent). Die zweithäufigste Serovar O130:H30 wurde bei acht Isolaten (20 Prozent) nachgewiesen, davon waren jedoch mit Ausnahme eines Isolates alle unbeweglich. Die Serovare O146:H28 und O21:H21 wurden bei je sechs Isolaten gefunden. Dreimal konnte die Serovar O174:H8 detektiert werden, dabei war ein Isolat unbeweglich. Zwei Isolate wiesen O110:H31 auf, wobei beide unbeweglich waren. O18:H49 und Orau:H21 kamen ebenfalls bei je zwei Isolaten vor, davon war je ein Isolat unbeweglich. ONT:H49, O142:H16 und die unbewegliche Serovar O88:H8 wurden jeweils einmal nachgewiesen (Anhang Tabelle 8.10).

Bei fünf der zehn Wildwiederkäuer, bei denen jeweils ein ON- und ein D-Isolat derselben Probe gewonnen werden konnte, unterschieden sich die beiden Isolate hinsichtlich ihrer Serovar. Davon wies in drei Fällen das ON-Isolat eine andere Genkombination auf als das dazugehörige D-Isolat. Bei den restlichen fünf Wildwiederkäuern war die Serovar des ON- und dazugehörigen D-Isolats identisch, jedoch stimmte der Genotyp in einem Fall nicht überein (Tabelle 4.10).

Bei zwei der vier Rothirsche, bei denen von verschiedenen Probenmaterialien Isolate gewonnen werden konnten, stimmte die Serovar von Kot und Tonsille bzw. Lymphknoten überein, jedoch nicht der Genotyp. Bei einem weiteren Tier war der Genotyp des Kot- bzw. Lymphknotenisolats identisch, aber die Isolate wiesen verschiedene Serovare auf. Der Rothirsch, von dem Isolate aus allen drei Matrices gewonnen werden konnte, wies im Tonsillenisolat einen anderen Genotyp und eine andere Serovar auf als im Kot- bzw. Lymphknotenisolat (Anhang Tabellen 8.9 und 8.10).

4.4 PCR-Etablierung

Für die Auswertung des Temperaturgradienten von 52 °C bis 62 °C für die verschiedenen Primerpaare wurde der C_t -Wert, sowie der Verlauf der Amplifikations- und Schmelzkurven herangezogen. Den niedrigsten C_t -Wert zeigten die Primerpaare für *stx2d* und *eae* bei 52 °C; für *stx1c*, *stx2c*, *stx2e* und *stx2f* bei 54 °C; für *stx2d* und *hlyA* bei 56 °C und für das Primerpaar für *saa* bei 60 °C (Tabelle 4.11). Für die Primerpaare für den Nachweis der Gene *stx1d*, *stx2c*, *stx2d*, *stx2e*, *stx2f*, *eae*, *hlyA* und *saa* zeigten die PCR-Produkte einen klaren Schmelzkurvenverlauf bei 56 °C, für das Primerpaar für *stx1c* war der Kurvenverlauf bei 54 °C besser (Abbildung 4.1, Abbildung 8.3 im Anhang).

Tabelle 4.11 C_t -Werte der Primerpaare bei verschiedenen Annealingtemperaturen

Temperatur [°C]	C_t -Wert der Primerpaare für die Gene:								
	<i>stx1c</i>	<i>stx1d</i>	<i>stx2c</i>	<i>stx2d</i>	<i>stx2e</i>	<i>stx2f</i>	<i>eae</i>	<i>hlyA</i>	<i>saa</i>
61,6	n.v.	26,1	34,2	n.v.	n.v.	n.v.	31,5	27,3	28,6
60,0	n.v.	23,9	23,1	30,9	26,4	33,4	30,1	25,2	22,3
58,2	n.v.	23,3	21,0	28,9	23,9	29,9	26,8	24,7	22,5
55,8	33,1	22,8	20,1	27,8	21,6	27,2	24,2	24,4	22,4
54,1	27,0	23,3	19,7	27,9	20,9	25,8	23,9	26,4	23,3
52,1	29,1	22,8	20,6	26,9	21,0	27,0	23,4	26,6	23,6

n.v.=nicht vorhanden

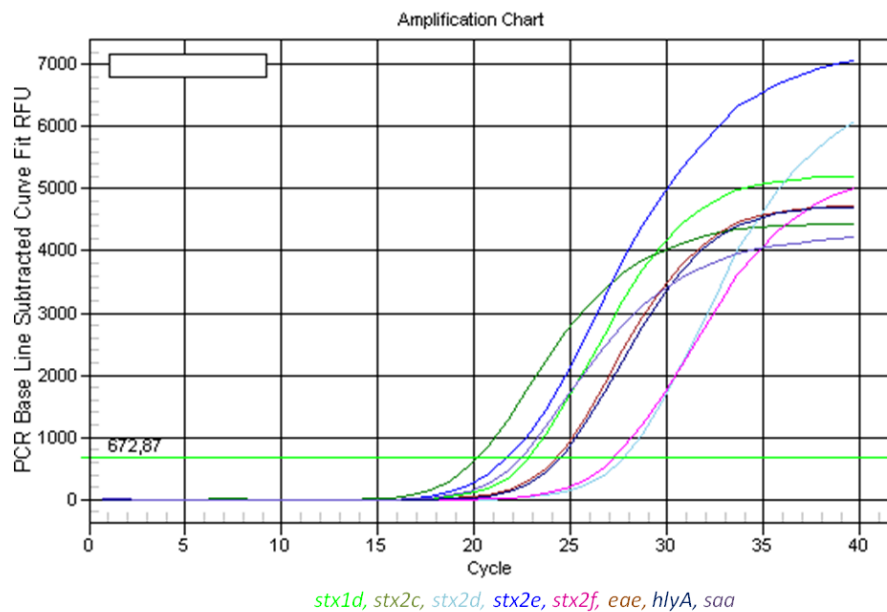


Abbildung 4.1 Amplifikationskurven der Virulenzgene und *stx*-Subtypen bei 56 °C

Da die Spezifität der Primer mit steigender Temperatur zunimmt und bei den meisten Primerpaaren die C_t -Wert-Abweichungen gering waren, wurden für die *stx*-Subtypisierung und das Virulenzgen-Screening eine Annealingtemperatur von 56 °C gewählt. Lediglich für das Primerpaar für *stx1c* wurde die Annealingtemperatur bei 54 °C festgesetzt, da hier der C_t -Wert zu stark abwich und der Kurvenverlauf bei 56 °C deutlich schlechter war (Anhang Abbildung 8.4 und 8.5).

Die Überprüfung der Amplifikatgröße mittels Gelelektrophorese zeigte, dass die DNA-Amplifikate die jeweils zu erwartende Basenpaarlänge aufwiesen (Tabelle 3.5 und Abbildung 4.2). Die Basenpaarlänge konnte anhand des mitgeführten Längenstandards für jedes Amplifikat überprüft werden.

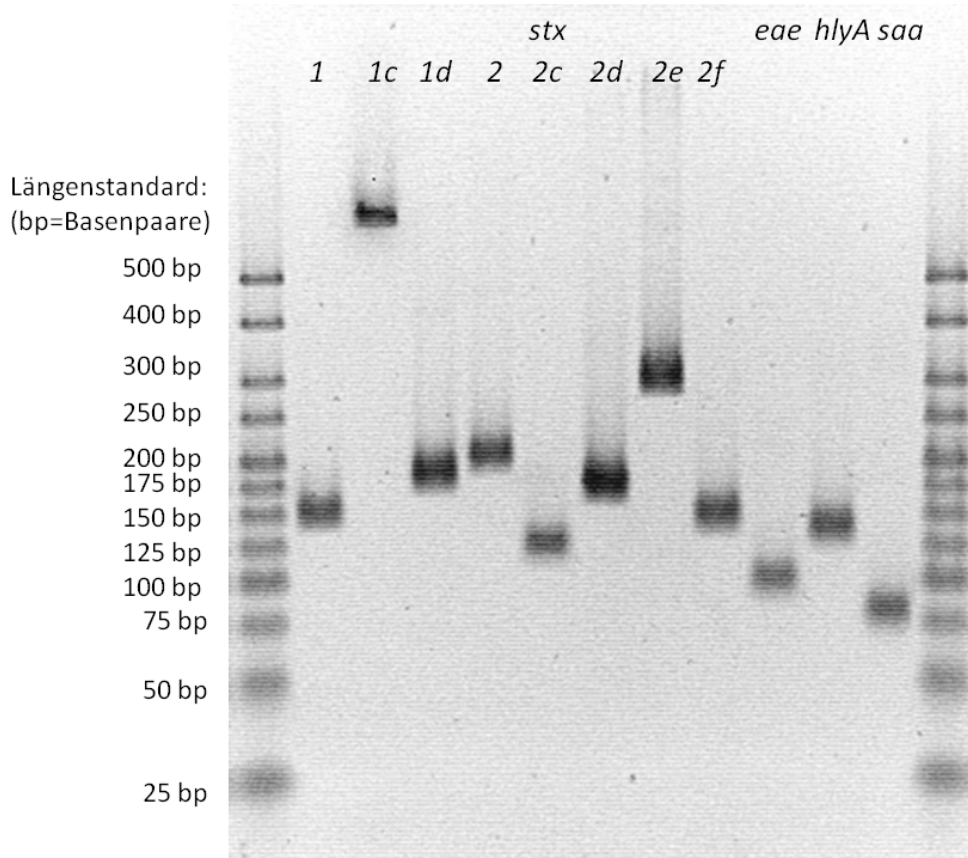
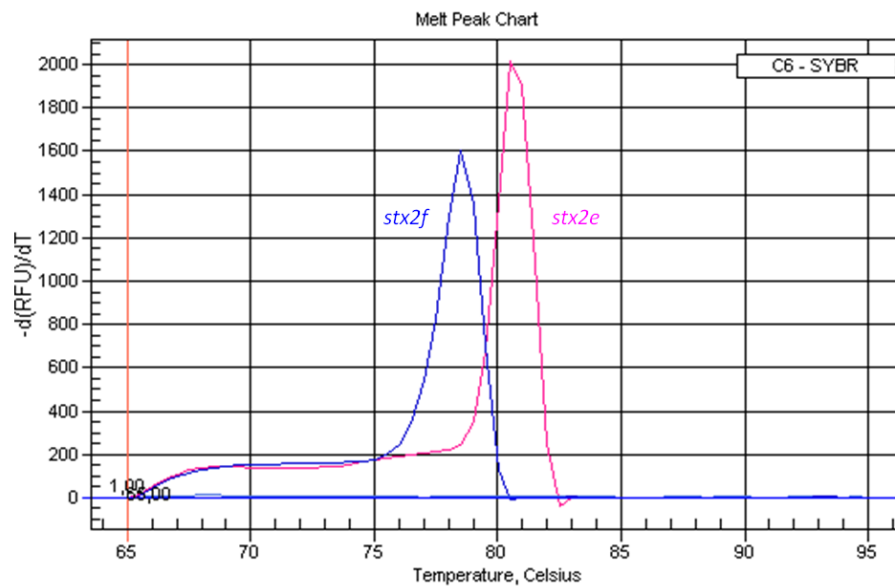


Abbildung 4.2 Gelelektrophorese der DNA-Amplifikate (Negativabbildung)

Für die Subtypen *stx2e* und *stx2f* konnte eine multiplex Real-Time PCR als Screening Methode etabliert und parallel zum *stx1*- und *stx2*-Screening durchgeführt werden. Die Annealingtemperatur war für die Primerpaare *stx2e* und *stx2f* jeweils bei 56 °C möglich. Die Schmelzkurvenanalyse ergab, dass die Schmelztemperatur von *stx2e* bei 80,5 °C und von *stx2f* bei 78,5 °C liegt (Tabelle 4.12). Damit sind die Schmelzkurven von *stx2e* und *stx2f* gut voneinander zu differenzieren (Abbildung 4.3).

Tabelle 4.12 Ermittelte Schmelztemperaturen der Virulenzgene und *stx*-Subtypen

Primer	Gen	Schmelztemperatur [°C]
Lin-up/1OX3	<i>stx1c</i>	84,0
VT1AvarF/-R	<i>stx1d</i>	80,5
<i>stx2c</i> -a/-b	<i>stx2c</i>	78,5
<i>stx2d</i> -a/-b	<i>stx2d</i>	82,5
<i>stx2e</i> -a/-b	<i>stx2e</i>	80,5
<i>stx2f</i> -a/-b	<i>stx2f</i>	78,5
eae-F2/-R	<i>eae</i>	78,5
ehec-F2/-R	<i>hlyA</i>	77,5
Saa-F/-R	<i>saa</i>	80,5

Abbildung 4.3 Schmelzkurven der multiplex Real-Time PCR für *stx2e* und *stx2f*

4.5 Vergleich der Anreicherungsmedien

Der Vergleich der Nährmedien BPW gegen mTSB+N wurde bei 40 Kotproben durchgeführt (Tabelle 4.13). Aus BPW wurden drei Isolate mehr als aus mTSB+N gewonnen. Der Fisher-Test ergab für den Vergleich von BPW mit mTSB+N keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich des Isolierungserfolgs von STEC ($p=0,81$).

Die PCR der 40 ON-Platten, die als 3-Ösenausstrich von der mTSB+N Bouillon hergestellt wurden, lieferte bei 27 Platten ein *stx2*-positives Ergebnis. Von acht der 27 *stx*-positiv getesteten Platten konnten Isolate gewonnen werden.

Von den 40 ON-Platten aus BPW wurde das *stx*-Gen 29 mal detektiert. Hierbei waren alle eindeutig *stx2* positiv. Isolate konnten von elf der 29 *stx*-positiven Platten in die Mikrobank überführt werden.

Tabelle 4.13 Ergebnisse der Anreicherungsmedien mTSB+N und BPW

Probe	Anzahl	mTSB+N		BPW	
		+ON	Isolate	+ON	Isolate
Kot	40	27 (68 %)	8 (30 %)	29 (72,5 %)	11 (38 %)

mTSB+N=modified Tryptic Soy Broth + Novobiocin (16 mg/l)

BPW=Buffered Peptone Water

+ON=*stx*-positive Overnight-Platte

5 Diskussion

5.1 Prävalenz

In dieser Arbeit konnte mit 83 Prozent eine sehr hohe Prävalenz von STEC in bayerischen Wildwiederkäuern ermittelt werden. Betrachtet man nur die Wildwiederkäuer, die einen *stx*-positiven Befund im Kot aufwiesen, so waren es 43 der 60 Tiere (72 Prozent). Die belgische Studie von PIERARD et al. (1997) ergab mit bis zu 79 Prozent bei Wildwiederkäuer eine ähnlich hohe Prävalenz. Die Ergebnisse deutscher Studien über das Vorkommen von STEC bei Wildwiederkäuern liegen zwischen 29 und 52 Prozent (LEHMANN et al., 2006; DIEPOLDER, 2008). THOMS (1999) konnte allerdings das *stx*-Gen im Kot nur bei 6 von 53 Rehen (11 Prozent) detektieren. Im Rahmen von Lebensmittelplanproben untersuchtes Wildfleisch wies eine STEC-Prävalenz von ca. 10 bis 15 Prozent auf (HARTUNG, 2007, 2008). Für den Nachweis von STEC im Kot bayerischer Rinder konnte mit 50 Prozent eine etwas niedrigere STEC-Prävalenz als in dieser Arbeit ermittelt werden (MAYRS-HOFER, 2005). Bei Untersuchungen auf STEC in Wildwiederkäuern aus anderen Ländern wird für Kot meist eine niedrigere Prävalenz festgestellt. So führte eine argentinische Studie bei Wildwiederkäuern in ca. 25 Prozent zu einem *stx*-positiven Ergebnis (LEOTTA et al., 2006). Eine in Japan durchgeführte Studie bei Wildwiederkäuern wies mit etwa 10 Prozent ebenfalls eine geringe Prävalenz für STEC im Kot auf (FUKUYAMA et al., 1999). Bei der Untersuchung von Wildwiederkäuern in England auf *E. coli* O157 ergab eine der 27 Kotproben (3,7 Prozent) ein *stx*-positives Ergebnis (PRITCHARD et al., 2009). In den USA wurden für die STEC-Prävalenz bei Wildwiederkäuern Werte von unter 5 bis ca. 20 Prozent ermittelt (ISHII et al., 2007; GILBREATH et al., 2009).

Die Populationsdichte an Wildwiederkäuern im Bayerischen Wald ist eher niedrig (HEURICH, 2010). Daher stellen die Hauptursachen für die in dieser Arbeit gefundene hohe Prävalenz wahrscheinlich die Haltungform und die Zufütterung der Tiere im Winter dar. In dieser Jahreszeit werden die Rothirsche in 30 bis 50 ha großen eingezäunten Bereichen gehalten und darin auch gefüttert. Folglich kann dies an den Futterstellen zu einem 'Crowding Effekt' führen. Die Rehe wurden im Rahmen des Kennzeichnungsprojekts mit Futter angelockt. Dadurch besteht bei beiden Tierarten ein erhöhtes Übertragungsrisiko von STEC durch orale Aufnahme von Kot *stx*-positiver Tiere. Da nicht beschrieben ist, das STEC bei Wildwiederkäuern zu einer Erkrankung oder zum Tod führt, gehören sie wahrscheinlich zur normalen Darmflora (NAYLOR et al., 2005). Dies bedeutet, dass die Wildwiederkäuer ein arttypisches Lebensalter erreichen und während dieser ganzen Zeit als STEC-Überträger fungieren können.

Beim Rothirsch ergab die Untersuchung der drei verschiedenen Matrices für Kot die höchste STEC-Prävalenz. Mesenteriallymphknoten und Tonsillen wiesen in dieser Arbeit eine Prävalenz von 60 bzw. 30 Prozent auf. Studien über den Nachweis von STEC im lymphatischen Gewebe von Wildwiederkäuern konnten in der Literatur nicht gefunden werden. Über den Nachweis von STEC im lymphatischen Gewebe von Wiederkäuern liegen nur wenige wissenschaftliche Berichte vor. BONARDI et al. (2007) untersuchte Rinderfäzes, -lymphknoten und -tonsillen auf die *stx*-positiven Serovare O26, O103, O111, O145 und O157. Es führten sieben von 182 Kotproben (4 Prozent), aber nur einer von 89 Lymphknoten (1 Prozent) und eine von 93 Tonsillen (1 Prozent) zu einem positiven Ergebnis. Da jedoch nur auf bestimmte Serovare untersucht wurde, ist dieses Ergebnis nur schwer mit den Ergebnissen dieser Arbeit zu vergleichen. BUMANN (2010) detektierte das *stx*-Gen bei 16 Kotproben und 11 Tonsillen von insgesamt 200 untersuchten kleinen Wiederkäuern aus der Schweiz.

Die für Kot gefundene höchste STEC-Prävalenz beim Vergleich der drei Matrices lässt sich dadurch erklären, dass STEC wahrscheinlich zur normalen Darmflora der Wildwiederkäuer zählt. Die in dieser Arbeit ermittelte hohe Prävalenz für STEC im Lymphknoten ist teilweise vermutlich auf eine Kotkontamination bei der Probennahme zurückzuführen. Aufgrund der Probennahme am Erlegungsort konnte nicht unter vollständig sterilen Bedingungen gearbeitet werden. Bei den

neun Rothirschen (Tabelle 4.1), die *stx*-positive Tonsillen aufwiesen, kam es wahrscheinlich durch orale Aufnahme von STEC-haltigem Kot zu einer Kontamination. Bei dem einen Rothirsch, der nur einen *stx*-positiven Befund für die Tonsillen ergab, blieb es entweder bei einer lokalen Kontamination, oder der Kot war aufgrund einer intermittierenden STEC-Ausscheidung zum Zeitpunkt der Probennahme negativ. Des Weiteren trägt die Haltungform der Rothirsche im Winter insgesamt zu einer höheren Nachweisrate mit STEC bei.

Hinsichtlich den Tierarten Rothirsch und Reh wurde im Kot für beide mit 70 bzw. 73 Prozent kein signifikanter Unterschied festgestellt. Andere Studien, die Rothirsch und Reh verglichen haben, wiesen ebenfalls keinen Unterschied auf. Jedoch lag die STEC-Prävalenz bei diesen Studien generell niedriger. So ergab die in Deutschland durchgeführte Untersuchung von DIEPOLDER (2008) eine STEC-Prävalenz von ca. 20 Prozent für Rothirsch und ca. 30 Prozent für Reh. Die bei dieser Studie gefundene deutlich niedrigere Prävalenz für STEC lässt sich sehr wahrscheinlich dadurch erklären, dass es sich um Muskulatur und nicht um Kot als Probenmaterial handelte. Die von LILLEHAUG et al. (2005) ermittelten Prävalenzen bei Rothirsch und Reh in Norwegen waren für beide Tierarten mit ca. 1,5 Prozent für Rothirsch bzw. 0 Prozent für Reh vergleichbar niedrig. Eine Untersuchung in Spanien auf die Serovar O157:H7 führte bei 3 der 206 Rothirschen zu einem positiven Ergebnis. Alle untersuchten Rehe waren negativ (GARCIA-SANCHEZ et al., 2007). Eine in Belgien durchgeführte Studie von PIERARD et al. (1997) ergab dagegen mit 41 Prozent für Rothirsch und 79 Prozent für Reh einen Unterschied hinsichtlich der STEC-Prävalenz. Die Mehrzahl der Studien stützt das in dieser Arbeit festgestellte Ergebnis. Daher ist anzunehmen, dass die sehr ähnliche Physiologie und das ähnliche Ernährungsverhalten von Rothirsch und Reh zu keinem Unterschied bezüglich der STEC-Prävalenz bei den beiden Tierarten führt.

5.2 Alters-und Geschlechtsverteilung

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten für beide untersuchten Tierarten, dass das Geschlecht für die STEC-Prävalenz nicht relevant ist. Es konnte in der Literatur keine Studie gefunden werden, die bei Wildwiederkäuern diesen Aspekt betrachtet. Untersuchungen bei Rindern auf das Vorkommen von STEC bezogen auf die Geschlechtsverteilung bestätigten das in dieser Arbeit ermittelte Ergebnis (GEUE et al., 2002; MÖLLER-NIELSEN et al., 2002). Die Studie von GEUE et al. (2002) zeigte, dass die STEC-Prävalenz in einem Fall bei Bullen mit über 80 Prozent höher, im anderen Fall mit unter 30 Prozent deutlich unter der STEC-Prävalenz von ca. 60 Prozent der weiblichen Herde liegen kann und somit das Geschlecht keine Rolle spielt. Aus diesen Studien und der hier vorgelegten Arbeit lässt sich schlussfolgern, dass für das Vorkommen von STEC das Geschlecht keine Bedeutung hat.

Des Weiteren wies der Vergleich von trächtigen mit nicht trächtigen Tieren keinen signifikanten Unterschied auf. Dieses Ergebnis deckt sich mit dem Ergebnis einer amerikanischen Studie, bei der hinsichtlich dem Vorkommen von *E. coli* O157 kein Unterschied zwischen trächtigen und nicht trächtigen Kühen festgestellt wurde (RILEY et al., 2003). Es ist daher anzunehmen, dass eine Trächtigkeit nicht zu einem erhöhten Infektionsrisiko oder zu einer erhöhten STEC-Ausscheidung führt.

Für die drei Altersgruppen konnte ebenfalls kein signifikanter Unterschied ermittelt werden. Es sind Studien beschrieben, die die STEC-Prävalenz in Bezug zum Alter bei Hauswiederkäuern analysierten, jedoch nicht für Wildwiederkäuer. Die Ergebnisse dieser Studien zeigten, dass mit zunehmendem Alter der Tiere die STEC-Prävalenz abnahm (COOKSON et al., 2006; DÖPFER et al., 2006; SHEKARFOROUSH et al., 2008; CHO et al., 2009; MILNES et al., 2009). Der Grund für die Abweichung der Ergebnisse dieser Arbeit könnte die geringe Tieranzahl bzw. die teilweise fehlenden Altersangaben bei den Rehen sein. Jedoch ist es durchaus auch möglich, dass bei Wildwiederkäuern aufgrund ihrer Lebensweise oder ihrer Physiologie kein Zusammenhang zwischen Alter und der STEC-Prävalenz besteht.

5.3 Genausstattung und Serovare der gewonnenen Isolate

Alle *stx*-positiven Proben besaßen das *stx2*-Gen. Nur bei drei Proben konnte neben dem *stx2*-Gen das *stx1*-Gen detektiert werden. Dieses Ergebnis ist vergleichbar mit einer 2006 in Deutschland durchgeführten Studie bei Wildwiederkäuern, bei der zu ca. 90 Prozent das *stx2*-Gen nachgewiesen wurde (LEHMANN et al., 2006). In Japan konnten ASAKURA et al. (1998) ebenfalls nur *stx2*-positive Wildwiederkäuer feststellen. FUKUYAMA et al. (1999) detektierten hingegen bei Wildwiederkäuer häufiger das *stx1*-Gen mit 48 Prozent als das *stx2*-Gen mit 24 Prozent.

Hinsichtlich der *stx*-Subtypen kam in dieser Arbeit *stx2d* mit 98 Prozent am häufigsten vor. Die große Verbreitung dieses Subtypen bei Wildwiederkäuern werden durch die Untersuchungen von LEHMANN et al. (2006) und von BEUTIN und MIKO (2009) gestützt. Der Subtyp *stx1c*, der in dieser Arbeit bei einem Isolat gefunden wurde, konnte in Studien von LEOTTA et al. (2006) und ISHII et al. (2007) ebenfalls bei Wildwiederkäuern detektiert werden. Der Subtyp *stx2c* wurde in dieser Arbeit bei einem Isolat festgestellt. In der Literatur konnte der Nachweis von *stx2c* in Wildwiederkäuern nicht gefunden werden. Jedoch konnte er schon bei Hauswiederkäuern bestätigt werden. *Stx2c* wird eine hohe Humanpathogenität zugesprochen, da dieser Subtyp meist aus HUS- oder HC-Patienten isoliert wird (STRAUCH et al., 2008; LEFEBVRE et al., 2009).

Der in dieser Arbeit ermittelte Wert für das Virulenzgen *hlyA* lag bei 44 Prozent. Mit 35 Prozent bzw. über 50 Prozent für das Vorkommen von *hlyA* bei Wildwiederkäuern führten die Studien von LEHMANN et al. (2006) und von BEUTIN und MIKO (2009) zu vergleichbaren Ergebnissen. Das Vorkommen von *saa* bei den 41 Isolaten betrug in dieser Arbeit 7 Prozent. Das *saa*-Gen konnte in anderen Studien bei Isolaten von Wild- und Hauswiederkäuern zu einem deutlich höheren Prozentsatz nachgewiesen werden (JENKINS et al., 2003; ISHII et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2007). Das Virulenzgen *saa* war in dieser Arbeit bei zwei Isolaten mit dem *hlyA*-Gen assoziiert. Auch anderer Autoren haben die Kombination von *saa* mit *hlyA* gefunden (PATON et al., 2001; JENKINS et al., 2003; ORDEN et al., 2005). Bei keinem der 41 Isolate wurde das *eae*-Gen detektiert. Ebenso wie in dieser Arbeit,

fürten Untersuchungen von LEOTTA et al. (2006) bei 24 Wildwiederkäuern und von LEHMANN et al. (2006) bei 34 Wildwiederkäuern zu keinem Nachweis von *eae*.

Bezüglich den Genkombinationen kam der Subtyp *stx2d* ohne Nachweis der drei Virulenzgene *eae*, *hlyA* und *saa* am häufigsten vor. 32 Prozent der Isolate wiesen eine Kombination von *stx2d* mit dem Virulenzgen *hlyA* auf. Dieses Ergebnis wird von der Studie von LEHMANN et al. (2006) bestätigt. Die Kombination *stx2d* mit *saa* wurde in dieser Arbeit ebenfalls detektiert, jedoch nicht die Kombination *stx2d* mit *eae*. BEUTIN et al. (2004) konnten den Subtyp *stx2d* ebenfalls nur bei *eae*-negativen humanen Isolaten vorfinden.

Aus den Ergebnissen ist abzuleiten, dass das *stx2*-Gen mit dem Subtyp *stx2d* bei den Wildwiederkäuern zu dominieren scheint. Andere *stx*-Subtypen sind dagegen in Deutschland bei Wildwiederkäuern weniger verbreitet. Mit dem *stx*-Subtyp *stx2c* konnte ein STEC-Stamm detektiert werden, der vermutlich eine höhere Humanpathogenität besitzt. Des Weiteren ist anzunehmen, dass von den drei untersuchten Virulenzgenen das *hlyA*-Gen bei Wildwiederkäuern am weitesten verbreitet ist.

Von vier Tieren wurden in dieser Arbeit je zwei Isolate gewonnen, die sich in ihrem Genotyp unterschieden. Somit konnte gezeigt werden, dass ein Tier Träger mehrerer STEC-Stämme sein kann. Vorstellbar wäre es, dass auf einer SMAC-Platte nach Übernachtenreicherung mehrere STEC-Stämme wachsen. Jedoch liegt die Vermutung näher, dass durch die Übernachtenreicherung eine Vermehrung zugunsten eines bestimmten STEC-Stammes stattfindet und dieser folglich auf der SMAC-Platte dominiert. Wohingegen ein Direktausstrich anderen STEC-Stämmen einen Selektionsvorteil bietet. Auf diese Fragestellung konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht näher eingegangen werden, bedarf jedoch weiterer Forschung.

Es konnten deutlich mehr Kotisolate von Rothirschen als von Rehen gewonnen werden. Besonders bei den Direktausstrichen fällt ein deutlicher Unterschied auf, wenn man den Wert von 40 Prozent der *stx*-positiven D-Platten von Rothirschkot mit dem entsprechenden Wert von 17 Prozent von Rehkot vergleicht. Wahrscheinlich wurden bei den Rehen weniger Isolate von D-Platten gewonnen, da der Kot im Gegensatz zum Kot der Rothirsche tiefgefroren gelagert wurde. Dies wurde auch

von anderen Autoren berichtet (MCDONOUGH et al., 2000; VAGSHOLM et al., 2003). Dadurch waren die STEC vermutlich stark geschädigt oder nicht mehr vital. Bei den Direktausstrichen vermehrten sie sich somit nicht mehr, oder wurden von anderen Bakterien überwuchert. Erst durch die Übernachtenreicherung konnten die STEC-Zellen sich regenerieren und so stark vermehren, dass sie auf der SMAC-Platte mit einer höheren Wahrscheinlichkeit vorzufinden waren.

Die Serotypisierung der 41 Wildwiederkäuerisolate führte zu elf verschiedenen Serovaren. Die in dieser Arbeit detektierten Gruppen O21, O88 und O146, sowie H8, H21 und H28 sind bei einer Studie von BEUTIN und MIKO (2009) in Wildfleischisolaten gefunden worden. Die Kombinationen O146:H28, O21:H21 und O174:H8 wurden bei Wildwiederkäuer ebenfalls schon festgestellt (LEHMANN et al., 2006; ISHII et al., 2007). Hinsichtlich der Humanpathogenität ist in der Literatur beschrieben, dass die Serovare O88:H8, O146:H28 und O157:H7 in Deutschland schon beim Menschen zu Erkrankungen führten (BEUTIN et al., 2004). Allerdings besaßen diese Serovare den potentiell humanpathogeneren Genotyp *stx2c*. In dieser Arbeit sind die genannten Serovare dagegen mit *stx2d* assoziiert. Laut der Statistik des RKI (2010) wurden die O-Typen O130, O142, O146, O174 und O18 bei humanen EHEC-Fällen in den Jahren 2009 und 2010 in Deutschland, davon zum Teil auch in Bayern, nachgewiesen. Eine Angabe des RKI über die genotypischen Eigenschaften der EHEC-Isolate liegt nicht vor. Jedoch verdeutlichen diese Daten, dass mit fünf der acht in dieser Arbeit gefundenen O-Antigenen mehr als die Hälfte allein in den letzten zwei Jahren in Deutschland mit EHEC-Fällen assoziiert war. Um jedoch eine Aussage über die Humanpathogenität eines Isolats treffen zu können, sind neben den serologischen und genotypischen Eigenschaften auch die Umwelt- und Wirtsfaktoren zu berücksichtigen. Aus diesem Grund kann bei einigen Serovaren der 41 Wildwiederkäuerisolate ein humanpathogenes Potential zwar nicht ausgeschlossen werden, aber auch nicht mit Sicherheit bestätigt werden.

5.4 PCR-Etablierung

Für die *stx*-Subtypisierung, mit Ausnahme des Subtypen *stx1c*, und die Gene *eae*, *hlyA* und *saa* wurde ein identisches PCR-Protokoll entwickelt. Auf diese Weise

konnten die Subtypisierung und das Virulenzgen-Screening in einem gemeinsamen PCR-Lauf durchgeführt werden und so Zeit und Kosten gespart werden.

Des Weiteren wurde erfolgreich eine multiplex PCR für *stx2e* und *stx2f* etabliert. Da in der Literatur *stx2e* und *stx2f* bisher noch nie bei Wildwiederkäuern nachgewiesen wurde, konnten diese beiden Subtypen durch die etablierte multiplex PCR schon parallel zum *stx*-Screening abgehandelt werden und so Materialkosten gespart werden. Gleichzeitig wurde durch die parallel zum *stx*-Screening durchgeführte Untersuchung auf den *stx2f*-Subtypen sichergestellt, dass *stx2f*-positive Proben detektiert wurden. Dies war notwendig, da der in dieser Arbeit verwendete *stx2*-Primer nicht *stx2f* amplifiziert.

5.5 Anreicherungsmedien im Vergleich

Zwischen den beiden Anreicherungsmedien mTSB+N (16 mg/l Novobiocin) und BPW konnte kein signifikanter Unterschied bezüglich der Isolierung von STEC festgestellt werden. Jedoch konnten in dieser Arbeit mit BPW drei Isolate mehr (11 Isolate) gewonnen werden. Bei vergleichbaren Studien wirkte sich der Zusatz von Novobiocin negativ auf die Vermehrung und Isolierung von STEC aus (VIMONT et al., 2007; JASSON et al., 2009; BEUTIN et al., 2010). JASSON et al. (2009) verglichen verschiedene Anreicherungsmedien für den Nachweis sublethal geschädigter *E. coli* O157 in Lebensmitteln. In dieser Studie führte eine Anreicherung in BPW zu einer höheren Nachweisrate als in mTSB mit 10 mg/l Novobiocin. VIMONT et al. (2007) untersuchten den Einfluss von Novobiocinzusatz auf die Vermehrung von STEC. Die Ergebnisse zeigten, dass Novobiocin das Wachstum einiger STEC hemmt und diese Supplementierung für den Nachweis von STEC in Lebensmitteln ungeeignet ist. Eine andere Studie erzielte für tiefgefrorene Lebensmittel ebenfalls schlechtere Ergebnisse für ein Anreicherungsmedium mit Novobiocin im Vergleich zu dem nicht selektiven BPW (BEUTIN et al., 2010). Andere Autoren sind der Meinung, dass für gestresste und geschädigte STEC eine Voranreicherung in einem nicht selektiven Medium wie BPW oder TSB notwendig ist, bevor ein Antibiotikazusatz erfolgt (DE BOER und HEUVELINK, 2000; HUSSEIN und BOLLINGER, 2008). Auch wenn in dieser Arbeit mit beiden Anreicherungsmedien ähnliche Ergebnisse erzielt wurden,

bietet BPW einige Vorteile. So kann ein und dieselbe BPW-Bouillon verwendet werden um parallele Untersuchungen auf weitere pathogene Bakterien durchzuführen. Dies ist insbesondere vorteilhaft, wenn nur wenig Probenmaterial zur Verfügung steht. Anreicherungsprotokolle mit BPW sind z.B. für den Nachweis von *Salmonella* (Methode der ASU nach §64 LFGB L 00.00-52 (2000)), *Bacillus cereus* (N.N., 2008b) und *Listeria monocytogenes* (DUFFY et al., 2001) beschrieben. Auf diese Weise können Material, Zeit und Platz eingespart werden. Des Weiteren ist diese Anreicherung kostengünstiger.

5.6 Schlussfolgerung

Die in dieser Arbeit untersuchten Wildwiederkäuer waren zu einem sehr hohen Prozentsatz Ausscheider von STEC. Dies zeigt, dass Wildwiederkäuer als primäres Reservoir für STEC eine bedeutende Rolle für EHEC-Infektionen einnehmen könnten. Die höhere Nachweisrate für STEC im Kot im Vergleich zu Lymphknoten und Tonsillen konnte in dieser Arbeit ebenfalls gezeigt werden. Des Weiteren wurde keine Geschlechtsabhängigkeit hinsichtlich der Prävalenz von STEC festgestellt. Eine Korrelation zwischen der STEC-Prävalenz und dem Tieralter konnte in dieser Arbeit bei Wildwiederkäuern nicht dokumentiert werden. Alle Tiere waren *stx2*-positiv, wobei der Subtyp *stx2d* dominierte. *Eae*-positive STEC wurden in dieser Arbeit nicht gefunden. Daher stellen Wildwiederkäuer vermutlich vorwiegend ein Reservoir für *eae*-negative STEC dar. Obgleich verschiedene Genkombinationen festgestellt wurden, wiesen die meisten Genkombinationen auf ein geringes humanpathogenes Potential der STEC-Isolate hin. Mit elf verschiedenen Serovaren wurde eine relativ geringe serologische Diversität der Isolate ermittelt. Bei einigen Isolaten kann aufgrund der serologischen Eigenschaften und der Genkombinationen auf ein humanpathogenes Potential geschlossen werden, insbesondere bei dem Stamm O142:H16 mit der Kombination *stx2c+hlyA+saa*. Phänotypisch zeigten sich alle STEC-Isolate Sorbit-positiv. Bezüglich des Vergleichs der Anreicherungsmedien konnte mit BPW ein geringgradig besserer Isolierungserfolg von STEC erzielt werden als mit mTSB+N.

6 Zusammenfassung

STEC zählen zu den bedeutenden lebensmittelhygienisch-relevanten Bakterien mit zoonotischem Potential. Als Hauptreservoir für STEC werden Wiederkäuer angesehen. Wildwiederkäuer werden als weiteres wichtiges Reservoir diskutiert, jedoch liegen bislang nur wenige Studien vor, die sich mit diesem Themengebiet befassen. Um herauszufinden, inwieweit Wildwiederkäuer als Träger von STEC eine Rolle spielen, wurden von Rothirschen und Rehen aus dem Bayerischen Wald Proben untersucht. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit bestand darin, die Virulenzgenkombinationen von isolierten STEC-Stämmen zu bestimmen, da neben dem namensgebenden *stx*-Gen auch andere Virulenzgene von Bedeutung sind.

Insgesamt wurden 120 Proben von Wildwiederkäuern untersucht. Es wurden Kot-, Mesenteriallymphknoten- und Tonsillenproben von 30 erlegten Rothirschen und Kotproben von 30 lebenden Rehen gewonnen. Für das *stx1*- und *stx2*-Screening mittels multiplex Real-Time PCR wurden die Proben in BPW und auf SMAC-Platten kultiviert. Gewonnene STEC-Isolate wurden auf die *stx1*- und *stx2*-Subtypen sowie auf die Gene *eae*, *hlyA* und *saa* untersucht. Zudem wurden die Isolate phänotypisch identifiziert und charakterisiert. 40 Proben wurden parallel zum Ansatz in BPW in mTSB+N kultiviert. Für *stx2e* und *stx2f* wurde eine duplex Real-Time PCR etabliert.

Mit 83 Prozent wurde eine sehr hohe STEC-Prävalenz in Wildwiederkäuern nachgewiesen. Bei den Rothirschen war der Kot zu 70 Prozent, die Lymphknoten zu 60 Prozent und die Tonsillen zu 30 Prozent *stx*-positiv. Rehkot war zu 73 Prozent positiv. Es wurde kein Zusammenhang zwischen den Tierarten oder deren Geschlecht bzw. deren Alter und der STEC-Prävalenz ermittelt. Von 25 *stx*-positiven Tieren konnten 41 Isolate gewonnen werden. Diese Isolate waren alle *stx2*-positiv, davon wiesen die meisten den Subtyp *stx2d* auf. Nur ein Isolat war *stx2c*-positiv.

Von den drei Isolaten, bei denen neben *stx2* auch das *stx1*-Gen festgestellt werden konnte, wurde ein Isolat als *stx1c* typisiert. *HlyA* wurde zu 44 Prozent und *saa* zu 7 Prozent detektiert. *Stx1d*, *stx2e*, *stx2f* und *eae* wurden nicht gefunden. Die Serotypisierung ergab elf verschiedenen Serovaren mit acht O- und sieben H-Typen. Es wurden einige Serovare ermittelt, die in Deutschland schon zu humanen EHEC-Erkrankungen führten. Alle Isolate waren Sorbit-positiv. Der Isolierungserfolg von STEC lag bei der Kultivierung in BPW mit 38 Prozent etwas höher als bei mTSB+N mit 30 Prozent.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Wildwiederkäuer als bedeutendes Reservoir für STEC fungieren. Bei den gewonnenen STEC-Isolaten waren der Subtyp *stx2d* und das Enterohämolysin *hlyA* am häufigsten vertreten. Bei einem STEC-Isolat eines Rehs konnte O142 und der Subtyp *stx2c* nachgewiesen werden, was mit einer höheren Virulenz assoziiert werden kann.

7 Summary

Detection and characterization of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in cervids

STEC belong to the significant foodborne bacteria with zoonotic potential. Ruminants are regarded as the main reservoir of STEC. Cervids are being discussed another relevant reservoir, however there are only few studies covering this assumption. The objective of this study was to investigate the role of cervids as carrier animals of STEC and to determine the virulence profile of isolated STEC-strains.

In total 120 samples from red and roe deer were taken in the Bavarian Forest. In red deer sampling comprised samples of feces, mesenterial lymphnodes and tonsils from 30 shot animals. In roe deer 30 faecal samples were taken from healthy animals. The samples were studied using real-time PCR and culturing methods. Thus, all samples were enriched in BPW, 40 samples additionally in mTSB+N, and cultivated on SMAC-agar plates. The real-time PCR screening was based on the *stx1* and *stx2* genes. All STEC-isolates were subtyped, analysed on the detection of *eae*, *hlyA* and *saa* and characterized phenotypically. A duplex real-time PCR was established for the detection of *stx2e* and *stx2f*.

The detection rate of STEC in cervids was very high (83 percent). In red deer 70 percent of the faecal samples, 60 percent of lymphnodes and 30 percent of tonsils were *stx*-positive. 73 percent of the faecal samples of healthy roe deer were *stx*-positive. No correlation was detected between the animal species, their sexes or their ages and the detection rate of STEC. 41 isolates were obtained from 25 *stx*-positive animals. All of these isolates exhibited the *stx2*-gene, the majority of them *stx2d* as subtype. Solely one isolate was positive for *stx2c*. Three isolates showed *stx2* and *stx1*, of which one isolate was further subtyped as *stx1c*. *HlyA* and

saa was detected in 44 percent and 7 percent, respectively, of all isolates, whereas *stx1d*, *stx2e*, *stx2f* and *eae* could not be detected. All isolates were sorbit positive. Enrichment in BPW resulted in a higher isolation rate (38 percent) than in mTSB+N (30 percent).

This study shows that cervids might play a relevant role as a reservoir of STEC. The most frequently detected subtype was *stx2d* and in the majority of the isolates the *hlyA*-gene was present. In roe deer one STEC-isolate was *stx2c* positive. This subtype is associated with a higher pathogenicity for humans.

8 Anhang

8.1 Anhang zu Material und Methoden

Tabelle 8.1 Geräte

Bezeichnung	Hersteller/Ort	Artikel
Elektrophoresekammer	Bio-Rad/München	170-4466
Gel-Presser	Bio-Rad/München	170-4412
Gel-Kamm 15 Zinken	Bio-Rad/München	170-4464
Magnetrührer	Heidolph/Schwabach	50301
Mikrowelle	Medion/Mühlheim an der Ruhr	MM6460
Mini Comb Holder	Bio-Rad/München	170-4331
Molecular Imager Gel Doc	Bio-Rad/München	170-8170
Power Supply	Bio-Rad/München	164-5050
Software Quantity One	Bio-Rad/München	170-9600
Stomacher	Seward/Bohemia USA	37179
Thermomixer	Eppendorf/Wesseling-Berzdorf	5355 000.011
Vortexer	VELP Usmate/Mailand Italien	F20220176
Zentrifuge Typ 5415D	Eppendorf/Wesseling-Berzdorf	-

Tabelle 8.2 Verbrauchsmaterialien und Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller/Ort	Artikel
Agarose	Bio-Rad/München	161-3101
Api 20E	Biomerieux/Nürtingen	20160
DNA Loading Buffer	Bioline/Luckenwalde	Bio-37045
Ethidiumbromidlösung 10 mg/ml	Bio-Rad/München	161-0433
0,2 ml PCR Tubes	Kisker/Steinfurt	G002
Hyperladder V TM	Bioline/Luckenwalde	Bio-33031
Kovacs Indolreagenz	Merck/Ismaning	1.09293.0100
Mikrobank-Röhrchen	MW&E/Wiltshire GB	MWVIM
Nitrilhandschuhe	Roth/Karlsruhe	P777.1
Parafilm	Menasha/Wisconsin USA	PM-996
Stomacher-Beutel	Interscience/Paris F	132025
10 x TBE-Puffer	Bio-Rad/München	161-0733
1,5 ml Tube	Kisker/Steinfurt	G052BP

Tabelle 8.3 Daten der untersuchten Rothirsche

Nummer	Bezeichnung	Alter [a]	Geschlecht	Gewicht [kg]
1	Jungtier	1,5	männlich	75
2	Jungtier	1,5	weiblich	65
3	Alttier	18	weiblich	85
4	Alttier	13	weiblich	85
5	Kalb	0,4	männlich	45
6	Kalb	0,4	weiblich	55
7	Kalb	0,4	weiblich	50
8	Kalb	0,5	weiblich	55
9	Kalb	0,5	männlich	60
10	Alttier	20	männlich	80
11	Alttier	8	weiblich	96
12	Alttier	10	weiblich	85
13	Kalb	0,5	weiblich	50
14	Jungtier	1,5	weiblich	65
15	Jungtier	1,5	weiblich	65
16	Alttier	5	weiblich	70
17	Kalb	0,5	männlich	50
18	Kalb	0,5	weiblich	40
19	Jungtier	1,5	weiblich	55
20	Jungtier	1	weiblich	75
21	Kalb	0,6	männlich	60
22	Jungtier	1,5	männlich	75
23	Alttier	8	weiblich	75
24	Kalb	0,6	männlich	50
25	Alttier	12	weiblich	85
26	Jungtier	1,5	weiblich	65
27	Alttier	10	weiblich	85
28	Alttier	12	weiblich	90
29	Alttier	3	männlich	80
30	Alttier	10	männlich	120

Kalb < 1 Jahr Jungtier < 3 Jahre Alttier \geq 3 Jahre

Tabelle 8.4 Daten der untersuchten Rehe

Nummer	Bezeichnung	Alter [a]	Geschlecht	Gewicht [kg]
1	Jungtier	2	männlich	20
2	Alttier	3	weiblich	29
3	-	-	-	-
4	-	-	-	-
5	Alttier	3	männlich	25
6	Kitz	<1	weiblich	16
7	Kitz	<1	weiblich	20
8	Alttier	5	männlich	26
9	Kitz	<1	männlich	13
10	Alttier	5	weiblich	23
11	Alttier	3	weiblich	24
12	Kitz	<1	männlich	19
13	Jungtier	2	männlich	24
14	-	-	-	-
15	Kitz	<1	weiblich	21
16	Kitz	<1	männlich	17
17	Jungtier	2	weiblich	22
18	Kitz	<1	männlich	14
19	-	-	-	-
20	-	-	-	-
21	-	-	-	-
22	-	-	-	-
23	Alttier	3	weiblich	25
24	-	-	-	-
25	Alttier	8	weiblich	25
26	Jungtier	2	männlich	18
27	-	-	-	-
28	Alttier	4	männlich	25
29	-	-	-	-
30	Kitz	<1	weiblich	17

Kitz < 1 Jahr Jungtier < 3 Jahre Alttier \geq 3 Jahre

8.2 Anhang zu Ergebnisse

Tabelle 8.5 Übersicht der positiven Proben bei Reh und Rothirsch

Reh Kot	Nummer	Rothirsch		
		Kot	Lymphknoten	Tonsille
-	1	+	-	-
+	2	+	-	-
+	3	+	-	+
+	4	-	-	-
+	5	-	-	-
+	6	+	-	-
+	7	+	-	-
+	8	+	-	-
+	9	+	+	-
+	10	-	+	-
+	11	+	+	-
+	12	+	+	+
-	13	-	+	+
+	14	-	+	+
+	15	+	-	-
-	16	+	-	+
+	17	+	+	+
+	18	+	+	+
-	19	-	-	+
-	20	+	+	-
-	21	+	+	-
+	22	+	-	-
-	23	-	+	-
+	24	+	+	-
+	25	+	+	-
+	26	-	+	-
-	27	-	+	-
+	28	+	+	+
+	29	+	+	-
+	30	+	+	-

+=*stx*-positiv -=*stx*-negativ

Tabelle 8.6 Probenmatrizes der *stx*-positiven Rothirschproben in Bezug zum Geschlecht

positives Probenmaterial	Gesamt	Männlich	Weiblich	
			gesamt	trächtig
nur Kot	7	2	5	0
nur Lymphknoten	4	1	3	2
nur Tonsille	1	0	1	0
Kot und Lymphknoten	8	5	3	3
Kot und Tonsille	2	0	2	1
Lymphknoten und Tonsille	2	0	2	1
Kot, Lymphknoten und Tonsille	4	1	3	2
<i>stx</i> -positive Tiere	28	9	19	9

Tabelle 8.7 Probenmatrizes der *stx*-positiven Rothirschproben in Bezug zum Alter

positives Probenmaterial	Gesamt	Kalb	Jungtier	Alttier
nur Lymphknoten	4	0	1	3
nur Tonsille	1	0	1	0
Kot und Lymphknoten	8	3	1	4
Kot und Tonsille	2	0	0	2
Lymphknoten und Tonsille	2	1	1	0
Kot, Lymphknoten und Tonsille	4	2	0	2
<i>stx</i> -positive Tiere	28	9	8	11

Kalb < 1 Jahr Jungtier < 3 Jahre Alttier \geq 3 Jahre

Tabelle 8.8 Ergebnisse der Bestätigung mittels Api 20E

Isolat	Zahlencode	<i>E. coli</i> zu [%]
Rothirsch		
T3.1ON	5/1/4/4/7/6/2	99,4
K6.2ON	5/5/4/4/5/7/2	99,2
K8.1D	5/0/4/4/7/7/2	88,7
K8.2ON	5/0/4/4/7/7/2	88,7
K11.2D	5/0/4/4/7/7/2	88,7
K11.1ON	7/0/4/4/5/7/2	99,9
L11D	5/1/4/4/7/6/2	99,4
L11.1ON	5/1/4/4/7/6/2	99,4
K12.1D	5/1/4/4/7/3/2	99,7
K12.1ON	5/1/4/4/7/3/2	99,7
L12.1.1ON	5/1/4/4/7/3/2	99,7
T12.1.2ON	5/1/4/4/7/3/2	99,7
L14.1ON	5/0/4/4/7/7/2	88,7
K17D	5/0/4/4/7/7/2	88,7
K17ON	5/0/4/4/5/5/3	94,7
K18.2D	5/1/4/4/5/7/2	99,5
K18.1ON	5/0/4/4/5/7/2	99,9
T18.3ON	5/0/4/4/5/7/2	99,9
K21.1D	5/0/4/4/7/7/2	88,7
K21.1ON	5/1/4/4/5/6/2	97,4
K22.2ON	5/0/4/4/7/7/2	88,7
K24.2D	5/0/4/4/5/5/3	94,7
K24.2ON	5/0/4/4/5/5/3	94,7
K25.1ON	5/0/4/4/5/7/2	99,9
L27.1ON	5/0/4/4/5/7/2	99,9
K28.1D	5/0/4/4/5/7/2	99,9
K28.1ON	5/0/4/4/5/7/2	99,9
L28.1ON	5/0/4/4/7/7/2	88,7
K29.1ON	5/1/4/4/7/6/2	99,4

Isolat	Zahlencode	<i>E. coli</i> zu [%]
Reh		
K2.1.2ON	5/0/4/4/5/7/2	99,9
K3.2D	5/1/4/4/5/6/2	97,4
K3.1.2ON	5/1/4/4/5/6/2	97,4
K5.1.2ON	5/1/4/4/5/7/2	99,5
K6.2.2ON	1/1/4/4/7/5/2	99,0
K8.2ON	1/0/4/4/5/3/2	89,7
K9.1ON	1/1/4/4/7/5/2	99,0
K11.1D	5/1/4/4/5/5/2	99,9
K11.2ON	5/1/4/4/5/7/2	99,5
K12.2ON	5/1/4/4/5/6/2	99,8
K18.3ON	7/0/4/4/7/7/2	97,4
K22.2ON	7/0/4/4/5/7/2	99,9

K=Kot L=Lymphknoten T=Tonsille

D=Direkt-Platte ON=Overnight-Platte

Tabelle 8.9 Virulenzgene und *stx*-Subtypen der 29 Isolate von Rothirschen und der 12 Isolate von Rehen

Isolat	<i>stx1</i>	<i>stx1c</i>	<i>stx1d</i>	<i>stx2</i>	<i>stx2c</i>	<i>stx2d</i>	<i>stx2e</i>	<i>stx2f</i>	<i>eae</i>	<i>hlyA</i>	<i>saa</i>
Rothirsch											
T3.1ON						+					
K6.2ON						+				+	
K8.1D						+					
K8.2ON						+					
K11.2D						+					
K11.1ON						+					
L11D						+					
L11.1ON						+					
K12.1D	+					+				+	
K12.1ON		+				+				+	
L12.1.1ON	+					+				+	
T12.1.2ON						+					
L14.1ON						+					
K17D						+					
K17ON						+				+	
K18.2D						+				+	
K18.1ON						+					
T18.3ON						+					
K21.1D						+					
K21.1ON						+					
K22.2ON						+					
K24.2D						+				+	
K24.2ON						+				+	
K25.1ON						+					
L27.1ON						+				+	
K28.1D						+					
K28.1ON						+					
L28.1ON						+				+	
K29.1ON						+					

Isolat	<i>stx1</i>	<i>stx1c</i>	<i>stx1d</i>	<i>stx2</i>	<i>stx2c</i>	<i>stx2d</i>	<i>stx2e</i>	<i>stx2f</i>	<i>eae</i>	<i>hlyA</i>	<i>saa</i>
Reh											
K2.1.2ON						+				+	
K3.2D						+				+	
K3.1.2ON						+				+	
K5.1.2ON						+					
K6.2.2ON						+				+	
K8.2ON						+					
K9.1ON						+				+	
K11.1D					+					+	+
K11.2ON						+				+	+
K12.2ON						+				+	
K18.3ON						+					
K22.2ON						+					+

K=Kot L=Lymphknoten T= Tonsille D=Direkt-Platte ON=Overnight-Platte

Tabelle 8.10 Serovare der 29 Isolate von Rothirschen
und der 12 Isolate von Rehen

Isolat	Serovar	
Rothirsch		
T3.1ON	O21	H21
K6.2ON	O88	[H8]
K8.1D	O146	H28
K8.2ON	O146	H28
K11.2D	O130	[H30]
K11.1ON	O130	[H30]
L11D	O21	H21
L11.1ON	O21	H21
K12.1D	O174	H8
K12.1ON	O174	[H8]
L12.1.1ON	O174	H8
T12.1.2ON	O130	[H30]
L14.1ON	O146	H28
K17D	O146	H28
K17ON	O18	H49
K18.2D	O130	[H30]
K18.1ON	O130	[H30]
T18.3ON	O130	[H30]
K21.1D	Orau	H28
K21.1ON	Orau	H28
K22.2ON	O130	H30
K24.2D	O18	[H49]
K24.2ON	ONT	H49
K25.1ON	O130	[H30]
L27.1ON	O146	H28
K28.1D	Orau	H28
K28.1ON	Orau	H28
L28.1ON	Orau	H28
K29.1ON	O21	H21

Isolat	Serovar	
Reh		
K2.1.2ON	O146	H28
K3.2D	O21	H21
K3.1.2ON	Orau	[H21]
K5.1.2ON	Orau	H28
K6.2.2ON	O110	[H31]
K8.2ON	Orau	H28
K9.1ON	O110	[H31]
K11.1D	O142	H16
K11.2ON	O21	H21
K12.2ON	Orau	H21
K18.3ON	Orau	H28
K22.2ON	Orau	H28

K=Kot L=Lymphknoten
 T= Tonsille D=Direkt-Platte
 ON=Overnight-Platte
 []=unbeweglich NT=not typable



Abbildung 8.1 Api 20E einiger STEC

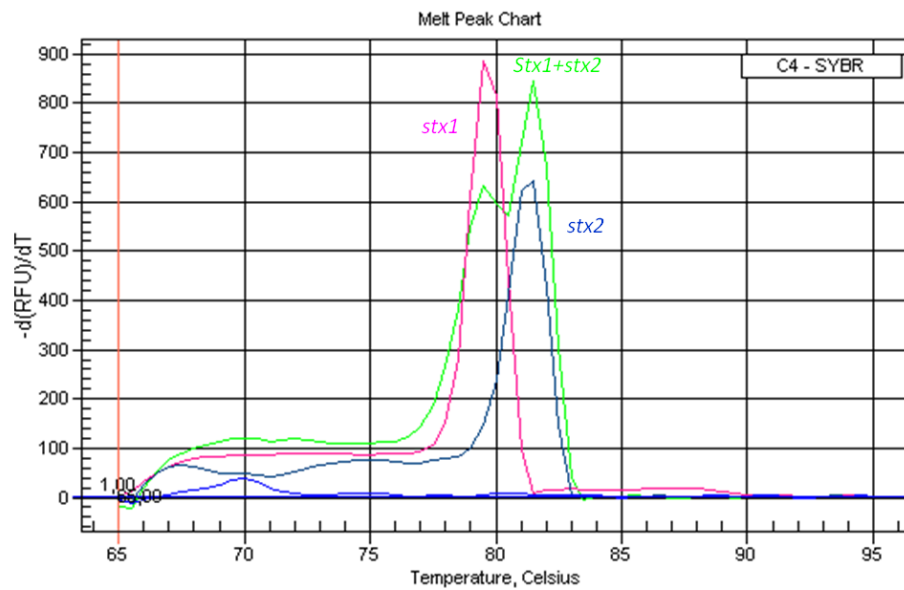


Abbildung 8.2 Schmelzkurven der *stx1*- und *stx2*-positiven Probe von Rothirsch Nr. 12

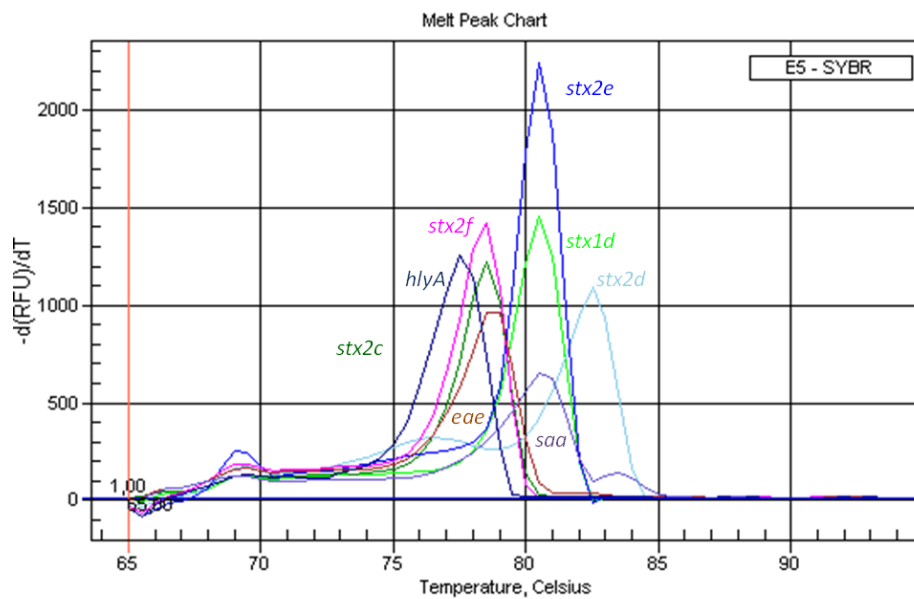


Abbildung 8.3 Schmelzkurven der Virulenzgene und *stx*-Subtypen bei 56 °C

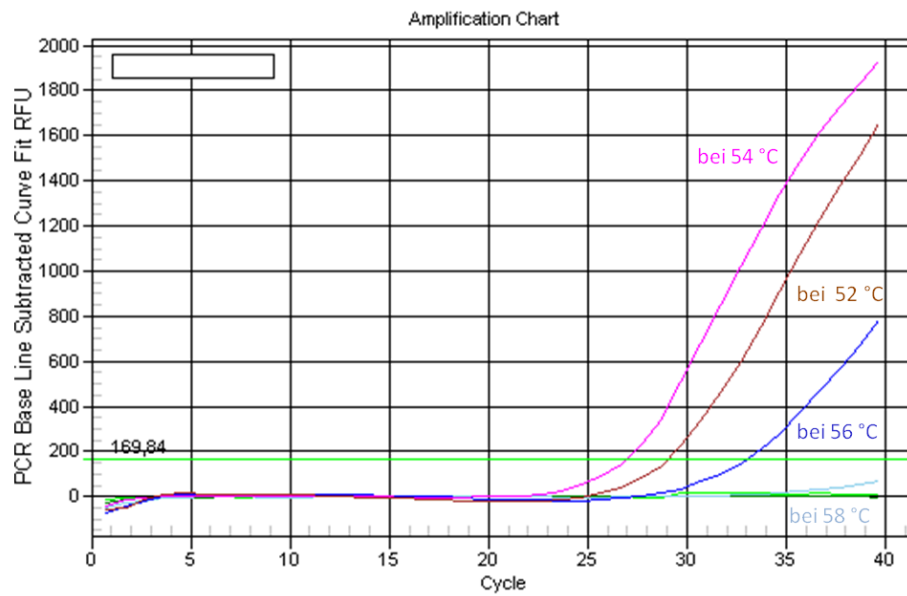


Abbildung 8.4 Amplifikationskurven des Subtypen *stx1c*

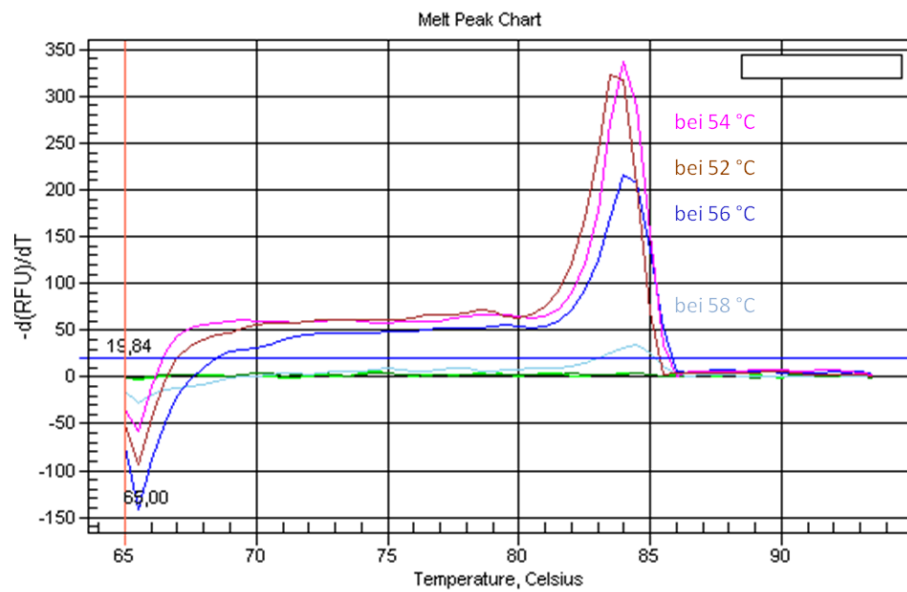


Abbildung 8.5 Schmelzkurven des Subtypen *stx1c*

Tabelle 8.11 Ergebnisse des Fisher-Tests

Variablen		<i>stx</i> -positiv	<i>stx</i> -negativ	n	p-Wert
Kot	Hirsch	21	9	30	1,00
	Reh	22	8		
Geschlecht	männlicher Hirsch	9	1	30	1,00
	weiblicher Hirsch	19	1		
	weiblich trächtig	9	1	20	1,00
	weiblich nicht trächtig	10	0		
	männliches Reh	7	3	20	0,58
	weibliches Reh	9	1		
Alter	Hirschkalb	9	1	30	1,00
	Hirschjungtier	8	0		
	Hirschalttier	11	1	20	0,28
	Rehkitz	7	1		
	Rehjungtier	2	2	1	
	Rehalttier	7	1		
Matrix	Kot	21	9	30	0,59
	Lymphknoten	18	12		
	Kot	21	9	60	$4 \times 10^{-3*}$
	Tonsille	9	21		
	Lymphknoten	18	12	30	0,04*
	Tonsille	9	21		
Direkt-Platte	Hirschkot	12	9	21	0,03*
	Rehkot	5	17		
<i>stx</i> -Gen	<i>stx1</i>	3	67	70	$< 2 \times 10^{-16*}$
	<i>stx2</i>	70	0		
Medium	BPW	29	11	40	0,81
	mTSB+N	27	13		

n=Stichprobenumfang BPW=gepuffertes Peptonwasser

mTSB+N=modified Tryptic Soy Broth + Novobiocin

*signifikanter Unterschied (Signifikanzniveau $\alpha=0,05$)

Literaturverzeichnis

- ADU-BOBIE J., FRANKEL G., BAIN C., GONCALVES A., TRABULSI L., DOUCE G., KNOTTON S. und DOUGAN G. (1998) *Detection of Intimins alpha, beta, gamma, and delta, Four Intimin Derivatives Expressed by Attaching and Effacing Microbial Pathogens.*
J Clin Microbiol **36**: 662–668.
- AHMAD A., NAGARAJA T. und ZUREK L. (2007) *Transmission of Escherichia coli O157:H7 to cattle by house flies.*
Prev Vet Med **80**: 74–81.
- AHN C., RUSSO A., HOWELL K., HOLT N., SELLENRIEK P., ROTHBAUM R., BECK A., LUEBBERING L. und TARR P. (2009) *Deer Sausage: A Newly Identified Vehicle of Transmission of Escherichia coli O157:H7.*
J Pediatr **155**: 587–589.
- ALEKSIC S., KARCH H. und 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.
- ARAB S. und LINGWOOD C. (1998) *Intracellular Targeting of the Endoplasmic Reticulum/Nuclear Envelope by Retrograde Transport May Determine Cell Hypersensitivity to Verotoxin Via Globotriaosyl Ceramide Fatty Acid Isoform Traffic.*
J Cell Physiol **177**: 646–660.
- ARTHUR T., BARKOCY-GALLAGHER G., RIVERA-BETANCOURT M. und KOOHMA-RAIE M. (2002) *Prevalence and characterization of non-O157 Shiga toxin-producing*

- Escherichia coli* on carcasses in commercial beef cattle processing plants.
Appl Environ Microbiol **68**: 4847–4852.
- ASAKURA H., MAKINO S., SHIRAHATA T., TSUKAMOTO T., KURAZONO H., IKEDA T. und TAKESHI K. (1998) *Detection and Genetical Characterization of Shiga Toxin-Producing Escherichia coli from Wild Deer*.
Microbiol Immunol **42**: 815–822.
- ASCHFALK A., KEMPER N. und HÖLLER C. (2003) *Bacteria of Pathogenic Importance in Faeces from Cadavers of Free-ranging or Corralled Semi-domesticated Reindeer in Northern Norway*.
Vet Res Commun **27**: 93–100.
- BARTELS A. und BÜLTE M. (2010) *Verotoxin-bildende Escherichia coli (VTEC) bei Wildwiederkäuern*.
RFL **62**: 79–81.
- BELLIN T., PULZ M., MATUSSEK A., HEMPEN H. und GUNZER F. (2001) *Rapid detection of enterohemorrhagic Escherichia coli by real-time PCR with fluorescent hybridization probes..*
J Clin Microbiol **39**: 370–374.
- BENTANCOR L., BILEN M., BRANDO R., RAMOS M., FERREIRA L., GHIRINGHELLI P. und PALERMO M. (2009) *A DNA Vaccine Encoding the Enterohemorrhagic Escherichia coli Shiga-Like Toxin 2 A2 and B Subunits Confers Protective Immunity to Shiga Toxin Challenge in the Murine Model*.
Clin Vaccine Immunol **16**: 712–718.
- BERTIN Y., BOURKHORS K., PRADEL N., LIVRELLI V. und MARTIN C. (2001) *Stx2 Subtyping of Shiga Toxin-Producing Escherichia coli Isolated from Cattle in France: Detection of a New Stx2 Subtype and Correlation with Additional Virulence Factors*.
J Clin Microbiol **39**: 3060–3065.
- BETTELHEIM K. (2003) *Non-O157 Verotoxin-Producing Escherichia coli: A Problem, Paradox, and Paradigm*.
Exp Biol Med **228**: 333–344.

- BEUTIN L., BÜLTE M., WEBER A., ZIMMERMANN S. und GLEIER K. (2000) *Investigation of Human Infections with Verocytotoxin-Producing Strains of Escherichia coli (VTEC) Belonging to Serogroup O118 with Evidence for Zoonotic Transmission.* Epidemiol Infect **125**: 47–74.
- BEUTIN L., KRAUSE G., ZIMMERMANN S., KAULFUSS S. und GLEIER K. (2004) *Characterization of Shiga Toxin-Producing Escherichia coli Strains Isolated from Human Patients in Germany over a 3-Year Period.* J Clin Microbiol **42**: 1099–1108.
- BEUTIN L., MARTIN A., KRAUSE G., STEEGE K., HABY S., PRIES K., ALBRECHT N., MIKO A. und JAHN S. (2010) *Ergebnisse, Schlussfolgerungen und Empfehlungen aus zwei Ringversuchen zum Nachweis und zur Isolierung von Shiga (Vero) Toxin bildenden Escherichia coli (STEC) aus Hackfleischproben.* J Verbr Lebensm **5**: 21–34.
- BEUTIN L. und MIKO A. (2009) *Bewertung von Shiga (Vero) Toxin-produzierenden Escherichia coli aus Wildfleischproben als potenzielle Krankheitserreger für den Menschen.* BfR-Symposium 51–55.
- BEUTIN L., MIKO A., KRAUSE G., PRIES K., HABY S., STEEGE K. und ALBRECHT N. (2007) *Identification of Human-Pathogenic Strains of Shiga Toxin-Producing Escherichia coli from Food by a Combination of Serotyping and Molecular Typing of Shiga Toxin Genes.* Appl Environ Microbiol **73**: 4769–4775.
- BEUTIN L., PRADA J., ZIMMERMANN S., STEPHAN R., ORSKOV I. und ORSKOV F. (1988) *Enterohemolysin, a new type of hemolysin produced by some strains of enteropathogenic E.coli (EPEC).* Zbl Bakt Hyg **267**: 576–588.
- BFR (2006) *Pleasure without regret: Tips for handling wild game meat.* <http://www.bfr.bund.de/cd/7134>. Zugriff am: 21.07.10.
- BFR (2007) *Frequently Asked Questions about EHEC.* FAQ Sheets 1–3.

- BIELASZEWSKA M., MIDDENDORF B., KÖCK R., FRIEDRICH A., FRUTH A., KARCH H., SCHMIDT M. und MELLMANN A. (2008) *Shiga Toxin-Negative Attaching and Effacing Escherichia coli: Distinct Clinical Associations with Bacteria Phylogeny and Virulence Traits and Inferred In-Host Pathogen Evolution.*
Clin Infect Dis **47**: 208–217.
- BIELASZEWSKA M., PRAGER R., KÖCK R., MELLMANN A., ZHANG W., TSCHÄPE H., TARR P. und KARCH H. (2007) *Shiga Toxin Gene Loss and Transfer In Vitro and In Vivo during Enterohemorrhagic Escherichia coli O26 Infections in Humans.*
Appl Environ Microbiol **73**: 3144–3150.
- BISCHOFF C., LQTHY J., ALTWEGG M. und BAGGI F. (2005) *Rapid detection of diarrheagenic E. coli by real-time PCR.*
J Microbiol Methods **61**: 335–341.
- BLANCO J., BLANCO M., BLANCO J., MORA A., GONZALEZ E., BERNARDEZ M., ALONSO M., COIRA A., RODRIGUEZ A., REY J., ALONSO J. und USERA M. (2003) *Verotoxin-Producing Escherichia coli in Spain: Prevalence, Serotypes, and Virulence Genes of O157:H7 and Non-O157 VTEC in Ruminants, Raw Beef Products, and Humans.*
Exp Biol Med **345**: 345–351.
- BLANCO M., BLANCO J., DAHBI G., MORA A., ALONSO M., VARELA G., GADEA M., SCHELOTTO F., GONZALES E. und BLANCO J. (2006) *Typing of intimin (eae) genes from enteropathogenic Escherichia coli (EPEC) isolated from children with diarrhoea in Montevideo, Uruguay: identification of two novel variants (iB and iR/â2B)..*
J Med Microbiol **55**: 1165–1174.
- BLANCO M., BLANCO J., MORA A., DAHBI G., ALONSO M., GONZALEZ E., BERNANDEZ M. und BLANCO J. (2004) *Serotypes, Virulence Genes, and Intimin Types of Shiga Toxin (Verotoxin)-Producing Escherichia coli Isolates from Cattle in Spain and Identification of a New Intimin Variant Gene (eae ξ).*
J Clin Microbiol **42**: 645–651.
- BOCKEMÜHL J., KARCH H. und TSCHÄPE H. (1997) *Infektionen des Menschen durch enterohämorrhagische Escherichia coli (EHEC) in Deutschland.*

- Bundesgesundhbl **40**: 194–197.
- BOERLIN P., MCEWEN S., BOERLIN-PETZOLD F., WILSON J., JOHNSON R. und GYLES C. (1999) *Association between Virulence factors of shiga toxin-producing Escherichia coli and disease in Humans.*
J Clin Microbiol **37**: 497–503.
- BONARDI S., FONI E., CHIAPPONI C., SALSÌ A. und BRINDANI F. (2007) *Detection of verocytotoxin-producing Escherichia coli serogroups O157 and O26 in the cecal content and lymphatic tissue of cattle at slaughter in Italy.*
J Food Prot **70**: 1493–97.
- BONNET R., SOUWEINE B., GAUTHIER G., RICH C., LIVRELLI V., SIROT J., JOLY B. und FORESTIER C. (1998) *Non-O157:H7 Stx2-Producing Escherichia coli Strains Associated with Sporadic Cases of Hemolytic-Uremic Syndrome in Adults.*
J Clin Microbiol **36**: 1777–1780.
- BORELL J. (2005) *Molekulare Feintypisierung von Shiga Toxin-produzierenden Escherichia coli als Grundlage einer Risikobewertung.* Ph.D. thesis, Universitätsklinikum Münster- Institut für Hygiene.
- BRETT K., RAMACHANDRAN V., HORNITZKY M., BETTELHEIM K., WALKER M. und DJORDJEVIC S. (2003) *Stx1c is the most common Shiga toxin 1 subtype among Shiga toxin-producing Escherichia coli isolates from sheep but not among isolates from cattle.*
J Clin Microbiol **41**: 926–936.
- BROOKS J., SOWERS E., WELLS J., GREENE K., GRIFFIN P., HOEKSTRA R. und STROCKBINE N. (2005) *Non-O157 Shiga Toxin-Producing Escherichia coli Infections in the United States, 1983-2002.*
J Infect Dis **192**: 1422–1429.
- BRUNDER W., SCHMIDT H. und 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. und KARCH H. (1997) *EspP, a novel extracellular serine*

- protease of enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 cleaves human coagulation factor V.*
Mol Microbiol **24**: 767–778.
- BÜLTE M. (2001) *Nachweis und Charakterisierung von Verotoxin-bildenden Escherichia coli- Stämmen (VTEC) aus unterschiedlichen Habitaten.*
Berl Münch Tierärztl Wochenschr **114**: 473–477.
- BÜLTE M. (2002) *Veterinärmedizinische Aspekte der Infektionen durch enterohämorrhagische E.coli-Stämme (EHEC) Bundesgesundheitsblatt.*
Bundesgesundhbl **45**: 484–490.
- BÜLTE M. und GOLL M. (2006) *Escherichia coli und Shigellen*, 15–61.
BEHR'S Verlag, Hamburg.
- BUMANN C. (2010) *Nachweis lebensmittelhygienisch relevanter bakterieller Zoonoserreger bei kleinen Wiederkäuern aus der Schweiz. Ph.D. thesis, Tierärztlichen Fakultät der Universität München.*
- BÜRK C., DIETRICH R., ACAR G., MORAVEK M., BÜLTE M. und MÄRTLBAUER E. (2003) *Identification and Characterization of a New Variant of Shiga Toxin 1 in Escherichia coli ONT:H19 of Bovine Origin.*
J Clin Microbiol **41**: 2106–2112.
- BUSCH U. (2007c) *Real-Time PCR.*
J Verbr Lebensm **2**: 111–112.
- BUSCH U., HÖRMANSDORFER S., SCHRANNER S., HUBER I., BOGNER K. und SING A. (2007b) *Enterohemorrhagic Escherichia coli Excretion by Child and Her Cat.*
Emerg Infect Dis **13**: 348–351.
- BUSCH U., HUBER I., MESSELHÄUSSER U., HÖRMANSDORFER S. und SING A. (2007a) *Nachweis Shigatoxin-bildender / Enterohämorrhagischer Escherichia coli (STEC/EHEC) mittels Real-Time PCR.*
J Verbr Lebensm **2**: 144–148.

- CALDERWOOD S., ACHESON D., KEUSCH G., BARRETT T., GRIFFIN P., STROCKBINE N., SWAMINATHAN B., KAPER J., LEVINE M., KAPLAN B., KARCH H., O'BRIEN A., OBRIG T., TAKEDA Y., TARR P. und WACHSMUTH I. (1996) *Proposed new nomenclature for SLT(VT) family.*
ASM News **62**: 118–119.
- CAPRIOLI A., MORABITO S., BRUGERE H. und OSWALD E. (2005) *Enterohaemorrhagic Escherichia coli: emerging issues on virulence and modes of transmission.*
Vet Res **36**: 289–311.
- CARO I. und GARCIA-ARMESTO M. (2007) *Occurrence of Shiga toxin-producing Escherichia coli in a Spanish raw ewe's milk cheese.*
Int J Food Microbiol **116**: 410–413.
- CHART H., VAN DER KAR N., TOLBOOM J., MONNENS L. und ROWE B. (1993) *Serological detection of verocytotoxin-producing Escherichia coli in patients with haemolytic uraemic syndrome in western Europe.*
Eur J Clin Microbiol Infect Dis **12**: 707–709.
- CHASSAGNE L., PRADEL N., ROBIN F., LIVRELLI V., BONNET R. und DELMAS J. (2009) *Detection of stx1, stx2, and eae genes of enterohemorrhagic Escherichia coli using SYBR Green in a real-time polymerase chain reaction.*
Diagn Microbiol Infect Dis **64**: 98–101.
- CHEEPHTAM N. und LAL A. (2009) *Use of EC-MUG media to confirm Escherichia coli contamination in water samples protocol.*
[www.microbelibrary.org/asmonly/details_print.asp?id=3000&lang=.](http://www.microbelibrary.org/asmonly/details_print.asp?id=3000&lang=)
- CHO S., FOSSLER C., DIEZ-GONZALEZ F., WELLS S., HEDBERG C., KANEENE J., RUEGG P., WARNICK L. und BENDER J. (2009) *Cattle-level risk factors associated with fecal shedding of Shiga toxin-encoding bacteria on dairy farms, Minnesota, USA.*
Can J Vet Res **73**: 151–156.
- CHRISTANCHO L., JOHNSON R., MCEWEN S. und GYLES C. (2008) *Escherichia coli O157:H7 and other Shiga toxin-producing E.coli in white veal calves.*
Vet Microbiol **126**: 200–209.

- CIZEK A., ALEXA P., LITERAK I., HAMRIK J., NOVAK P. und SMOLA J. (1999) *Shiga toxin-producing Escherichia coli O157 in feedlot cattle and Norwegian rats from a large-scale farm.*
Appl Microbiol Lett **28**: 435–439.
- CLAUSSEN G. und DAVID A. (2000) *Der Jäger und sein Wild*, 11–56.
Parey Verlag, Hamburg. ISBN 3-89715-502-8.
- CODY S., GLYNN M., FARRAR J., CAIRNS K., GRIFFIN P., KOBAYASHI J., FYFE M., HOFFMAN R., KING A., LEWIS J., SWAMINATHAN B., BRYANT R. und VUGIA D. (1999) *An Outbreak of Escherichia coli O157:H7 Infection from Unpasteurized Commercial Apple Juice.*
Ann Intern Med **130**: 202–209.
- CONEDERA G., MATTIAZZI E., RUSSO F., CHIESA E., SCORZATO I., GRANDESSO S., BESSEGATO A., FIORAVANTI A. und CAPRIOLI A. (2007) *A family outbreak of Escherichia coli O157 haemorrhagic colitis caused by pork meat salami.*
Epidemiol Infect **135**: 311–314.
- CONRATHS F., GEUE L., GROSCHUP M., HÄNEL I., HENNING K., KÖHLER H., MELZER F., METHNER U., MOSER I., MÜLLER T., RASSBACH A., SACHSE K., SCHARS G., SCHULZ F., TACKMANN K., WERNER O. und METTENLEITER T. (2004) *Zoonosen der Nutz- und Wildtiere und ihre Bedeutung in Deutschland.*
Bundesgesundhbl **47**: 633–646.
- COOKSON A., TAYLOR S., BENNETT J., THOMSON-CARTER F. und ATTWOOD G. (2006) *Serotypes and analysis of distribution of Shiga toxin producing Escherichia coli from cattle and sheep in the lower North Island, New Zealand.*
N Z Vet J **54**: 78–84.
- CORNICK N. (2006) *Prevention of edema disease using a probiotic expressing Shiga toxin 2e receptor mimic.*
Research report swine health 1–3.
- CRUMP J., SULKA A., LANGER A., SCHABEN C., CRIELLY A., GAGE R., BAYSINGER M., MOLL M., WITHERS G., TONEY D., HUNTER S., HOEKSTRA M., WONG S., GRIFFIN P. und VAN GILDER T. (2002) *An outbreak of Escherichia coli O157:H7*

- infections among visitors to a dairy farm.*
N Engl J Med **347**: 555–560.
- DE BOER E. und HEUVELINK A. (2000) *Methods for the detection and isolation of Shiga toxin-producing Escherichia coli.*
Symp Ser Soc Appl Microbiol **29**: 133–143.
- DE GRANDIS S., LAW H., BRUNTON J., GYLES C. und LINGWOOD C. (1989) *Globotetraosyl ceramide is recognized by the pig edema disease toxin.*
J Biol Chem **264**: 12520–12525.
- DIEPOLDER H. (2008) *Nachweis pathogener Mikroorganismen in Wildfleisch.*
<http://www.lgl.bayern.de/lebensmittel/wildfleisch.htm>. Zugriff am: 21.07.10.
- DOORDUYN Y., DE JAGER C., VAN DER ZWALUW W., FRIESEMA I., HEUVELINK A., DE BOER E., WANNET W. und VAN DUYNHOVEN Y. (2006) *Shiga toxin-producing Escherichia coli (STEC) O157 outbreak, The Netherlands, September–October 2005.*
Euro Surveill **11**: 182–5.
- DÖPFER D., GEUE L., DE BREE J. und DE JONG M. (2006) *Dynamics of verotoxin-producing Escherichia coli isolated from German beef cattle between birth and slaughter.*
Prev Vet Med **73**: 229–240.
- DREESMAN J., RÖTTGERS J., MELLMANN A. und PULZ M. (2007) *Untersuchung eines EHEC-Ausbruchs mit 59 Fällen nach einem Ferienlager mit Rohmilchverzehr durch eine retrospektive Kohortenstudie.*
II EHEC-Workshop07 in Wildbad Kreuth 19.
- DUFFY G., KILBRIDE B., FITZMAURICE J. und SHERIDAN J. (2001) *Routine diagnostic tests for food-borne pathogens.*
<http://www.teagasc.ie/research/reports/foodprocessing/4681/eopr-4681.pdf>. Zugriff am: 21.07.10.
- DUNN J., KEEN J., MORELAND D. und THOMPSON R. (2004) *Prevalence of Escherichia coli O157:H7 in White-tailed Deer from Louisiana.*
J Wildl Dis **40**: 361–365.

- ECDC (2008) *Quarterly STEC/VTEC Report Q1 2008*.
ECDC Surveillance Report **Q1**: 1–3.
- EFSA (2009) *Technical specifications for the monitoring and reporting of verotoxigenic Escherichia coli (VTEC) on animals and food*.
EFSA Journal **7**: 1–43.
- EKLUND M., LEINO K. und SIITONEN A. (2002) *Clinical Escherichia coli Strains Carrying stx Genes: stx Variants and stx-Positive Virulence Profiles*.
J Clin Microbiol **40**: 4585–4593.
- ELLERBROEK L., ALTER T., JOHNE R., NÖCKLER K., BEUTIN L. und HELMUTH R. (2009) *Aufgaben der veterinärmedizinischen Referenzlaboratorien im Bereich der lebensmittelbedingten Zoonosen*.
Bundesgesundhbl **52**: 208–213.
- ESCHERICH T. (1885) *Die Darmbakterien des Neugeborenen und Säuglings*.
Fortschr Med **3**: 515–522.
- ESPIE E., GRIMONT F., VAILLANT V., MONTET M., CARLE I., BAVAI C., DE VALK H. und VERNOZY-ROZAND C. (2006) *O148 Shiga toxin-producing Escherichia coli outbreak: microbiological investigation as a useful complement to epidemiological investigation*.
Clin Microbiol Infect **12**: 992–998.
- ETHELBERG S., SMITH B., TORPDAHL M., LISBY M., BOEL J., JENSEN T., MÖLLER-NIELSEN E. und MÖLBAK K. (2009) *Outbreak of Non-O157 Shiga Toxin-Producing Escherichia coli Infection from Consumption of Beef Sausage*.
Clin Infect Dis **48**: 78–81.
- FELDMAN K., MOHLE-BOETANI J., WARD J., FURST K., ABBOTT S., FERRERO D., OLSEN A. und WERNER S. (2002) *A Cluster of Escherichia coli O157: Nonmotile Infections Associated with Recreational Exposure to Lake Water*.
PHR **117**: 380–385.
- FERNANDO DOS SANTOS L., IRINO K.K., VAZ T., ERNESTINA B. und GUTH C. (2010) *Set of virulence genes and genetic relatedness of O113:H21 Escherichia coli strains*

- isolated from the animal reservoir and human infections in Brazil.*
J Med Microbiol 1–27.
- FISCHER J., ZHAO T., DOYLE M., GOLDBERG M., BROWN C., SEWELL C., KAVAN-
AUGH D. und BAUMAN C. (2001) *Experimental and Field Studies of Escherichia coli*
O157:H7 in White-Tailed Deer.
Appl Environ Microbiol **67**: 1218–1224.
- FITZHENRY R., PICKARD D., HARTLAND E., REECE S., DOUGAN G., PHILLIPS A.
und FRANKEL G. (2002) *Intimin type influences the site of human intestinal mucosal*
colonisation by enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7.
Gut **50**: 180–185.
- FRASER M., FUJINAGA M., CHERNEY M., MELTON-CELSA A., TWIDDY E.,
O'BRIEN A. und JAMES M. (2004) *Structure of Shiga toxin type 2 (Stx2) from*
Escherichia coli O157:H7.
J Biol Chem **279**: 27511–27517.
- FRATAMICO P., BAGI L., BUSH E. und SOLOW B. (2004) *Prevalence and Characteriza-*
tion of Shiga Toxin-Producing Escherichia coli in Swine Feces Recovered in the National
Animal Health Monitoring System's Swine 2000 Study.
Appl Environ Microbiol **70**: 7173–7178.
- FREUDENREICH P. (2000) *Chemische Zusammensetzung des Wildbrets.*
Bundesanstalt für Fleischforschung Kulmbach .
- FRIEDRICH A., BIELASZEWSKA M., ZHANG W., PULZ M., KUCZIUS T., AMMON
A. und KARCH H. (2002) *Escherichia coli Harboring Shiga Toxin 2 Gene Variants:*
Frequency and Association with Clinical Symptoms.
J Infect Dis **185**: 74–84.
- FRIEDRICH A., BORELL J., BIELASZEWSKA M., FRUTH A., TSCHÄPE H. und KARCH
H. (2003) *Shiga toxin 1c-producing Escherichia coli strains: Phenotypic and genetic*
characterization and association with human disease.
J Clin Microbiol **41**: 2448–2453.
- FUKUYAMA M., YOKOYAMA R., SAKATA S., FURUHATA K., OONAKA K., HARA

- M., SATOH Y., TABUCHI K., ITOH T., KAI A. und MATSUDA M. (1999) *Study on the verotoxin-producing Escherichia coli—isolation of the bacteria from deer dung.* Kansenshogaku Zasshi **73**: 1140–1144.
- GALLIEN P., KARCH H., MUCH C., STEINRÜCK H., LEHMANN S., TIMM M., RICHTER H., PERLBERG K. und PROTZ D. (2000) *Subtypisierung von eae-Genen in Shigatoxin-produzierenden Escherichia coli (STEC).* Fleischwirtschaft **2**: 84–89.
- GALLIEN P., MUCH C., PERLBERG K. und PROTZ D. (1999) *Subtypisierung von stx-Genen in Shigatoxin-produzierenden Escherichia coli (STEC).* Fleischwirtschaft **6**: 99–103.
- GARCIA A. und FOX J. (2003) *The rabbit as a new reservoir host of enterohemorrhagic Escherichia coli.* Emerg Infect Dis **9**: 1592–1597.
- GARCIA-SANCHEZ A., SANCHEZ S., RUBIO R., PEREIRA G., ALONSO J., HERMOSO DE MENDOZA J. und REY J. (2007) *Presence of Shiga toxin-producing E.coli O157:H7 in a survey of wild artiodactyls.* Vet Microbiol **121**: 373–377.
- GARRED O., DUBININA E., POLESSKAYA A., OLSNES S., KOZLOV J. und SANDVIG K. (1997) *Role of Disulfide Bond in Shiga Toxin A-chain for Toxin Entry into Cells.* J Biol Chem **272**: 11414–11419.
- GERBER A., KARCH H., ALLERBERGER F., VERWEYEN H. und ZIMMERHACKL L. (2002) *Clinical Course and the Role of Shiga Toxin-Producing Escheria coli Infections in the Hemolytic-Uremic Syndrome in Pediatric Patients, 1997-2000, in Germany and Austria: A Prospective Study.* J Infect Dis **186**: 493–500.
- GERING C. (2004) *Wildbretvermarktung in Nordhessen- neue Dienstleistungen rund um den Forst.* wald-Arbeitspapier **9**: 20.
- GEUE L., SEGURA-ALVAREZ M., CONRATHS F., KUCZIUS T., BOCKEMÜHL J.,

- KARCH H. und GALLIEN P. (2002) *A Long-Term Study on the Prevalence of Shiga Toxin-Producing Escherichia coli (STEC) on Four German Cattle Farms.*
Epidemiol Infect **129**: 173–185.
- GILBREATH J., SHIELDS M., SMITH R., FARRELL L., SHERIDAN P. und SPIEGEL K. (2009) *Shiga Toxins, and the Genes Encoding Them in Fecal Samples from Native Idaho Ungulates.*
Appl Environ Microbiol **75**: 862–865.
- GILLESPIE R. und WONG C. (2009) *Hemolytic-Uremic Syndrome.*
<http://emedicine.medscape.com>. Zugriff am: 21.07.10.
- GOBIUS K., HIGGS G. und DESMARCHELIER P. (2003) *Presence of activatable Shiga toxin genotype stx2d in Shiga toxigenic Escherichia coli from livestock sources.*
J Clin Microbiol **41**: 3777–3783.
- GOLZE M. (2005) *Entwicklung der landwirtschaftlichen Wildhaltung in Sachsen.*
Landwirtschaftliche Wildhaltung **5**: 14.
- GOURMELON M., MONTET M., LOZACH S., LE MENNEC C., POMMEPUY M., BEUTIN L. und VERNOZY-ROZAND C. (2006) *First isolation of Shiga toxin 1d producing Escherichia coli variant strains in shellfish from coastal areas in France.*
J Appl Microbiol **100**: 85–97.
- GRANT M. (2004) *Improved Laboratory Enrichment for Enterohemorrhagic Escherichia coli by Exposure to Extremely Acid Conditions.*
Appl Environ Microbiol **70**: 1226–1230.
- GROSSMANN K. (2000) *Nachweis und Charakterisierung von Shigatoxin-bildenden Escherichia coli bei Tauben.* Ph.D. thesis, Tierärztliche Fakultät, Freie Universität Berlin.
- GROSSMANN K., WENIGER B., BALJER G., BRENIG B. und WIELER L. (2005) *Racing, ornamental and city pigeons carry Shiga toxin producing Escherichia coli (STEC) with different Shiga toxin subtypes, urging further analysis of their epidemiological role in the spread of STEC.*
Berl Münch Tierärztl Wochenschr **118**: 456463.

- GUION C., OCHOA T., WALKER C., BARLETTA F. und CLEARY T. (2008) *Detection of Diarrheagenic Escherichia coli by Use of Melting-Curve Analysis and Real-Time Multiplex PCR*.
J Clin Microbiol **46**: 1752–1757.
- GYLES C. (1994) *Escherichia coli* in Domestic Animals and Humans, 3–593.
Cab International, Wallingford. ISBN 0-85198-921-7.
- GYLES C. (2007) *Shiga toxin-producing Escherichia coli: An overview*.
J Anim Sci **85**: 45–62.
- GYLES C., PRESCOTT J., SONGER J. und THOEN C. (2004) Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals, 193–206.
Blackwell Verlag, Iowa. ISBN 0-8138-2939-9.
- HAMADEH H. und AFSHARI C. (2004) Toxicogenomics Principles and Applications, 151.
J. Wiley and Sons, Inc., New Jersey USA. ISBN 0-471-43417-5.
- HARBRON R.R.S. (2004) Molecular Analysis and Genome Discovery, 29–32.
J. Wiley and Sons Ltd, West Sussex, England. ISBN 0-471-49919-6.
- HARTUNG M. (2006) Erreger von Zoonosen in Deutschland im Jahr 2007, 9–10.
BfR-Hausdruckerei, Dahlem. ISBN 3-938163-47-X.
- HARTUNG M. (2007) *Ergebnisse der Zoonoseerhebung 2005 bei Lebensmitteln*.
Fleischwirtschaft **2**: 98–106.
- HARTUNG M. (2008) *E.coli EHEC/VTEC/STEC*.
BfR-Wissenschaft 2008 133–135.
- HAYASHI T., MAKINO K., OHNISHI M., KUROKAWA K., ISHII K., YOKOYAMA K., HAN C., OHTSUBO E., NAKAYAMA K., MURATA T., TANAKA M., TOBE T., IDA T., TAKAMI H., HONDA T., SASAKAWA C., OGASAWARA N., YASUNAGA T., KUHARA S., SHIBA T., HATTORI M. und SHINAGAWA H. (2001) *Complete Genome Sequence of Enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 and Genomic Comparison*

- with a Laboratory Strain K-12.*
DNA Res **8**: 11–22.
- HEURICH M. (2010) *Bestand und Haltung der Wildwiederkäuer im Bayerischen Wald.*
persönliche Mitteilung.
- HEURICH M., BAIERL F., GÜNTHER S. und SINNER K. (2010) *Wildtiermanagement im Nationalpark Bayerischer Wald.*
Nationalpark-Jahrbuch Unteres Odertal **5**: 133.
- HEUVELINK A., VAN HEERWAARDEN C., ZWARTKRUISNAHUIS J., VAN OOSTEROM R., EDINK K., VAN DUYNHOVEN Y. und DE BOER E. (2002) *Escherichia coli O157 Infection Associated with a Petting Zoo.*
Epidemiol Infect **129**: 295–302.
- HEYDERMAN R., SORIANI M. und HIRST T. (2001) *Is immune cell activation the missing link in the pathogenesis of post-diarrhoeal HUS?.*
Trends Microbiol **9**: 262–266.
- HORNITZKY M., BETTELHEIM K. und DJORDJEVIC S. (2001) *The detection of Shiga toxin-producing Escherichia coli in diagnostic bovine faecal samples using vancomycin-cefixime-cefsulodin blood agar and PCR.*
FEMS Microbiol Lett **198**: 17–22.
- HURLIN J. und SCHULZE H. (2007) *Möglichkeiten und Grenzen der Qualitätssicherung in der Wildfleischvermarktung.*
<http://www.uni-göttingen.de/de/21245.html>. Zugriff am: 21.07.10.
- HUSSEIN H. und BOLLINGER L. (2008) *Influence of selective media on successful detection of Shiga toxin-producing Escherichia coli in food, fecal, and environmental samples.*
Foodborne Pathog Dis **5**: 227–244.
- IBEKWE A., WATT P., GRIEVE C., SHARMA V. und LYONS S. (2002) *Multiplex Fluorogenic Real-Time PCR for Detection and Quantification of Escherichia coli O157:H7 in Dairy Wastewater Wetlands.*
Appl Environ Microbiol **68**: 48534862.

- ISHII S., MEYER K. und SADOWSKY M. (2007) *Relationship between Phylogenetic Groups, Genotypic Clusters, and Virulence Gene Profiles of Escherichia coli Strains from Diverse Human and Animal Sources.*
Appl Environ Microbiol **73**: 5703–5710.
- JACKSON M., NEILL R., O'BRIEN A., HOLMES R. und NEWLAND J. (1987) *Nucleotide sequence analysis and comparison of the structural genes for Shiga-like toxin I and Shiga-like toxin II encoded by bacteriophages from 933J from Escherichia coli 933.*
FEMS Microbiol **44**: 109–114.
- JARVIS K. und KAPER J. (1996) *Secretion of Extracellular Proteins by Enterohemorrhagic Escherichia coli via a Putative Type III Secretion System.*
Infect Immun **64**: 4826–4829.
- JASSON V., RAJKOVIC A., BAERT L., DEBEVERE J. und UYTENDAELE M. (2009) *Comparison of enrichment conditions for rapid detection of low numbers of sublethally injured Escherichia coli O157 in food.*
J Food Prot **72**: 1862–1868.
- JENKINS C., PERRY N., CHEASTY T., SHAW D., FRANKEL G., DOUGAN G., GUNN G., SMITH H., PATON A. und PATON J. (2003) *Distribution of the saa Gene in Strains of Shiga Toxin-Producing Escherichia coli of Human and Bovine Origins.*
J Clin Microbiol **41**: 1775–1778.
- JERSE A., YU J., TALL B. und KAPER J. (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., YOSHITOMI K. und WEAGANT S. (2003) *Multiplex Real-Time PCR Method To Identify Shiga Toxin Genes stx1 and stx2 and Escherichia coli O157:H7/H-Serotype.*
Appl Environ Microbiol **69**: 6327–6333.
- JORES J., ZEHMKE K., EICHBERG J., RUMER L. und WIELER L. (2003) *Supplement: Description of a Novel Intimin Variant (Type ζ) in the Bovine O84:NM Verotoxin-Producing Escherichia coli Strain 537/89 and the Diagnostic Value of Intimin Typing.*

- Exp Biol Med 370–376.
- JOTHIKUMAR N. und GRIFFITHS M. (2002) *Rapid Detection of Escherichia coli O157:H7 with Multiplex Real-Time PCR Assays.*
Appl Environ Microbiol **68**: 31693171.
- JÜRGENS D., ÖZEL M. und TAKAISI-KIKUNI N. (2002) *Production and characterization of Escherichia coli enterohemolysin and its effects on the structure of erythrocyte membranes.*
Cell Biol Int **26**: 175–186.
- KAPER J., NATARO J. und MOBLEY H. (2004) *Pathogenic Escherichia coli.*
Nature Reviews **2**: 123.
- KAPER J. und O'BRIEN A. (1998) *Escherichia coli O157:H7 and other shiga toxin-producing E.coli strains*, 184–190.
ASM Press, Washington D.C. ISBN 1-55581-129-9.
- KARCH H. und BIELASZEWSKA M. (2001) *Sorbitol-Fermenting Shiga Toxin-Producing Escherichia coli O157:H- Strains: Epidemiology, Phenotypic and Molecular Characteristics and Microbiological Diagnosis.*
J Clin Microbiol **39**: 2043–2049.
- KARCH H., BOCKEMÜHL B. und HUPPERTZ H. (2000) *Erkrankungen durch enterohämorrhagische Escherichia coli (EHEC).*
Dt Ärztebl **36**: 2314–2318.
- KARCH H., HEESEMANN J., LAUFS R., O'BRIEN A., TACKET C. und LEVINE M. (1987) *A plasmid of enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 is required for expression of a new fimbrial antigen and for adhesion to epithelial cells.*
Infect Immun **55**: 455–461.
- KARCH H., MEYER T., RÜSSMANN H. und HEESEMANN J. (1992) *Frequent loss of Shiga-like toxin genes in clinical isolates of Escherichia coli upon subcultivation.*
Infect Immun **60**: 3464–3467.

- KARMALI M. (2004) *Infection by Shiga Toxin-Producing Escherichia coli*.
Mol Biotechnol **26**(2): 117–122.
- KARMALI M., STEELE B., PETRIC M. und LIM C. (1983) *Sporadic cases of haemolytic uremic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxinproducing Escherichia coli in stools.*
Lancet **i**: 619–620.
- KARPMAN D., HAKANSSON A., PEREZ M., ISAKSON C., CARLEMALM E., CAPRIOLI A. und SVANBORG C. (1998) *Apoptosis of renal cortical cells in the hemolytic-uremic syndrome: in vivo and in vitro studies*.
Infect Immun **66**: 636–644.
- KEENE W., SAZIE E., KOK J., RICE D., HANCOCK D., BALAN V., ZHAO T. und DOYLE M. (1997) *An Outbreak of Escherichia coli O157:H7 Infections Traced to Jerky Made From Deer Meat*.
JAMA **277**: 1229–1231.
- KEHL S. (2002) *Role of the laboratory in the diagnosis of enterohemorrhagic strain of E.coli infections*.
J Clin Microbiol **40**: 2711–2715.
- KEMPER N., ASCHFALK A. und HÖLLER C. (2006) *Campylobacter spp., Enterococcus spp., Escherichia coli, Salmonella spp., Yersinia spp., and Cryptosporidium oocysts in semi-domesticated reindeer (Rangifer tarandus tarandus) in Northern Finland and Norway*.
Acta Vet Scand **48**: 1–7.
- KESKIMAKI M., SAARI M., HEISKANEN T. und SIITONEN A. (1998) *Shiga toxin-producing Escherichia coli in Finland from 1990 through 1997: prevalence and characteristics of isolates*.
J Clin Microbiol **36**: 3641–3646.
- KILIAN M. und BÜLOW P. (1979) *Rapid identification of Enterobacteriaceae. II. Use of a beta-glucuronidase detecting agar medium (PGUA agar) for the identification of E.coli in primary cultures of urine samples*.
Acta Pathol Microbiol Scand **87**: 271–276.

- KIMATA K., SHIMA T., SHIMIZU M., TANAKA D., ISOBE J., GYOBU Y., WATAHIKI M. und NAGAI Y. (2005) *Rapid categorization of Pathogenic Escherichia coli by Multiplex PCR.*
Microbiol Immunol **49**: 485–492.
- KIMMITT P., HARWOOD C. und BARER M. (2000) *Toxin gene expression by shiga toxin-producing Escherichia coli: the role of antibiotics and the bacterial SOS response.*
Emerg Infect Dis **6**: 458–465.
- KOBAYASHI H., POHJANVIRTA T. und PELKONEN S. (2002) *Prevalence and Characteristics of Intimin- and Shiga Toxin-Producing Escherichia coli from Gulls, Pigeons and Broilers in Finland.*
J Vet Med Sci **64**: 1071–1073.
- KOCH C., HERTWIG S., LURZ R., APPEL B. und BEUTIN L. (2001) *Isolation of a lysogenic bacteriophage carrying the stx1OX3 gene, which is closely associated with Shiga toxin-producing Escherichia coli strains from sheep and humans.*
J Clin Microbiol **39**: 3992–3998.
- KONOWALCHUK J., SPEIRS J. und STAVRIC S. (1977) *Vero Response to a Cytotoxin of Escheria coli.*
Infect Immun **18**: 775–779.
- KRAUSE G. und BEUTIN L. (2008) *Bewertung des Virulenzpotentials von Shigatoxin 2e (Stx2e) bildenden E.coli-Stämmen.*
BfR, Fortbildung für den öffentlichen Gesundheitsdienst 1–19.
- KRAUSE G., ZIMMERMANN S. und BEUTIN L. (2005) *Investigation of domestic animals and pets as a reservoir for intimin-(eae) gene positive Escherichia coli types.*
Vet Microbiol **106**: 87–95.
- KRESSE A., SCHULZE K., DEIBEL C., EBEL F., ROHDE M., CHAKRABORTY T. und GUZMAN C. (1998) *Pas, a Novel Protein Required for Protein Secretion and Attaching and Effacing Activities of Enterohemorrhagic Escherichia coli.*
J Bacteriol **180**: 4370–4379.
- KUCZIUS T., BIELASZEWSKA M., FRIEDRICH A. und ZHANG W. (2004) *A rapid*

- method for the discrimination of genes encoding classical Shiga toxin (Stx) 1 and its variants, Stx1c and Stx1d, in Escherichia coli.*
Mol Nutr Food Res **48**: 515–521.
- KUHNERT P., BOERLIN P. und FREY J. (2000) *Target genes for virulence assessment of Escherichia coli isolates from water, food and the environment.*
FEMS Microbiol Rev **24**: 107–117.
- KUJAWSKI O. (2009) Wild und Wilderzeugnisse, 1–8.
Druckerei Lokay e.K., Reinheim. ISBN 978-3-8308-0821-3.
- KUMAR H., KARUNASAGAR I., KARUNASAGAR I., TEIZOU T., SHIMA K. und YAMASAKI S. (2004) *Characterisation of Shiga toxin-producing Escherichia coli (STEC) isolated from seafood and beef.*
FEMS Microbiol Lett **233**: 173–178.
- KURMANOVA A., LLORENTE A., POLESSKAYA A., GARRED O., OLSNES S., KOZLOV J. und SANDVIG K. (2007) *Structural requirements for furin-induced cleavage and activation of Shiga toxin.*
Biochem Biophys Res Commun **357**: 144–149.
- KUTZER E. (2000) Lexikon der Veterinärmedizin, 656.
Enke Verlag, Stuttgart. ISBN 3-7773-1459-5.
- LACY D. und STEVENS R. (1998) *Unraveling the structures and modes of action of bacterial toxins.*
Curr Opin Struct Biol **8**: 778–784.
- LAHTI E., HIRVELÄ-KOSKI V. und HONKANEN-BUZALSKI T. (2001) *Occurrence of Escherichia coli O157 in reindeer (Rangifer tarandus).*
Vet Rec **148**: 633–634.
- LAHUERTA A., HELWIGH B. und MÄKELÄ P. (2010) *Zoonoses in Europe: distribution and trends - the EFSA-ECDC Community Summary Report 2008.*
Euro Surveill **15**: 1.

- LAURELLE L. (1889) *L'Etude bacteriologique sur les peritonites par perforation*.
La Cellule **5**: 60–123.
- LEFEBVRE B., DIARRA M., VINCENT C., MOISAN H. und MALOUIN F. (2009)
Relative cytotoxicity of Escherichia coli O157:H7 isolates from beef cattle and humans.
Foodborne Pathog Dis **6**: 357–364.
- LEHMANN S., TIMM M., STEINRÜCK H. und GALLIEN P. (2006) *Nachweis von STEC
im Kot von Hochwild und in Wildfleischproben*.
Fleischwirtschaft **4**: 93–96.
- LEOTTA G., DEZA N., ORIGLIA J., TOMA C., CHINEN I., MILIWEBSKY E., IYODA
S., SOSA-ESTANI S. und RIVAS M. (2006) *Detection and characterization of Shiga
toxin-producing Escherichia coli in captive non-domestic mammals*.
Vet Microbiol **118**: 151–157.
- LEUNG P., PEIRIS J., NG W., ROBINS-BROWNE R., BETTELHEIM K. und YAM W.
(2003) *A Newly Discovered Verotoxin Variant, VT2g, Produced by Bovine Verocytotoxi-
genic Escherichia coli*.
Appl Environ Microbiol **69**: 7549–7553.
- LEVINE M. (1987) *Escherichia coli that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic,
enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent*.
J Infect Dis **155**: 377–389.
- LILLEHAUG A., BERGSJØ B., SCHAU J., BRUHEIM T., VIKØREN T. und HANDELAND
K. (2005) *Campylobacter spp., Salmonella spp., Verocytotoxic Escherichia coli, and
Antibiotic Resistance in Indicator Organisms in Wild Cervids*.
Acta vet scand **46**: 23–32.
- LINGWOOD C. (1996) *Role of verotoxin receptors in pathogenesis*.
Trends Microbiol **4**(4): 147–153.
- LIVAK K., FLOOD J., MARMARO W., GIUSTI W. und DEETZ K. (1995) *Oligonucleoti-
des with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for
detecting PCR product and nucleic acid hybridization*.
PCR Methods Appl **4**: 357–362.

- LOGAN J., EDWARDS K. und SAUNDERS N. (2009) *Real-time PCR Current Technology and Applications*, 2–27.
Caister Academic Press, Norfolk UK. ISBN 978-1-904455-39-4.
- MAG T., NOGRADY N., HERPAY M., TOTH I. und ROZGONYI F. (2010) *Characterisation of verotoxin-producing Escherichia coli strains isolated from human patients in Hungary over a 7-year period*.
Eur J Clin Microbiol Infect Dis **29**: 249–252.
- MAKI D. (2006) *Don't Eat Spinach-Controlling Foodborne Infectious Disease*.
N Engl J Med **355**: 1952–1955.
- MAKINO S., KOBORI H., ASAKURA H., WATARAI M., SHIRAHATA T., IKEDA T., TAKESHI K. und TSUKAMOTO T. (2000) *Detection and Characterization of Shiga Toxin-Producing Escherichia coli from Seagulls*.
Epidemiol Infect **125**: 55–61.
- MARLER B. (2009) *Non-O157:H7 Shiga toxin E.coli - human disease, vectors and outbreaks*.
<http://www.foodpoisonjournal.com>. Zugriff am: 21.07.10.
- MAYRSHOFER F. (2005) *Zum Vorkommen von Stx1-Varianten beim Rind in Südbayern*. Ph.D. thesis, Tierärztlichen Fakultät der Universität München.
- MCDONOUGH P., ROSSITER C., REBHUN R., STEHMAN S., LEIN D. und SHIN S. (2000) *Prevalence of Escherichia coli O157:H7 from Cull Dairy Cows in New York State and Comparison of Culture Methods Used during Preharvest Food Safety Investigations*.
J Clin Microbiol **38**: 318–322.
- MEAD P., SLUTSKER L., DIEZ V., MCCAIG L., BRESEE J., SHAPIRO C., GRIFFIN P. und TAUXE R. (2008) *Shiga Toxin-Producing Escherichia coli: Burden and Trends*.
Foodnet News **2**: 1–4.
- MELTON-CELSA A., ROBINSON C., SMITH M. und O'BRIEN A. (2007) *Shigatoxins (Stxs): Multifaceted Pathogenicity determinants in: Virulence Mechanisms of bacterial pathogens*, 240–241.
ASM Press, Washington D.C. ISBN 978-1-55581-469-4.

- MIKO A. und BEUTIN L. (2009) *Wild game as a reservoir for Shiga toxin-producing Escherichia coli (STEC) - a potential risk for humans?*.
4th PEN Conference March 2009 46–47.
- MILNES A., SAYERS A., STEWART I., CLIFTON-HADLEY F., DAVIES R., NEWELL D., COOK A., EVANS S., SMITH R. und PAIBA G. (2009) *Factors related to the carriage of Verocytotoxigenic E. coli, Salmonella, thermophilic Campylobacter and Yersinia enterocolitica in cattle, sheep and pigs at slaughter*.
Epidemiol Infect **137**: 1135–48.
- MÖLLER-NIELSEN E., SKOV M., MADSEN J., LODAL J., JESPERSEN J. und BAGGENSEN D. (2004) *Verocytotoxin-Producing Escherichia coli in Wild Birds and Rodents in Close Proximity to Farms*.
Appl Environ Microbiol **70**: 6944–6947.
- MÖLLER-NIELSEN E., TEGTMEIER C., ANDERSEN H., GROENBAEK C. und ANDERSEN J. (2002) *Influence of age, sex and herd characteristics on the occurrence of verocytotoxin-producing Escherichia coli O157 in Danish dairy farms*.
Vet Microbiol **88**: 245–257.
- MÖLLER-NIELSEN E. und THORUP-ANDERSEN M. (2003) *Detection and Characterization of Verocytotoxin-Producing Escherichia coli by Automated 5' Nuclease PCR Assay*.
J Clin Microbiol **41**: 2884–2893.
- MÜFFLING T., SMAIJLOVIC M., NOWAK B., SAMMET K., BÜLTE M. und KLEIN G. (2007) *Preliminary study of certain serotypes, genetic and antimicrobial resistance profiles of verotoxigenic Escherichia coli (VTEC) isolated in Bosnia and Germany from cattle or pigs and their products*.
Int J Food Microbiol **117**: 185–191.
- NADERER J. und HUBER A. (2005) *Die Wildhaltung in der Landwirtschaft*.
<http://www.lfl.bayern.de/ith/wild/11007>. Zugriff am: 21.07.10.
- NAGANO H., HIROCHI T., FUJITA K., WAKAMORI Y., TAKESHI K. und YANO S. (2004) *Phenotypic and genotypic characterization of β -D-glucuronidase-positive Shiga*

- toxin-producing Escherichia coli O157:H7 isolates from deer.*
J Med Microbiol **53**: 1037–1043.
- NATARO J. und KAPER J. (1998) *Diarrheagenic Escheria coli.*
Clin Microbiol Rev **11**: 142–201.
- NAYLOR S., GALLY D. und LOW J. (2005) *Enterohaemorrhagic E.coli in veterinary medicine.*
Int J Med Microbiol **295**: 419–441.
- N.N. (1998) BBL® Enterotube™ II Interpretation Guide, Cat Nr. 4373591, 44.
Becton Dickinson, France.
- N.N. (2006) *Kurzinformation Wildbrethygiene und Wildbretvermarktung aus rechtlicher und jagdpraktischer Sicht.*
http://www.ljn.de/uploads/media/Wildbrethygiene_01.pdf. Zugriff am: 21.07.10.
- N.N. (2008a) *Kurzporträts der einheimischen Huftiere.*
<http://www.wild.uzh.ch>. Zugriff am: 21.07.10.
- N.N. (2008b) *PCRfast Bacillus cereus.*
<http://www.practical.jp/sale/sales/pcrfast/MO%20manual/MG%201006-%20Bacillus%20cereus.pdf>. Zugriff am: 21.07.10.
- N.N. (2010a) *Bayerischer Jagdverband.*
<http://www.jagd-bayern.eu>. Zugriff am: 21.07.10.
- N.N. (2010b) *Jahresjagdstrecken Bundesrepublik Deutschland.*
<http://www.jagd-online.de>. Zugriff am: 21.07.10.
- N.N. (2010c) *Landesjagdverband Nordrhein-Westfalen.*
<http://www.ljv-nrw.de/wild/>. Zugriff am: 21.07.10.
- O'BRIEN A. und LAVECK G. (1983) *Purification and characterization of a Shigella dysenteriae 1-like toxin produced by Escherichia coli.*
Infekt Immun **40**: 675–683.

- O'BRIEN A., THOMPSON M., CANTEY J. und FORMAL S. (1977) *Production of a Shigella dysenteriae-like toxin by pathogenic Escherichia coli*.
Abstract Annual Meeting American Society Microbiology **103**: 32.
- OBRIG T., LOUISE C., LINGWOOD C., BOYD B., BARLEY-MALONEY L. und DANIEL T. (1993) *Endothelial Heterogeneity in Shiga Toxin Receptors and Responses*.
J Biol Chem **268**: 15484–15488.
- O'CLIVER D. und RIEMANN H. (2002) *Foodborne Disease*, 92.
Elsevier Science LTD, New York. ISBN 0-12-176559-8.
- OLIVEIRA M., BRITO J., CARVALHO R., GUTH B., GOMES T., VIEIRA M., KATO M., RAMOS I., VAZ T. und IRINO K. (2007) *Water Buffalos (Bubalus bubalis) identified as an important reservoir of shiga toxin-producing Escherichia coli in Brazil*.
Appl Environ Microbiol **73**: 5945–5948.
- ORDEN J., CORTE'S C., RUIZ-SANTA-QUITERIA J., MARTINEZ S. und DE LA FUENTE R. (2005) *Detection of the saa gene in verotoxin-producing Escherichia coli from ruminants*.
Vet Diagn Invest **17**: 65–67.
- ORSKOV I. und ORSKOV F. (1983) *Serology of Escherichia coli fimbriae*.
Prog Allergy **33**: 80–105.
- ORTH D., GRIF K., FISHER I., FRUTH A., TSCHÄPE H., SCHEUTZ F., DIETRICH M. und WÜRZNER R. (2006) *Emerging Shiga Toxin-Producing Escherichia coli Serotypes in Europe: O111:H- and O127:H40*.
Curr Microbiol **53**: 428–429.
- OSEK J. (2003) *Development of a multiplex PCR approach for the identification of Shiga toxin-producing Escherichia coli strains and their major virulence factor genes*.
J Appl Microbiol **95**: 12171225.
- O'SULLIVAN J., BOLTON D., DUFFY G., BAYLIS C., TOZZOLI R., WASTESON Y. und LOFDAHL S. (2006) *Methods for Detection and Molecular Characterisation of Pathogenic Escherichia coli*.
<http://www.pen-project.eu>.

- OSWALD E., SCHMIDT H., MORABITO S., KARCH H., MARCHES O. und CAPRIOLI A. (2000) *Typing of Intimin Genes in Human and Animal Enterohemorrhagic and Enteropathogenic Escherichia coli: Characterization of a New Intimin Variant.*
Infect Immun **68**: 64–71.
- PAIVA DE SOUSA C. und DUBREUIL J. (2001) *Distribution and expression of the astA gene (EAST1 toxin) in Escherichia coli and Salmonella.*
Int J Med Microbiol **291**: 15–20.
- PANDA A., TATAROV I., MELTON-CELSA A., KOLAPPASWAMY K., KRIEL E., PETKOV D., COKSAYGAN T., LIVIO S., MCLEOD C., NATARO J., A. O'BRIEN A. und DETOLLA L. (2010) *Escherichia coli O157:H7 Infection in Dutch Belted and New Zealand White Rabbits.*
Comp Med **60**: 31–37.
- PATON A., BEUTIN L. und PATON J. (1995) *Heterogeneity of the amino-acid sequences of Escherichia coli Shiga-like toxin type-I operons.*
Gene **153**: 71–74.
- PATON A. und PATON J. (2002) *Direct Detection and Characterization of Shiga Toxigenic Escherichia coli by Multiplex PCR for stx1, stx2, eae, ehxA, and saa.*
J Clin Microbiol **40**: 271–274.
- PATON A. und PATON J. (2005) *Multiplex PCR for direct detection of Shiga toxigenic Escherichia coli producing the novel subtilase cytotoxin.*
J Clin Microbiol **43**: 2944–2947.
- PATON A. und PATON J. (2010) *Escherichia coli Subtilase Cytotoxin.*
Toxins **2**: 215–228.
- PATON A., SRIMANOTE P., WOODROW M. und PATON J. (2001) *Characterization of Saa, an Novel Autoagglutinating Adhesin Produced by Locus of Enterocyte Effacement-Negative Shiga-Toxigenic Escherichia coli That Are Virulent for Humans.*
Infect Immun **69**: 6999–7009.
- PATON A., WOODROW M., DOYLE R., LANSEER J. und PATON J. (1999) *Molecular characterization of a Shiga-toxigenic Escherichia coli O113:H21 strain lacking eae*

- responsible for a cluster of cases of hemolytic-uremic syndrome.*
J Clin Microbiol **37**: 3357–3361.
- PERELLE S., DILASSER F., GROUT J. und FACH P. (2007) *Screening food raw materials for the presence of the world's most frequent clinical cases of Shiga toxin-encoding Escherichia coli O26, O103, O111, O145 and O157.*
Int J Food Microbiol **113**: 284–288.
- PERSOON S., OLSEN K., ETHELBERG S. und SCHEUTZ F. (2007) *Subtyping method for Escherichia coli Shiga toxin (Verocytotoxin) 2 variants and correlations to clinical manifestations.*
J Clin Microbiol **45**: 2020–2024.
- PHILPOTT D. und EBEL F. (2003) *E.coli Shiga Toxin Methods and Protocols*, 165.
Humana Press, New Jersey. ISBN 0-899603-939-0.
- PIERARD D., DAMME L.V., MORIAU L., STEVENS D. und LAUWERS S. (1997) *Virulence Factors of Verocytotoxin-Producing Escherichia coli Isolated from Raw Meats.*
Appl Environ Microbiol **63**: 4585–4587.
- PIERARD D., MUYLDERMANS G., MORIAU L., STEVENS D. und LAUWERS S. (1998) *Identification of a new verocytotoxin type 2 variant B-subunit genes in human and animal Escherichia coli isolates.*
J Clin Microbiol **36**: 3317–3322.
- PONTELLO M., BERSANI C., COLMEGNA S. und CANTONI C. (2003) *Verocytotoxin-producing Escherichia coli in foodstuffs of animal origin.*
Eur J Epidemiol **18**: 157–160.
- PRADEL N., BERTIN Y., MARTIN C. und LIVRELLI V. (2008) *Molecular analysis of Shiga Toxin-producing Escherichia coli strains isolated from Hemolytic-Uremic Syndrome Patients in France.*
Appl Environ Microbiol **74**: 2118–2128.
- PRADEL N., BOUKHORS K., BERTIN Y., FORESTIER C., MARTIN C. und LIVRELLI V. (2001) *Heterogeneity of Shiga Toxin-Producing Escherichia coli Strains Isolated from*

- Hemolytic-Uremic Syndrome Patients, Cattle, and Food Samples in Central France.*
Appl Environ Microbiol **67**: 2460–2468.
- PRAGER R., FRUTH A., SIEWERT U., STRUTZ U. und TSCHAEPE H. (2008) *Escherichia coli* encoding Shigatoxin 2f as an emerging human pathogen.
J Med Microbiol **299**: 343–353.
- PRITCHARD G., SMITH R., ELLIS-IVERSEN J., CHEASTY T. und WILLSHAW G. (2009) *Verocytotoxigenic Escherichia coli* O157 in animals on public amenity premises in England and Wales, 1997 to 2007.
Vet Rec **164**: 545–549.
- PRITCHARD G., WILLSHAW G., BAILEY J., CARSON T. und CHEASTY T. (2000) *Verocytotoxin-producing Escherichia coli* O157 on a farm open to the public: outbreak investigation and longitudinal bacteriological study.
Vet Rec **147**: 259–264.
- PROULX F., SEIDMAN E. und KARPMAN D. (2001) *Pathogenes of Shiga Toxin-Associated Hemolytic Uremic Syndrome.*
Pediatr Res **50**: 163–171.
- RABATSKY-EHR T., DINGMAN D., MARCUS R., HOWARD R., KINNEY A. und MSHAR P. (2002) *Deer Meet as the Source for a Sporadic Case of Escherichia coli* O157:H7 Infection, Connecticut.
Emerg Infect Dis **8**: 525–527.
- RAMACHANDRAN V., HORNITZKY M., BETTELHEIM K., WALKER M. und DJORDJEVIC S. (2001) *The common ovine Shiga toxin 2-containing Escherichia coli* serotypes and human isolates of the same serotypes possess a *stx2d* toxin type.
J Clin Microbiol **39**: 1932–1937.
- REISCHL U., YOUSSEF M., KILWINSKI J., LEHN N., ZHANG W.L., KARCH H. und STROCKBINE N. (2002) *Real-Time Fluorescence PCR Assays for Detection and Characterization of Shiga Toxin, Intimin, and Enterohemolysin Genes from Shiga Toxin-Producing Escherichia coli.*
J Clin Microbiol **40**: 2555–2565.

- RENTER D., SARGEANT J., HYGNSTORM S., HOFFMAN J. und GILLESPIE J. (2001) *Escherichia coli* O157:H7 in free-ranging deer in Nebraska. J Wildl Dis **37**: 755–760.
- RICE D., HANCOCK D. und BESSER T. (2003) *Faecal culture of wild animals for Escherichia coli* O157:H7. Vet Rec **152**: 82–83.
- RICE D., HANCOCK D. und T.BESSER (1995) *Verotoxigenic E.coli* O157 colonisation of wild deer and range cattle. Vet Rec **137**: 524.
- RICH C., ALFIDJA A., SIROT J., JOLY B. und FORESTIER C. (2001) *Identification of Human Enterovirulent Escherichia coli* Strains by Multiplex PCR. Clinical Laboratory Analysis **15**: 10–103.
- RIEMELMOSER A. und RIEMELMOSER R. (2006) *Dam- und Rotwild im Gehege-Anlage Haltung Vermarktung*, 14. Leopold Stocker Verlag, Graz. ISBN 978-3-7020-1118-5.
- RILEY D., GRAY J., LONERAGAN G., BARLING K. und CHASE C. (2003) *Escherichia coli* O157:H7 prevalence in fecal samples of cattle from a southeastern beef cow-calf herd. J Food Prot **66**: 1778–1782.
- RILEY L., REMIS R., HELGERSON S., MCGEE H., WELLS J., DAVIS B., HERBERT R., OLCOTT E., JOHNSON L., HARGRETT N., BLAKE P. und COHEN M. (1983) *Hemorrhagic colitis associated with a rare Escherichia coli* serotype. N Engl J Med **308**: 681–685.
- RKI (1999a) *Fallbericht: Inkomplettes HUS bei EHEC-Enteritis, übertragen durch Minipferde*. Epidemiol Bull **37**: 276.
- RKI (1999b) *Infektionen durch Enterohämorrhagische Escherichia coli (EHEC)*. Epidemiol Bull **31**: 227–230.

- RKI (2006) *EHEC-Erkrankungen*.
Epidemiol Bull **41**: 353–355.
- RKI (2008) *Erkrankungen durch enterohämorrhagische Escherichia coli (EHEC); RKI-Ratgeber Infektionskrankheiten-Merkblätter für Ärzte*.
<http://www.rki.de>. Zugriff am: 21.07.10.
- RKI (2010) *EHEC/STEC*.
<http://www3.rki.de/SurvStat/>.
Suchkriterien: EHEC/STEC; über Gesundheitsamt und Landesstelle; alle Erreger;
Jahr 2009; entspricht der Referenzdefinition
Zugriff am: 21.07.10.
- RKI und BGVV (1997) *EHEC-Infektionen Erkennung, Verhütung, Bekämpfung. Merkblatt für Ärzte*.
Bundesgesundhbl **40**: 210–211.
- SAMUEL J. und GORDON V. (1994) *Evidence That Proteolytic Separation of Shiga-like Toxin Type II α A Subunit into A1 and A2 Subunits Is Not Required for Toxin Activity*.
J Biol Chem **269**: 4853–4859.
- SANCAK A., RUTGERS H., HART C. und BATT R. (2004) *Prevalence of enteropathic Escherichia coli in dogs with acute and chronic diarrhoea*.
Vet Rec **154**: 101–106.
- SANCHEZ S., MARTINEZ R., REY J., GARCIA A., BLANCO J., BLANCO M., BLANCO J., MORA A., HERRERA-LEON S., ECHEITA A. und ALONSO J. (2009) *Phenotypic characterisation of Escherichia coli O157:H7 isolates from domestic and wild ruminants*.
Vet Microbiol **4637**: 1–5.
- SANDVIG K. und VANDEURS B. (2002) *Transport of protein toxins into cells: pathways used by ricin, cholera toxin and Shiga toxin*.
FEBS Lett **529**: 49–53.
- SARGEANT J., HAFFER D., GILLESPIE J., OBERST R. und FLOOD S. (1999) *Prevalence of Escherichia coli O157:H7 in white-tailed deer sharing rangeland with cattle*.

- J Am Vet Med Assoc **215**: 792–794.
- SAVARINO S., FASANO A., ROBERTSON D. und LEVINE M. (1991) *Enteroaggregative Escherichia coli* Elaborate a Heat-Stable Enterotoxin Demonstrable in an In Vitro Rabbit Intestinal Model.
J Clin Invest **87**: 1450–1455.
- SAVARINO S., MCVEIGH A., WATSON J., CRAVIOTO A., MOLINA J., ECHEVERRIA P., BHAN M., LEVINE M. und FASANO A. (1996) *Enteroaggregative Escherichia coli* heat-stable enterotoxin is not restricted to enteroaggregative *E. coli*.
J Infect Dis **173**: 1019–1022.
- SCHUTZ F., OLSEN B. und GERNER-SMIDT P. (2000) *Verocytotoxigenic E. coli* (VTEC) from Danish patients 1997-1999.
Proceedings of the 4th International Symposium and Workshop on Shiga Toxin (Verocytotoxin)-Producing *Escherichia coli* Infections; Kyoto Japan **207**: 98.
- SCHUTZ F. und STROCKBINE N. (2005) Genus I *Escherichia* in: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume 2 Part B, 607–623.
Springer Verlag, USA. ISBN 978-0387-24144-9.
- SCHMIDT H., BEUTIN L. und KARCH H. (1995) *Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of Escherichia coli O157:H7 strain EDL 933*.
Infect Immun **63**: 1055–1061.
- SCHMIDT H., BIELASZEWSKA M. und KARCH H. (1999) *Transduction of enteric Escherichia coli isolates with a derivative of Shiga toxin 2-encoding bacteriophage 3538 isolated from Escherichia coli O157*.
Appl Environ Microbiol **65**: 3855–3861.
- SCHMIDT H., MONTAG M., BOCKEMÜHL J., HESEMANN J. und KARCH H. (1993) *Shiga-like toxin II-related cytotoxins in Citrobacter freundii strains from humans and beef samples*.
Infect Immun **61**: 534–543.
- SCHMIDT H., SCHEEF J., MORABITO S., CAPRIOLI A., WIELER L. und KARCH H. (2000) *A New Shiga Toxin 2 Variant (Stx2f) from Escherichia coli Isolated from Pigeons*.

Appl Environ Microbiol **66**: 1205–1208.

SCHMITT C., MCKEE M. und O'BRIEN A. (1991) *Two copies of Shiga-like toxin II-related genes common in enterohemorrhagic Escherichia coli strains are responsible for the antigenic heterogeneity of the O157:H- strain E32511.*

Infect Immun **59**: 1065–1073.

SCHOUTEN J., VAN DE GIESSEN A., FRANKENA K., DE JONG M. und GRAAT E. (2005) *Escherichia coli O157 prevalence in Dutch poultry, pig finishing and veal herds and risk factors in Dutch veal herds.*

Prev Vet Med **70**: 1–15.

SCHREIBER C. (2008) Genotypische und phänotypische Charakterisierung von Shigatoxin-bildenden und enterohämorrhagischen *Escherichia coli*-Isolaten von Mensch, Tier, Lebensmittel und Wasser aus Bayern im Zeitraum von 2002 bis 2006. Ph.D. thesis, Institut für Hygiene und Technologie der Lebensmittel tierischen Ursprungs, Tierärztliche Fakultät, LMU München.

SEPEHRISERESHT S., SALEHI T., SATTARI M., TADJBAKHS H. und ASLANI M. (2009) *Detection of shigatoxigenic Escherichia coli from fecal samples of calves and cattle by molecular and serological methods.*

Comp Clin Pathol **18**: 53–57.

SHARMA V. (2006) *Real-time reverse transcription-multiplex PCR for simultaneous and specific detection of rfbE and eae genes of Escherichia coli O157:H7.*

Mol Cell Probes **20**: 298–306.

SHARMA V. und DEAN-NYSTROM E. (2003) *Detection of enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 by using a multiplex real-time PCR assay for genes encoding intimin and Shiga toxins.*

Vet Microbiol **93**: 247–260.

SHEKARFOROUSH S., TAHAMTAN Y. und POURBAKHS A. (2008) *Detection and frequency of Stx2 gene in Escherichia coli O157 and O157:H7 strains isolated from sheep carcasses in Shiraz-Iran..*

Pak J Biol Sci **11**: 1085–1092.

- SHIMIZU T., OHTA Y. und NODA M. (2009) *Shiga Toxin 2 Is Specifically Released from Bacterial Cells by Two Different Mechanisms.*
Infect Immun **77**: 2813–2823.
- SHUKLA R., SLACK R., GEORGE A., CHEASTY T., ROWE B. und SCUTTER J. (1995) *Escherichia coli O157 infection associated with a farm visitor centre.*
CDR Review **5**: 86–90.
- SIEGLER R., OBRIG T., PYSHER T., TESH V., DENKERS N. und TAYLOR F. (2003) *Response to Shiga toxin 1 and 2 in a baboon model of hemolytic uremic syndrome.*
Pediatr Nephrol **18**: 92–96.
- SMULDERS F., VAGSHOLM I. und KORKEALA H. (2008) *Food-borne zoonoses, the EU zoonosis legislation and the prospects for food safety and consumer protection during primary animal production.*
Wien Klin Wochenschr **120**: 587–598.
- SNEDEKER K., SHAW D., LOCKING M. und PRESCOTT R. (2009) *Primary and secondary cases in Escherichia coli O157 outbreaks: a statistical analysis.*
BMC Infectious Diseases **9**: 144–154.
- STEPHAN R. und HÖLZLE L. (2000) *Characterization of Shiga toxin type 2 variant B-subunit in Escherichia coli strains from asymptomatic human carriers by PCR-RFLP.*
Lett Appl Microbiol **31**: 139–142.
- STEVENS M., VAN DIEMAN P., DZIVA F., JONES P. und WALLIS T. (2002) *Options for the control of enterohemorrhagic Escherichia coli in ruminants.*
Microbiology **148**: 3767–3778.
- STRAUCH E., HAMMERL J., KONIETZNY A., SCHNEIKER-BEKEL S., ARNOLD W., GOESMANN A., PÜHLER A. und BEUTIN L. (2008) *Bacteriophage 2851 is a prototype phage for dissemination of the Shiga toxin variant gene 2c in Escherichia coli O157:H7.*
Infect Immun **76**: 5466–5477.
- SUH J., HOVDE C. und ROBERTUS J. (1998) *Shiga toxin attacks bacterial ribosomes as effectively as eucaryotic ribosomes.*
Biochemistry **37**: 9394–9398.

- TARR P., BILGE S., VARY J., JELACIC S., HABEEB R., WARD T., BAYLOR M. und BESSER T. (2000) *Iha: a Novel Escherichia coli O157:H7 Adherence-Conferring Molecule Encoded on a Recently Acquired Chromosomal Island of Conserved Structure*.
Infect Immun **68**: 1400–1407.
- TASARA T., BIELASZEWSKA M., NITZSCHE S., KARCH H., ZWEIFEL C. und STEPHAN R. (2008) *Activatable Shiga toxin 2d (Stx2d) in STEC strains isolated from cattle and sheep at slaughter*.
Vet Microbiol **131**: 199–204.
- TE LOO D., HINSBERGH V., HEUVEL L. und MONNENS L. (2001) *Detection of verocytotoxin bound to circulating polymorphonuclear leukocytes of patients with hemolytic uremic syndrome*.
J Am Soc Nephrol **12**: 800–806.
- TESH V., BURRIS J., OWENS J., GORDON V., WADOLKOWSKI E., OBRIEN A. und SAMUEL J. (1993) *Comparison of the relative toxicities of Shiga-like toxins type I and type II for mice*.
Infect Immun **61**: 3392–3402.
- TESH V. und O'BRIEN A. (1991) *The pathogenic mechanisms of Shiga toxin and the Shiga-like toxins*.
Mol Microbiol **5**: 1817–1822.
- TEUFEL P., BARTELT E., BRÄUNIG J., ELLERBROEK L., TELO A., WICHMANN-SCHAUER H., GALLIEN P., RICHTER H., KLIE H., TIMM M. und PERLBERG K. (1998) *Nachweis von Verotoxin-produzierenden E.coli (VTEC) in Rinderhackfleisch und Weichkäse*.
Bundesgesundhbl Sonderheft 31–36.
- THOMS B. (1999) *Nachweis von verotoxinbildenden Escherichia coli in Rehfleisch*.
Archiv für Lebensmittelhygiene **50**: 52–54.
- TORGERSEN M., WÄLCHLI S., GRIMMER S., SKANLAND S. und SANDVIG K. (2007) *Protein Kinase Cdelta Is Activated by Shiga Toxin and Regulates Its Transport*.
J Biol Chem **282**: 16317–16328.

- TOTH I., COHEN M., RUMSCHLAG H., RILEY L., WHITE E., CARR J., BOND W. und WACHSMUTH I. (1990) *Influence of the 60-megadalton plasmid on adherence of Escherichia coli O157:H7 and genetic derivatives.*
Infect Immun **58**: 1223–1231.
- TRAMUTA C., ROBINO P., OSWALD E. und NEBBIA P. (2008) *Identification of intimin alleles in pathogenic Escherichia coli by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis.*
Vet Res Commun **32**: 1–5.
- UHLICH G., SINCLAIR J., WARREN N., CHMIELECKI W. und FRATAMICO P. (2006) *Characterization of Shiga toxin-producing Escherichia coli isolates associated with two multistate food-borne outbreaks that occurred in 2006.*
Appl Environ Microbiol **74**: 1268–1272.
- VAGSHOLM I., GERNER-SMIDT P., LINDGREN S. und VAN HOOF J. (2003) *Opinion of the scientific committee on veterinary measures relating to public health on verotoxigenic E. coli (VTEC) in foodstuffs .*
- VANSELOW B., KRAUSE D. und MCSWEENEY C. (2005) *The Shiga toxin-producing Escherichia coli, their ruminant hosts, and potential on-farm interventions: a review.*
Australian Journal of Agricultural Research **56**: 219–244.
- VIMONT A., DELIGNETTE-MULLER M. und VERNOZY-ROZAND C. (2007) *Supplementation of enrichment broths by novobiocin for detecting Shiga toxin-producing Escherichia coli from food: a controversial use.*
Lett Appl Microbiol **44**: 326–331.
- VIMONT A., VERNOZY-ROZAND C. und DELIGNETTE-MULLER M. (2006) *Isolation of E.coli O157:H7 and non-O157 STEC in different matrices: review of the most commonly used enrichment protocols.*
Lett Appl Microbiol **42**: 102–108.
- VU-KHAC H. und CORNICK N. (2008) *Prevalence and genetic profiles of Shiga toxin-producing Escherichia coli strains isolated from buffaloes, cattle, and goats in central Vietnam.*
Vet Microbiol **126**: 356–363.

- WAHLSTRÖM H., TYSEN E., OLSSON ENGVALL E., BRÄNDSTRÖM B., ERIKSSON E., MÖRNER T. und VAGSHOLM I. (2003) *Survey of Campylobacter species, VTEC O157 and Salmonella species in Swedish wildlife.*
Vet Rec **153**: 74–80.
- WALLACE J., CHEASTY T. und JONES K. (1997) *Isolation of Vero cytotoxin-producing Escherichia coli O157 from wild birds.*
J Appl Microbiol **82**: 399–404.
- WANG G., CLARK C. und RODGERS F. (2002) *Detection in Escherichia coli of the Genes Encoding the Major Virulence Factors, the Genes Defining the O157:H7 Serotype, and Components of the Type 2 Shiga Toxin Family by Multiplex PCR.*
J Clin Microbiol **40**: 3613–3619.
- WANG H., PATON J. und PATON A. (2007) *Pathologic changes in mice induced by subtilase cytotoxin, a potent new Escherichia coli AB₅ toxin that targets the endoplasmic reticulum.*
J Infect Dis **196**: 1093–1101.
- WEINSTEIN D., JACKSON M., SAMUEL J., HOLMES R. und O'BRIEN A. (1988) *Cloning and sequencing of a shiga-like toxin typ II variant from an Escherichia coli strain responsible for Edema Disease of swine.*
J Bact **170**: 4223.
- WERBER D., BEUTIN L., PICHNER R., STARK K. und FRUTH A. (2008) *Shiga Toxin-producing Escherichia coli Serogroups in Food and Patients, Germany.*
Emerg Infect Dis **14**: 1803–1806.
- WERBER D., FRUTH A., LIESEGANG A., LITTMANN M., BUCHHOLZ U., PRAGER R., KARCH H., BREUER T., TSCHÄPE H. und AMMON A. (2002) *A Multistate Outbreak of Shiga Toxin-Producing Escherichia coli O26:H11 Infections in Germany, Detected by Molecular Subtyping Surveillance.*
J Infect Dis **186**: 419–422.
- WHO (2010) *Enterohaemorrhagic Escherichia coli (EHEC).*
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs125/en/>. Zugriff am: 21.07.10.

- WIELER L. (2009) *Mikrobiologie II Was lernen wir aus der molekularen Epidemiologie von Escherichia coli.*
BfR-Symposium 47–50.
- WIELER L., SOBJINSKI G., SCHLAPP T., FAILING K., WEISS R. und MENGE C. (2007) *Longitudinal prevalence study of diarrheagenic Escherichia coli in dairy calves.*
Berl Münch Tierärztl Wochenschr **120**: 296–306.
- WONG C., JELACIC S., HABEEB R., WATKINS S. und TARR P. (2000) *The risk of the hemolytic-uremic syndrome after antibiotic treatment of Escherichia coli O157:H7 infections.*
N Engl J Med **342**: 1930–1936.
- WU Y., HINENOYA A., TAGUCHI T., NAGITA A., SHIMA K., TSUKAMOTO T., SUGIMOTO N., ASAKURA M. und YAMASAKI S. (2010) *Distribution of virulence genes related to adhesins and toxins in Shiga toxin-producing Escherichia coli strains isolated from healthy cattle and diarrheal patients in Japan.*
JVMS 1–21.
- YOSHITOMI K., JINNEMAN K. und WEAGANT S. (2006) *Detection of Shiga toxin genes stx1, stx2, and the C93 uidA mutation of E. coli O157:H7/H- using SYBR Green I in a real-time multiplex PCR.*
Mol Cell Probes **20**: 31–41.
- ZHANG W., BIELASZEWSKA M., FRIEDRICH A., KUCZIUS T. und KARCH H. (2005) *Transcriptional analysis of genes encoding Shiga toxin 2 and its variants in Escherichia coli.*
Appl Environ Microbiol **71**: 558–561.
- ZHANG W., BIELASZEWSKA M., KUCZIUS T. und KARCH H. (2002a) *Identification, characterisation, and distribution of a Shiga toxin 1 gene variant stx1c in Escherichia coli strains isolated from humans.*
J Clin Microbiol **40**: 1441–1446.
- ZHANG W., KOEHLER B., OSWALD E., BEUTIN L., KARCH H., MORABITO S., CAPRIOLI A., SUERBAUM S. und SCHMIDT H. (2002b) *Genetic Diversity of Intimin*

Genes of Attaching and Effacing Escherichia coli Strains.
J Clin Microbiol **40**: 4486–4492.

Gesetzesverzeichnis

Verordnung (EG) Nr. 178/2002

zur Festlegung der allgemeinen Grundsätze und Anforderungen des Lebensmittelrechts, zur Errichtung der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit und zur Festlegung von Verfahren zur Lebensmittelsicherheit

Verordnung (EG) Nr. 852/2004

über Lebensmittelhygiene

Verordnung (EG) Nr. 853/2004

mit spezifischen Hygienevorschriften für Lebensmittel tierischen Ursprungs

Verordnung (EG) Nr. 854/2004

mit besonderen Verfahrensvorschriften für die amtliche Überwachung von zum menschlichen Verzehr bestimmten Erzeugnissen tierischen Ursprungs

Verordnung (EG) Nr. 882/2002 über amtliche Kontrollen zur Überprüfung der Einhaltung des Lebensmittel- und Futtermittelrechts sowie der Bestimmungen über Tiergesundheit und Tierschutz

Infektionsschutzgesetz (IfSG) (20.7.2000)

Gesetz zur Verhütung und Bekämpfung von Infektionskrankheiten beim Menschen

Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch (LFGB) (1.9.2005)

Richtlinie 2003/99/EG

zur Überwachung von Zoonosen und Zoonoseerregern und zur Änderung der Entscheidung 90/424/EWG des Rates sowie zur Aufhebung der Richtlinie 92/117/EWG des Rates

Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB L 00.00-68

Untersuchung von Lebensmitteln

Horizontales Verfahren für den Nachweis von *Escherichia coli* O157 in Lebensmitteln

Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB L 06.00-44

Untersuchung von Lebensmitteln

Nachweis von *Escherichia coli* O157 in Fleisch und Fleischerzeugnissen

Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB L 07.00-54

Untersuchung von Lebensmitteln

Nachweis von *Escherichia coli* O157 in Fleischerzeugnissen

Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB L 08.00-47

Untersuchung von Lebensmitteln

Nachweis von *Escherichia coli* O157 in Wurstwaren

Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB L 00.00-92

Untersuchung von Lebensmitteln

Nachweis von Verotoxin-bildenden *Escherichia coli*-Stämmen (VTEC) in Lebensmitteln tierischer Herkunft

Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB L 07.18-1

Untersuchung von Lebensmitteln

Nachweis, Isolierung und Charakterisierung Verotoxin-bildender *Escherichia coli*-Stämmen (VTEC) in Hackfleisch mittels PCR und DNA-Hybridisierungstechnik

Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB L 00.00-52

Untersuchung von Lebensmitteln

Allgemeine verfahrensspezifische Anforderungen zum Nachweis von Salmonellen in Lebensmitteln mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Danksagung

Herrn Univ.Prof. Dr. Dr. h.c. Erwin Märtlbauer danke ich sehr herzlich für die Bereitstellung des Dissertationsthemas, die freundliche Aufnahme am Lehrstuhl und die Durchsicht der Arbeit.

Frau Dr. Elisabeth Stüber gilt mein besonderer Dank für die erstklassige Betreuung, sowie für die unermüdliche und stetige Unterstützung während den Untersuchungen und bei der Anfertigung meiner Dissertation.

Ebenso bedanke ich mich bei Frau PhD Dr. Maria Fredriksson-Ahomaa für die stets engagierte und umgehende Hilfe sowohl bei Problemen, als auch bei der Korrektur der Entwürfe.

Bei den Mitarbeitern des Lehrstuhls bedanke ich mich besonders für die Unterstützung im Labor und die herzliche, motivierende Arbeitsatmosphäre.

Herrn Dr. Heurich und seinem Team danke ich herzlich für die Bereitstellung der Proben und große Hilfsbereitschaft.

Herrn Dr. Beutin und den Mitarbeitern des BfR Berlin, danke ich für die Serotypisierung der Isolate.

Ebenso bedanke ich mich bei Julia Albers, die stets bei Programmierungs- und Formatierungskomplikationen meiner Dissertation zur Verfügung stand und Lösungen parat hatte.

Ein großer Dank gilt meiner Freundin Birgit Hofmann für das Korrekturlesen dieser Arbeit und für ihre moralische Unterstützung. Bei allen meinen Freunden bedanke ich mich für die motivierenden Gespräche und tatkräftige Hilfe.

Ganz besonders bedanke ich mich bei meinen Eltern, die mir dieses Studium ermöglicht haben und immer für mich da sind. Meiner ganzen Familie danke ich sehr für das Korrekturlesen und die moralische Unterstützung. Insbesondere danke ich meiner Schwester Carola Eggert für die kreativen Ideen und meiner Schwester Evelyn Eggert für die Hilfe bei den statistischen Auswertungen.

Meinem Freund Mohamed Abo El-Fotouh bin ich unendlich dankbar für die fachliche Hilfestellung, die konstruktiven Diskussionen, sowie für die liebevollen Aufmunterungen und das aufgebrachte Verständnis.