

**UNTERSUCHUNGEN ZUR ÜBERLEBENSFÄHIGKEIT VON
ENTEROHÄMORRHAGISCHEN ESCHERICHIA COLI (EHEC) IN DER
UMWELT SOWIE ZUM VORKOMMEN IN KOTPROBEN VON
WASSERVÖGELN**

Christian Roth

**Institut für Toxikologie und Umwelthygiene
der Technischen Universität München
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. M. Göttlicher)**

**Untersuchungen zur Überlebensfähigkeit von enterohämorrhagischen
Escherichia coli (EHEC) in der Umwelt sowie zum Vorkommen in
Kotproben von Wasservögeln**

Christian Roth

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der
Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. H. Chr. Huber
2. Univ.-Prof. Dr. G. A. Häcker

Die Dissertation wurde am 24.03.2004 bei der Technischen Universität
München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin
am 22.07.2004 angenommen.

MEINER EHEFRAU

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	7
1.1. ESCHERICHIA COLI-PATHOVARE	7
1.2. EHEC-SEROVARE	7
1.3. EHEC-PATHOGENITÄTSFAKTOREN	8
1.4. ÜBERTRAGUNGSWEGE	10
1.5. EHEC-ASSOZIIERTE INFESTIONEN	11
2. ZIELSETZUNG	15
3. MATERIAL UND METHODEN	16
3.1. PRÜFSTÄMME	16
3.2. NÄHRMEDIEN UND REAGENZIEN	17
3.3. KEIMZAHLBESTIMMUNG	19
3.4. BIOCHEMISCHE CHARAKTERISIERUNG	22
3.5. DURCHFÜHRUNG ELISA (ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY)	26
3.6. DURCHFÜHRUNG PCR (POLYMERASE CHAIN REAKTION)	27
3.7. E. COLI AN ZAHNSTOCHER	30
3.7.1. Präparation	30
3.7.2. Untersuchungsschema	31
3.8. E. COLI AUF OBJEKTTRÄGER	32
3.8.1. Präparation	32
3.8.2. Untersuchungsschema	32
3.9. E. COLI IN SPORENERDE	33
3.9.1. Präparation	33
3.9.2. Untersuchungsschema	33
3.10. E. COLI IN OBERFLÄCHENWASSER	34
3.10.1. Gewinnung	34
3.10.2. Präparation	34
3.10.3. Untersuchungsschema	35
3.11. UNTERSUCHUNG VON VOGELKOTPROBEN	36
3.11.1. Gewinnung	36
3.11.2. Untersuchungsschema	37
4. ERGEBNISSE	38
4.1. ÜBERLEBENSDAUER VON APATHOGENEN UND SHIGATOXIN-BILDENDEN E. COLI-STÄMMEN IN VERSCHIEDENEN UMWELTPROBEN	38
4.1.1. Tenazität der Prüfstämme auf Holz	38
4.1.2. Tenazität der Prüfstämme auf Glas	40
4.1.3. Tenazität der Prüfstämme in sterilisierter Sporenerde	41
4.1.4. Tenazität der Prüfstämme in Oberflächenwasser	42
4.1.5. Tenazität der Prüfstämme in sterilisiertem Oberflächenwasser	43
4.1.6. Zusammenfassung der Ergebnisse der Untersuchungen zur Tenazität	44
4.2. UNTERSUCHUNG VON VOGELKOTPROBEN AUF SHIGATOXIN-BILDENDE ESCHERICHIA COLI (STEC) ...	47
5. DISKUSSION	48
5.1. ZUR METHODIK	48
5.2. TENAZITÄT DER EHEC	50
5.2.1. Auf festen Gegenständen	50
5.2.2. In Erde	51
5.2.3. In Wasser	52
5.3. NACHWEIS IN VOGELKOTPROBEN	55
5.4. WICHTIGSTE EHEC-INFESTIONSQUELLEN	57
6. ZUSAMMENFASSUNG	61
7. LITERATURVERZEICHNIS	62
8. ANHANG	68
9. LEBENS LAUF	78

Verzeichnis der Abkürzungen

A		F	
Abb.	Abbildung	f, ff	folgende
Abs.	Absatz	Fa.	Firma
Absch.	Abschnitt	FSIS	Food Safety and Inspection Service
al.	der andere (lat.= alter, -era, -erum)		
Amp., Ampli.	Genamplifikation		
ATCC	American Type Culture Collection	G	
		g	Gramm
		GB ₃	Globotriacylceramid
B		ggf.	gegebenenfalls
BGBI	Bundesgesetzblatt	Graph.	Graphik
		H	
C		h	Stunde (lat.= h ora)
°C	Grad Celsius	Hg., Hrsg.	Herausgeber
		HUS	hämolytisch - urämisches Syndrom
D		I	
dest.	destilliert (lat.= destillata)	IfSG	Infektionsschutzgesetz
DEV	Deutsche Einheitsverfahren für die Wasser-, Abwasser und Schlammuntersuchung	IgG	Immunglobulin G
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.= a cid)	K	
		KBE	Kolonie-bildende Einheit
		Konz.	Konzentration
E		L	
E. coli	Escherichia coli	l	Liter
EG	Europäische Gemeinschaft	LEE	Locus of Enterocyte Effacement
EHEC	Enterohämorrhagische Escherichia coli	log.	Logarithmus
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay	LPS	Lipopolysaccharid
EPEC	Enteropathogene Escherichia coli	M	
EspP	Serin-Protease-Gen	M	Kurzzeichen für chem. Massenzahl, Molarlösung
ETEC	Enterotoxische Escherichia coli		

m	Meter	T	
max.	maximal	Tab.	Tabelle
med.	medizinisch	Temp.	Temperatur
mg	Milligramm	TTP	thrombotisch-thrombozyto- penische Purpura
min., Min.	Minute	TrinkwV	Trinkwasserverordnung
ml	Milliliter	TRIS	Tris (hydroxymethyl)- aminomethan
µl	Mikroliter		
mm	Millimeter		
mol	molar		
MPN	Most Probable Number	U	
MUG	4-Methylumbelliferyl-β- D-glucuronid	u.a.	unter anderem und andere und anderes
N		UV	Ultraviolett
n.	nach		
O		V	
O D	Optische Dichte	v.a.	vor allem
O NT	O-Serovar, nicht typisiert	v.H.	von Hundert
		VT	Verotoxin
		VTEC	Verotoxin-bildende E. coli
P		W	
<i>p</i>	Plasmid	WHO	Weltgesundheitsorganisation (engl.= World Health Organis.)
p	Piko		
PCR	Polymerase Chain Reaction		
R		Z	
RKI	Robert Koch Institut	z.T.	zum Teil
RTX	Repeats In Toxin		
S			
s.	siehe		
s, sec., Sek.	Sekunde		
SLT	Shiga-Like Toxin		
SMAC	Sorbitol-MacConkey-Agar		
sp.	Spezies		
ssp.	Subspezies		
Std.	Stunde		
STEC	Shigatoxin-bildende E. coli		
Stx	Shigatoxin		
<i>stx</i>	Shigatoxin-Gen		
s.u.	siehe unten		

1. Einleitung

Bakterien der Spezies *Escherichia coli* sind gramnegative, unbewegliche oder durch peritriche Begeißelung bewegliche, nichtsporenbildende, Cytochromoxydase-negative Stäbchenbakterien, die den Zucker Laktose aerob und anaerob abbauen können und zur Familie der Enterobacteriaceae gehören.

Bei der Gruppe der *coliformen* Enterobacteriaceae, zu der auch *E. coli* zählt, handelt es sich um bereits viele unterschiedliche Bakterienarten aus der Gattung *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter* u.a.. Als gemeinsames Merkmal zur biochemischen Charakterisierung müssen sie die Fähigkeit der Laktosevergärung zu Säure und Gas innerhalb von 44 ± 4 h bei 36°C besitzen und Cytochromoxidase-negativ sein [Schindler1996, Seite 36f].

1.1. Escherichia coli-Pathovare

Escherichia coli kommen in der Darmflora von Mensch und Tier vor, wo sie für ihre Wirte von besonderer physiologischer Bedeutung zur Erhaltung des mikro-ökologischen Gleichgewichts des Darms sind. Diese „normalen“ *E. coli*-Bakterien haben auch Stämme mit pathogenen Eigenschaften für Mensch und Tier hervorgebracht. Sie werden als *E. coli-Pathovare* bezeichnet. Von den bisher bekannten mindestens 9 Pathovaren sollen speziell die *enterohämorrhagischen E. coli (EHEC)* kurz charakterisiert werden. Diese wurden erstmals 1977 beschrieben und zu Beginn der 90er Jahre durch regelrechte Epidemien in England, Japan und den U.S.A. erneut Gegenstand wissenschaftlicher Forschung. Die Bezeichnung enterohämorrhagische *E. coli* wurde bei der Beschreibung dieser Erreger gewählt, weil ihre Isolation aus Stuhlproben von Menschen gelang, die an hämorrhagischen Durchfallerkrankungen litten. Das klinische Erscheinungsbild war zunächst ein wichtiges Kriterium zur Unterscheidung zwischen EHEC und den im Darm residenten apathogenen *E. coli*. Weitere Untersuchungen zur Charakterisierung dieser Stämme zeigten, daß EHEC über eine Reihe qualifizierender Pathogenitätsfaktoren verfügen, die bei disponierten Patienten für das Auftreten eines breiten Spektrums von Durchfallerkrankungen verantwortlich sind. Die Schwere des Infektionsverlaufs reicht von asymptomatischen Infektionen über wässrige bis blutige Durchfälle bis zu dem lebensbedrohlichen postinfektiösen hämolytisch-urämisches-Syndrom (HUS) [Baljer 1999, Seite 340].

1.2. EHEC-Serovare

Als evolutionär junge Keime haben sich EHEC-Bakterien erst vor wenigen Jahren aus apathogenen *E. coli*-Stämmen durch horizontalen Gentransfer gebildet. Unterschiede in der Antigenstruktur führten zur Einteilung in verschiedene *EHEC-Serovare*. Trotz ihrer kurzen Entstehungszeit gibt es bereits ein breites Spektrum an EHEC-Serovaren, von denen in Deutschland klinisch und epidemiologisch anfänglich vor allem der EHEC-Serovar O157:H7 von Interesse war. Mittlerweile hat sich jedoch gezeigt, daß für den weltweit steigenden Anteil an EHEC Infektionen auch viele andere Serovare verantwortlich sind. Neben dem EHEC O157 (O157:H7, O157:H⁻), werden z.B. die Serovare O26 (O26:H11, O26:H⁻), O111 (O111:H2, O111:H⁻), O103 (O103:H2, O103:H⁻) und seit 1997 O145 (O145:H28, O145:H⁻) häufig nachgewiesen.

1.3. EHEC-Pathogenitätsfaktoren

Als obligates charakteristisches Pathogenitätsmerkmal besitzen alle EHEC-Stämme die Fähigkeit zur Bildung bestimmter Toxine: **Shigatoxin 1** (Stx 1) und/oder 2 (Stx 2) (Synonyme: Verotoxin = VT oder Shiga-like Toxin = SLT). Der Name des Toxins leitet sich von dem Namen des Bakteriums *Shigella dysenteriae Typ 1* ab, das in der Lage ist ein dem Stx identisches Toxin zu bilden. Das Vorkommen von Shigatoxinen ist nicht auf *Shigella dysenteriae Typ I* und *Escherichia coli* beschränkt, Stx-Gene wurden auch bei *Citrobacter freundii*- [Schmidt 1993, Seite 534] und *Enterobacter cloacae*- [Paton 1996, Seite 463] Stämmen gefunden, die Durchfallerkrankungen und HUS verursachen [Allerberger 1997, Seite 671]. Aufgrund der bei allen EHEC vorhandener Fähigkeit der Stx-Bildung werden sie auch als *Shigatoxin-bildende* bzw. *Verotoxin-bildende E.coli* (*STEC* bzw. *VTEC*) bezeichnet. Jeder STEC/VTEC ist als potenzieller EHEC anzusehen [RKI 2003, http://www.rki.de/INFEKT/INF_A-Z/RATGEBER/RAT6.HTM].

Stx 1 und Stx 2 sind in ihrem Aufbau und ihrer Wirkung einander sehr ähnlich.

Shigatoxine sind die wichtigsten bekannten Virulenzfaktoren der EHEC-Stämme, sie wirken zytotoxisch, enterotoxisch und neurotoxisch. In ihrer Eigenschaft als Glykosidasen sind sie in der Lage einen definierten Rest von der 60S ribosomalen Untereinheit abzuspalten. Dadurch hemmen sie die Proteinbiosynthese, und führen so *indirekt* zum Absterben der Zielzellen. Neben dieser enzymatischen Eigenschaft der A-Untereinheit verfügen Shigatoxine über fünf B-Untereinheiten, die bevorzugt an Glykolipidrezeptoren (z.B. GB₃=Globotriaosylceramid) auf verschiedenen humanen Zellen binden. Haben Shigatoxine erst die Blutbahn erreicht, binden sie nicht nur an kapillare Endothelzellen sondern auch an Tubuluszellen der Nieren, was zu schnellem Zelltod und sogar zu Nierenversagen führen kann. Die kodierenden Gene für die Shigatoxine konnten auf *lambdoiden Prophagen*, die in das Chromosom integriert sind, lokalisiert werden (*siehe Abbildung 1*). Sie können mittels PCR-Analyse nachgewiesen werden. Neben den beiden bekannten Shigatoxinen Stx1 und Stx2 entdeckte man weitere Subtypen, deren Gene ebenfalls als ursprüngliche Prophagen-Gene in das bakterielle Chromosom integriert wurden. Sie werden aufgrund ihrer strukturellen Verwandtschaft mit dem Shigatoxin 2 entsprechend als Stx 2c bis derzeit Stx 2f bezeichnet [Schmidt 2000, Seite 1208].

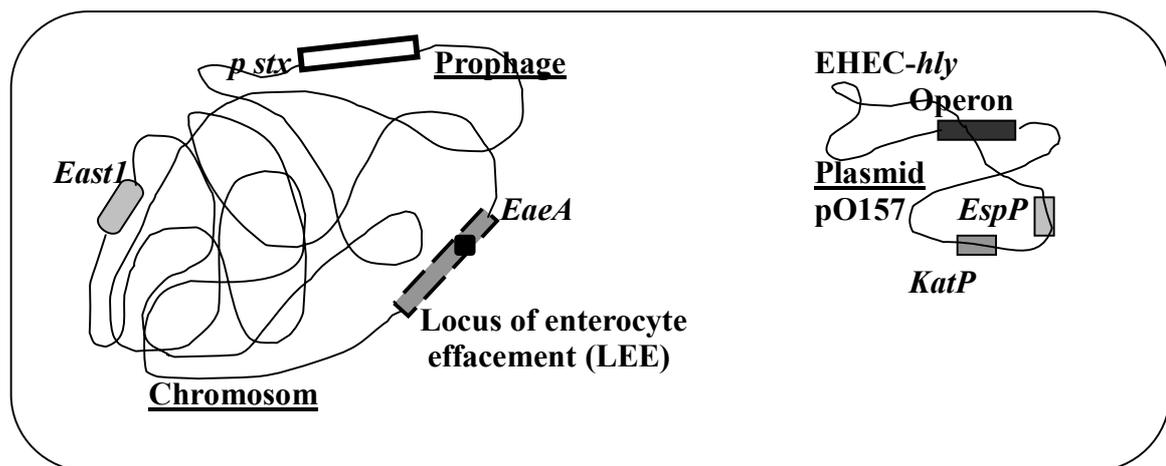


Abbildung 1

Modifizierte Darstellung der „typischen“ Virulenzfaktoren von enterohämorrhagischen *Escherichia coli* am Beispiel des Serovars O157 [n. Allerberger 1997, Seite 671]

Neben der Shigatoxinbildung verfügen die meisten von Patienten isolierten EHEC-Stämme noch über weitere „typische“ Virulenzfaktoren. Typisch ist das Vorhandensein einer Pathogenitätsinsel, eines sog. „*Locus of Enterocyte Effacement*“ (*LEE*), die eine Gruppe von chromosomal kodierten Genen umfasst, welche EHEC zur Bindung an Darmepithelien befähigt und zur Zerstörung des epithelialen Bürstensaumes führt. Dazu gehört das für *Intimin* kodierende *EaeA*-Gen [McDaniel 1995, Seite 1664]. *Intimin* ist ein an der Außenmembran der Bakterienzelle lokalisiertes Protein, dem eine wichtige Funktion bei der Anheftung an die Darmepithelzellen zukommt. Die Adhärenz der EHEC an die Epithelzellen führt zunächst zur Zerstörung des Bürstensaums. Danach bilden die Enterozyten an der Anheftungsstelle eine becherförmige Ausstülpung, an der sich die Bakterien festhalten können. Bei dem Vorgang der Kolonisation des Darmes werden in der Literatur Ähnlichkeiten bei den ebenfalls enteropathogenen Shigellen beschrieben. Zu diesen gehören die geringe Infektionsdosis und die Vorliebe zur Adhärenz an immunkompetente Zellen der Peyer'schen Plaques des Dünndarms. Beide Bakterienspezies zeichnen sich durch eine hohe Säurebeständigkeit aus, die ihnen die Magenpassage ermöglicht, beide siedeln sich bevorzugt in der Region der Ileocoekklappe an, in der Peyer'sche Plaques gehäuft vorkommen und die Darmmotilität abnimmt [Phillips 2000, Seite 377f].

Außerdem kodiert ein durch Gentransfer erworbenes *Plasmid* für eine Reihe von Virulenzfaktoren, die ebenfalls in Abbildung 1 dargestellt sind. Hierzu zählen das *EHEC-Hämolyysin* (*EHEC-hly*), eine *Katalase-Peroxidase* (*KatP*) sowie eine *Serin-Protease* (*EspP*). Das *EHEC-Hämolyysin* befähigt EHEC-Stämme zur Bildung von Hämolysehöfen auf Blutagarplatten. Das für dieses Phänomen verantwortliche Protein gehört zur Familie der *RTX* (*Repeats in Toxin*) Exoproteine, die in ihrer Struktur wiederholt charakteristische Glycinsequenzen aufweisen. EHEC-Hämolyysin ist ein porenbildendes Zytotoxin, seine Gensequenz, das sogenannte *EHEC-Hämolyysin Operon*, besteht aus den vier aufeinanderfolgenden Genen *EHEC-hlyC*, *-hlyA*, *-hlyB*, *-hlyD*. Das Virulenzplasmid, bei dem Serovar O157 als *pO157* bezeichnet, kodiert zwei weitere potente Virulenzfaktoren: eine *bifunktionelle Katalase-Peroxidase* (*KatP*), die zusätzlich zu den beiden chromosomalen Katalase-Peroxidase-Enzymen besteht, und eine *Serin-Protease* (*EspP*), die sich an den menschlichen Gerinnungsfaktor V anhängen kann [Allerberger 1997, Seite 671].

Ein weiterer weltweit verbreiteter Pathogenitätsfaktor ist das *hitzebeständige Enterotoxin 1* (*EAST 1*). Auch dessen kodierendes Gen stammt ursprünglich von Prophagen ab. Mutationen des *EAST 1*-Gens führten vermutlich 1996 zu dem großen EHEC-Ausbruch in Japan. Strukturelle Untersuchungen des kodierenden Gens zeigten, daß es sich um eine Familie ähnlicher Gensequenzen handelt, die neben EHEC auch in *enteroaggregativen E. coli* (*EAggEC*), in *enteropathogenen* (*EPEC*) und *enterotoxischen* (*ETEC*) *E. coli* und nicht zuletzt in *Yersinia pestis* vorkommen. Das *EAST 1*-Gen und die *EAST 1* ähnliche Sequenz von *Yersinia pestis* sind theoretisch durch Substitution eines einzigen Basenpaares austauschbar, was auf ihre Abstammung von einer gemeinsamen Vorläufersequenz hindeutet. Dieser Zusammenhang zeigt die evolutionären Möglichkeiten des Gentransfers zwischen unterschiedlichen Bakterienspezies, und ist wegweisend für das Verständnis der Entwicklung von Pathogenitätsfaktoren [Yamamoto 2000, Seite 22].

Weitere sezernierte Virulenzproteine, deren genauere Funktion erst im Einzelnen geklärt werden muß, sind: *EspS*, *EspA*, *EspB* und *EspD*. Vor allem *EspA* und *EspB* spielen bei der primären Adhärenz von EHEC an die Darmmucosa des Menschen eine wichtige Rolle. *EspA* ist ein vom Bakterium sezerniertes Protein, das zur Bildung von Haftfilamenten an der Oberfläche von EHEC führt, während *EspB* in die Zellmembran und das Zytoplasma der Wirtszelle eindringen kann.

1.4. Übertragungswege

In erster Linie gelten in der Landwirtschaft genutzte Tiere wie vor allem Wiederkäuer (Rinder u. Schafe) als Reservoir für EHEC-Bakterien. Mit Fäkalien dieser Tiere kontaminierte pflanzliche Nahrungsmittel oder Oberflächenwasser können als Infektionsquelle dienen. Fäkal kontaminierte tierische Nahrungsmittel wie Fleisch- und Milchprodukte kommen ebenfalls als Quellen in Betracht; daneben spielt auch die fäkal-orale Schmierinfektion von Mensch zu Mensch oder von Tier zu Mensch eine bedeutsame Rolle.

Tierreservoir

Spätestens seit den Krankheitsausbrüchen 1982 in den USA, bei denen Rindfleisch als Infektionsquelle identifiziert wurde, ergaben zahlreiche Untersuchungen, daß EHEC im Gastrointestinalbereich von Rindern unterschiedlichen Alters vorkommen. Laut den Ergebnissen von Baljer et al. konnten Antikörper gegen Shigatoxine im Kolostrum von 84-90% der untersuchten Kühe in Bayern gefunden werden [Baljer 1995, Seite 131]. Dabei scheint der Erreger für ausgewachsene Tiere *apathogen* zu sein [Verweyen 1997, Seite 199].

Auch an Schafbeständen wurden Untersuchungen zur Prävalenz von EHEC durchgeführt [Beutin 1993, Seite 2483], die eine geringere Durchseuchung bei Schafen im Vergleich zu den Rindern ergaben. Allgemein werden Wiederkäuer, besonders Rinder, Schafe und Ziegen, aber auch Rehe und Hirsche als wichtigstes Reservoir für EHEC angesehen.

Schließlich zeigten Untersuchungen an nicht-bovinen Tierspezies wie Haustieren, Geflügel und Vögeln (Raben und Tauben) in häuslicher Umgebung eine Prävalenz des Erregers von 0,0 bis 5,2% [Verweyen 1997, Seite 200]. Eine Erkrankungswelle an HUS in Norditalien wurde auf den Kontakt mit infizierten Eierschalen zurückgeführt. Eine Übertragung durch Tierspezies mit niedriger EHEC-Durchseuchung darf daher nicht außer Betracht gelassen werden, sondern erfordert genauere Untersuchungen.

Infektionsketten können also von verschiedensten Tierreservoirien ausgehen. Eine in diesem Zusammenhang bislang wenig erforschte Tiergruppe, die in dieser Arbeit untersucht werden soll, sind die Vögel insbesondere die Wasservögel. Zur Prävalenz von EHEC in diesen Tierbeständen gibt es keine systematischen Untersuchungen.

Nahrungsmitteln

Bei der Übertragung einer EHEC-Infektion durch Nahrungsmittel ist in den USA bis heute das Rinderhackfleisch am häufigsten beschrieben worden [Bell 1994, Seite 1349; CDC 1992-93, Seite 258f; CDC 1993, Seite 213]. Ein Grund für das Überleben der Keime in Fleisch ist unzureichendes Erhitzen durch den Endverbraucher [Riley 1983, Seite 681]. Weitere Nahrungsmittel wie Milch, insbesondere Rohmilch, Salami und Mettwurst sind als Infektionsquelle nachgewiesen worden, aber auch Gemüse und unpasteurisierte Apfelsaft konnten mit Erkrankungsfällen in Zusammenhang gebracht werden. Die Verunreinigung einiger Nahrungsmittel während der Lagerung oder des Vertriebes ist ebenfalls vorstellbar.

Badewasser und Trinkwasser

Eine weitere bekannte Infektionsquelle für EHEC O157 ist Trink- und Oberflächenwasser (z.B. Badeseen). Seit 1986 kam es gehäuft zu Krankheitsausbrüchen durch O157 in Trinkwasser, Quellwasser sowie in Badeseen. Erstmals konnte EHEC O157 1986 aus Oberflächenwasser isoliert werden [McGowan 1989, Seite 967]. Im Sommer 1991 konnte die Infektion von 21 Kindern mit O157 in Zusammenhang mit dem Schwimmen in einem fäkal kontaminierten Badensee in Oregon gebracht werden [Keene 1994, Seite 579f].

Ein großer wasserbedingter Ausbruch fand während des Winters 1991 in Cabool, Missouri, statt, als Einwohner kontaminiertes Trinkwasser aus einer nicht desinfizierten Grundwasserquelle tranken [Swerdlow 1992, Seite 812]. Der Ausbruch führte zu 243 dokumentierten Fällen von Diarrhoe, davon 32 Krankenhauseinweisungen mit 4 Todesfällen. Der größte Wasser-assoziierte Ausbruch durch E.coli O157:NM fand in Südafrika statt [Isaacson 1993, Seite 961]. Mehr als zweitausend Krankheitsfälle wurden mit diesem Ausbruch in Zusammenhang gebracht.

Weitere Berichte von E.coli-Infektionen über kontaminiertes Trinkwasser fanden sich auch in Schottland [Dev 1991, Seite 1412] und Japan [Akashi 1994, Seite 650f].

Im Rahmen der hygienisch-mikrobiologischen Wasseruntersuchung werden E.coli als Indikatorkeime für das Vorliegen von Verunreinigungen mit Fäkalien erfasst. Die Eigenschaften zur Erfassung von Verunreinigungen mit Warmblüterfäkalien sind in der Trinkwasserverordnung festgelegt worden. Trinkwasser und Schwimmbeckenwasser müssen in 100 ml frei sein von E.coli (100 %-Grenzwert) und werden mittels Flüssiganreicherung qualitativ nach der Trinkwasserverordnung untersucht [BGBI I Nr. 24, 2001, Seite 980].

Die Überlebenszeit von EHEC in Oberflächenwasser ist bei epidemiologischen Überlegungen von Bedeutung, und soll in dieser Arbeit bestimmt werden.

Übertragung von Mensch zu Mensch

Die Übertragung des Erregers von Mensch zu Mensch tritt vor allem bei engem Kontakt in Gemeinschaftseinrichtungen (Kindergärten und Altenheime) auf. Besonders in Kindergärten wurden Infektionsketten von Mensch zu Mensch nachgewiesen, wie eine Untersuchung in Minnesota 1988 ergab [Belongia 1993, Seite 883f]. Die potentiellen Überträger können dabei symptomlos sein. Eine Weitergabe der Infektion könnte durch kontaminierte Gebrauchsgegenstände möglich sein. Die Überlebenszeit von EHEC auf verschiedenen Oberflächen soll daher genauer untersucht werden und ist ein Teilbereich dieser Arbeit.

1.5. EHEC-assoziierte Infektionen

Klinik

Die meisten EHEC-Infektionen verlaufen klinisch inapparent und können deshalb vielfach unerkannt bleiben. Nach einer Inkubationszeit von 1-8 Tagen beginnt die Erkrankung als Gastroenteritis mit wässrigen Durchfällen, die im Verlauf zunehmend wässrig-blutig werden und ein der Ruhr sehr ähnliches Erkrankungsbild aufweisen können.

Häufige Begleitsymptome sind Übelkeit, Erbrechen und gastrointestinale Schmerzen bis zu Koliken. Bei 10-20 % der Erkrankten geht die Gastroenteritis in eine schwere Verlaufsform mit hämorrhagischer Colitis, blutigem Stuhl und häufig mit Fieber über. Lebensbedrohliche Krankheitsbilder nach EHEC-Infektionen lassen sich öfters bei abwehrgeschwächten Personen, alten Menschen, Kleinkindern und Säuglingen beobachten. In 5-10% der Erkrankungen entwickeln sich lebensbedrohliche postinfektiöse Syndrome wie das hämolytisch-urämischen-Syndroms (HUS) oder die thrombotisch-thrombozytopenischen Purpura (TTP). Diese Komplikationen treten unabhängig von der Schwere des vorangegangenen Verlaufes auf. Die Symptomatik hängt vom Ort der Primärschäden durch die Toxine ab. Die Letalität bei HUS und TTP ist besonders im Kindesalter hoch (1-5 %), oft kommt es zum akuten Nierenversagen mit Dialysepflicht, seltener zum irreversiblen Nierenfunktionsverlust mit chronischer Dialyse [RKI 2003, http://www.rki.de/INFEKT/INF_A-Z/RATGEBER/RAT6.HTM]. Der klinische Verlauf der manifesten Erkrankung ist in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1	
Klinik der EHEC-assoziierten Infektionen beim Menschen [n. Baljer 1999, Seite 340]	
Inkubationszeit	- meist 1-3 Tage, aber auch bis zu 8 Tagen
1. Intestinale Phase	<ul style="list-style-type: none"> - gastrointestinale Schmerzen bis zu Koliken - Erbrechen besonders bei Kindern - in ca.80 % der Fälle wässrige Durchfälle (1-2 Tage), selten Fieber - in 10-20 % der Fälle hämorrhagische Colitis mit blutigen Durchfällen, häufig Fieber - meist Abklingen der Symptome in 1-2 Wochen
2.Extraintestinale Phase (nach 3-12 Tagen in 5-10 % der Fälle) v.a. bei Kindern und älteren Personen	<ul style="list-style-type: none"> - Hämolytisch-Urämisches-Syndrom (HUS) mit Nierenversagen bis zur Anurie, hämolytischer Anämie u. thrombotischer Mikroangiopathie - Thrombotisch-Thrombozytopenische Purpura (TTP) mit Thrombozytopenie, Hautblutungen, hämolytischer Anämie u. neurologischen Veränderungen - toxischer Myokardschaden - cerebrale Krampfanfälle - Multiorganversagen bei Kindern - Letalität in 1 - 5 % der Fälle

Eine Infektionsgefahr besteht über den Zeitraum der EHEC-Ausscheidung mit dem Stuhl, die in der Regel 5-20 Tage dauert. Vereinzelt kommt es nach einer Erkrankung zu einer Dauerausscheidung von EHEC über Wochen bis Monate bei klinisch unauffälligem Bild.

Diagnostik

Da konventionelle mikrobiologische Untersuchungsmethoden keine Unterscheidung zwischen pathogenen EHEC-Stämmen und den apathogenen E.coli ermöglichen, ist der Shigatoxinnachweis das wichtigste diagnostische Merkmal. Das Ziel der Labordiagnostik ist die Erregerisolierung mit Toxinnachweis.

Diagnostisches „Screening“ von klinischen Proben auf Shigatoxine wird gegenwärtig hauptsächlich mit Shigatoxin-ELISA und –PCR durchgeführt. Der kommerziell erhältliche Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) dient dem direkten Toxinnachweis aus einer Flüssiganreicherung oder von einem isolierten Keim. Der ELISA ist ohne Voranreicherung für den direkten Nachweis von Toxinen im Stuhl ungeeignet.

Mit der PCR-Methode läßt sich das Toxingen nachweisen. Nachdem das Probenmaterial auf Nährmedien ausgestrichen und bebrütet wurde, können die gewachsenen Kolonien in der PCR untersucht werden. Die für Shigatoxin sowie weitere Pathogenitätsfaktoren (EHEC-Hämolysin und Intimin) kodierenden Genbereiche lassen sich durch geeignete Primer nachweisen [Kugler 1998, Seite 14]. Diese Screening-Methode ist wesentlich empfindlicher als der ELISA, aber zeit- und kostenaufwendiger. Daher wird in der Routine der ELISA bevorzugt und in verschiedenen kommerziellen Kits angewendet. Als erprobtes diagnostisches Vorgehen bei EHEC-Infektionen wird ein *Stufenplan* (s. Anhang) empfohlen [RKI 2000, Seite 845f]. Bei extraintestinalen Komplikationen (HUS, TTP u.a.) sollten serologische Untersuchungen auf Antikörper (z.B. gegen das O157 LPS, O26 LPS usw.) erfolgen. Im Falle eines Todes nach EHEC-Infektion muß nach Möglichkeit Darmgewebe auf das Vorliegen von EHEC-Genen (*stx1/2*, *EaeA*) untersucht werden.

Therapie

Die Therapie einer EHEC-Infektion sollte ausschließlich symptomatisch erfolgen, da eine Antibiose verlängernd auf die Bakterienausscheidung und sogar stimulierend auf die Toxinbildung wirken kann. Bei Komplikationen wie HUS oder einer TTP ist gegebenenfalls eine entsprechende Therapie mittels forcierter Diurese, Plasmapherese und Hämo- bzw. Peritonealdialyse indiziert [RKI 2003, http://www.rki.de/INFEKT/INF_A-Z/RATGEBER/RAT6.HTM].

Gesetzliche Regelungen (Auszug)

Nach § 6 des Infektionsschutzgesetzes (IfSG) ist der Krankheitsverdacht, die Erkrankung, sowie der Tod an Hämolytisch-Urämisches-Syndrom (HUS) meldepflichtig. Der direkte oder indirekte Nachweis enterohämorrhagischer Stämme von E.coli (EHEC) ist nach § 7 IfSG ebenfalls meldepflichtig, soweit die Nachweise auf eine akute Infektion hinweisen. Eine entsprechende für das Infektionsschutzgesetz erarbeitete *Falldefinition* ist dem Anhang zu entnehmen. Dadurch soll ein möglichst frühes Erfassen der Erkrankungshäufigkeit von EHEC-Infektionen und die Überwachung der durch EHEC bedingten Gastroenteritiden gewährleistet werden.

Laut Information des Robert-Koch-Instituts (RKI) wurden im Jahr 2000 in Deutschland 1.088 EHEC- Meldungen erfaßt (1999: 982), davon erfüllten 548 Meldungen die vom IfSG geforderten Kriterien (1999: 391). Somit wurden 392 Erkrankungen (1999: 294) und 156 Ausscheider (1999: 97) gemeldet [RKI 2003, http://www.rki.de/INFEKT/INF_A-Z/RATGEBER/RAT6.HTM].

Nach § 34 Abs. 1 IfSG dürfen Personen, die an EHEC-Enteritis erkrankt oder dessen verdächtig sind, in Gemeinschaftseinrichtungen für Kinder und Jugendliche keine Lehr-, Erziehungs-, Pflege-, Aufsichts-, oder sonstige Tätigkeiten ausüben, bei denen sie Kontakt zu den dort Betreuten haben. Auch die in der Gemeinschaftseinrichtung Betreuten dürfen die dem Betrieb der Gemeinschaftseinrichtung dienenden Räume nicht besuchen, wenn sie an EHEC-Enteritis erkrankt, oder dessen verdächtig sind.

Nach § 34 Abs. 2 IfSG dürfen (gesunde!) Ausscheider von EHEC nur mit Zustimmung des Gesundheitsamtes und unter Beachtung von Schutzmaßnahmen die Gemeinschaftseinrichtungen betreten.

Nach § 42 Abs. 1 IfSG dürfen Personen, die an einer infektiösen Gastroenteritis erkrankt oder dessen verdächtig sind bzw. EHEC ausscheiden, nicht beim Herstellen, Behandeln oder in Verkehr bringen bestimmter Lebensmittel (s.u.) tätig sein.

Lebensmittel im Sinne § 42 Abs. 1 IfSG sind:

1. Fleisch, Geflügelfleisch und Erzeugnisse daraus
2. Milch und Erzeugnisse auf Milchbasis
3. Fische, Krebse oder Weichtiere und Erzeugnisse daraus
4. Säuglings- und Kleinkindernahrung
5. Eiprodukte
6. Speiseeis- und Speiseeishalberzeugnisse
7. Backwaren mit nicht durchgebackener oder durcherhitzter Füllung oder Auflage
8. Rohkost-, Feinkost-, und Kartoffelsalate, Marinaden, Mayonnaisen, andere emulgierte Soßen, Nahrungshafen

2. Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist es, die Überlebensfähigkeit von enterohämorrhagischen E.coli-Stämmen (EHEC) unter unterschiedlichen Umweltbedingungen (jeweils im Vergleich zur Überlebensfähigkeit von E. coli ohne Shigatoxin-Bildung) zu testen bzw. das Vorkommen von EHEC in Wasservogelbeständen zu erfassen, und dadurch Erkenntnisse über Infektionskreisläufe bzw. Infektionsquellen zu gewinnen. Dieses Ziel soll durch Bearbeitung folgender Untersuchungsprogramme erreicht werden:

A) Untersuchung der Überlebensfähigkeit von Shigatoxin-bildenden E.coli-Stämmen (EHEC) unter unterschiedlichen Umweltbedingungen

1. Versuche zur Überlebensfähigkeit auf sterilisierten Gegenständen mit unterschiedlicher Oberflächenbeschaffenheit:
 - Gebrauchsgegenstand mit glatter Oberfläche (Glas)
 - Gebrauchsgegenstand mit rauher Oberfläche (Holz)

2. Versuche zur Überlebensfähigkeit in sterilisierten Matrices unterschiedlicher Beschaffenheit:
 - flüssiges Medium (Flußwasser)
 - festes Medium (Erde)

3. Versuche zur Überlebensfähigkeit in natürlich belassenem Flußwasser:

B) Untersuchung über das Vorkommen von Shigatoxin-bildenden E.coli-Stämmen (EHEC) in Wasservogelbeständen (Enten, Schwäne, Gänse, Möwen).

3. Material und Methoden

3.1. Prüfstämme

Zur Feststellung der Überlebensfähigkeit von EHEC auf bzw. in verschiedenen Umweltproben wurden vier verschiedene Prüfstämme auf verschiedene Oberflächen und in unterschiedliche Medien geimpft.

Als Prüfstämme dienten drei Keimisolate aus Oberflächenwasser, unter denen sich ein E.coli-„Wildtyp“ (kein EHEC) sowie zwei EHEC-Isolate befanden. Zusätzlich wurde der ATCC-Stamm Nr. 11775 aus Laborbeständen zum Vergleich herangezogen (s. **Tabelle 2**). Die zwei EHEC-Pathovaren unterschieden sich durch die Bildung von Stx 1 bzw. Stx 2 und durch Begeißelung. Die beiden „normalen“ E. coli-Stämme waren nicht zur Bildung von Shigatoxin befähigt.

Tabelle 2

Prüfstämme:

<i>Prüfstämme:</i>	<i>Serotypisierung:</i>
E. coli: Isolat aus Oberflächenwasser	O ₁₁ : H ₄₈ (EHEC /Stx 1) ¹
E. coli: Isolat aus Oberflächenwasser	O _{NT} : H _— (EHEC /Stx 2) ²
E. coli-„Wildtyp“: Isolat aus Oberflächenwasser	— (kein EHEC)
E. coli-Laborstamm: ATCC Nr. 11775	— (kein EHEC)

¹: *begeißelter Pathovar*

²: *unbegeißelter Pathovar*

Von jedem der vier Prüfstämme wurde zunächst eine Keimsuspension (Suspensionsmittel: Peptonwasser; *Punkt 3.2.1.*) erstellt. Dazu wurde zuerst mit einer Öse quer über eine mit Reinkulturen eines der 4 Prüfstämme bewachsene Endo-Agarplatte (*Punkt 3.2.2.*) gestrichen, wodurch eine repräsentative, immer etwa gleich große Anzahl an KBE (koloniebildenden Einheiten) erfaßt wurde. Diese wurde in Reagenzgläser, die mit 10 ml Peptonwasser gefüllt waren, überimpft. Ebenso wurde bei den restlichen drei Stämmen verfahren.

Die beimpften Reagenzgläser wurden darauf im Übernachtansatz (ca. 20 h bei 36 °C) inkubiert, die Keimsuspension zur Trübungsmessung mit einer McFarland-Skala (s. **Anhang: Tabelle 1**) verglichen [Hallmann und Burkhardt 1974, Seite 648], und zusätzlich die Keimzahl nach der "Most Probable Number" (MPN)-Methode (s. **Anhang: Tabelle 2**) bestimmt [Naglitsch 1996, Seite 31f]. Dabei wurde als Ausgangswert eine Keimzahl von ca. 10⁹ / ml ermittelt.

3.2. Nährmedien und Reagenzien

Im folgenden sollen die Medien benannt werden, die zur Vermehrung und Isolierung der E.coli verwendet wurden. Die Nährböden und Reagenzien sind kommerziell im Handel erhältlich.

3.2.1. Peptonwasser (z.B. OXOID: Art.Nr. CM 9)

Peptonwasser kann zur Anzucht oder als Basisnährboden zur Untersuchung der Kohlenhydratverwertung (Bunte Reihe) verwendet werden. Die Anzucht in Peptonwasser liefert ein gutes Inokulum für Fermentations- oder andere diagnostische Nährböden.

3.2.2. Endo-Agar (Lactose-Fuchsin-Sulfit-Agar; z.B. OXOID: Art.Nr. CM 479)

Dient dem Nachweis und der Isolierung von Enterobacteriaceae. Ermöglicht die Unterscheidung Lactose-positiver von Lactose-negativen Bakterien. Die Bildung sowohl von Säure als auch von Aldehyd durch Lactose-positive Keime wie E.coli führt zur charakteristischen Rotfärbung der Kolonien und des umgebenden Nährbodens.

3.2.3. MUG-Laurylsulfat-Bouillon (Fluorocult Laurylsulfat-Bouillon; z.B. MERCK: Art.Nr. 1.12588.0500)

Mit diesem Flüssigmedium werden selektiv coliforme Enterobakterien, so auch Escherichia coli angereichert, die durch Lactosevergärung unter Gasbildung, sichtbar an einer Gasblase im Durham-Röhrchen, identifiziert werden können. Der Phosphatpuffer sowie der hohe Nährgehalt der Laurylsulfat-Bouillon ermöglichen ein gutes Wachstum und eine ausreichende Gasbildung auch von Escherichia coli. Das Wachstum unerwünschter Begleitkeime wird durch den Gehalt an Laurylsulfat weitgehend unterdrückt [Merck Nährboden-Handbuch 1990, Seite 132f].

Durch die Spaltung von 4-Methylumbelliferyl- β -D-glucuronid (MUG) wird der fluoreszenz-optische Nachweis von E. coli gewährleistet. Fluoreszenzpositive Röhrchen sind an einer hellblauen Fluoreszenz im langwelligen UV-Licht (366 nm Wellenlänge) erkennbar [Schindler 1991, Seite 438f].

3.2.4. GN-Anreicherungsbouillon nach HAJNA (z.B. OXOID: Art.Nr. CM 283)

Tryptose-haltige Bouillon mit einem sehr guten Nährstoffangebot. Wird zur unspezifischen Anzucht anspruchsvoller Keime verwendet, insbesondere wenn schnelles und üppiges Wachstum gefordert ist.

3.2.5. Tryptophan-Bouillon (DEV- Tryptophan-Bouillon; z.B. MERCK: Art.Nr. 1.10694.0500)

Enthält tryptisch verdautes Pepton aus Fleisch, das dem Nährstoffbedarf an Aminosäuren und Peptiden der Mikroorganismen entspricht.

3.2.6. DEV-Nähragar (z.B. MERCK: Art.Nr. 1.11471.0500)

Nähragar ist ein Basisnährboden zur Subkultivierung von Mikroorganismen, die der biochemischen Testung vorausgeht. DEV-Nährböden wurden im Rahmen der „Deutschen Einheitsverfahren“ (DEV) zur Wasser-, Abwasser- u. Schlammuntersuchung entwickelt.

3.2.7. Cytochromoxidase-Reagenz (z.B. OXOID: Art.Nr. BR 64)

Das Enzym Cytochromoxidase wird von vielen Keimen einschließlich Neisseria und Pseudomonas spp. gebildet. Der Oxidase-Test ist eine wichtige, differential-diagnostische Methode, die bei allen Gram-negativen Bakterien durchgeführt werden sollte. Die Oxidase-Reaktion beruht auf der Fähigkeit bestimmter Bakterien, Indolphenolblau aus Dimethyl-p-phenylendiamin und α -Naphthol zu bilden. E.coli sind Cytochromoxidase-negative Keime.

3.2.8. KOVÁČ`S-Indolreagenz (z.B. MERCK: Art.Nr. 1.09293.0100)

Zur biochemischen Identifizierung von E.coli in einer Bunten Reihe. Zusätzlich zur Gasbildung und MUG-Spaltung wird der Nachweis der Indol-Bildung vorgenommen. Das Indolreagenz wird auf die in Tryptophan-Bouillon inkubierten Bakterienkolonien getropft. Hierbei besitzen E.coli die Fähigkeit die Aminosäure Tryptophan zu spalten und dabei Indol zu bilden, sichtbar an der kirschroten Färbung des Überstandes (Indol-Ring).

3.2.9. Ammoniumcitrat-Schrägagar-Röhrchen (DEV-SIMMONS-Citrat-Agar; z.B. MERCK: Art.Nr. 1.0693.0500)

Citrat-Agar wird zur Differenzierung der Enterobacteriaceae anhand der Verwertung von Citrat als einzigen Kohlenstoffquelle verwendet. Bei Citratverwertung wird der Nährboden alkalisch und ändert seine Farbe von grün nach tief blau. E.coli wachsen nicht auf diesem Nährboden.

3.2.10. Lactose-Bouillon (DEV-Lactose-Bouillon; z.B. MERCK: Art.Nr.1.10689.0500)

Lactose-Bouillon wird zur vorläufigen Identifizierung von Coliformen eingesetzt. E.coli kann durch Säure- und Gasbildung erkannt werden.

3.2.11. Glucose-Bouillon (DEV-Glucose-Bouillon; z.B. MERCK: Art.Nr. 1.10686.0500)

Nährstoffhaltige Bouillon zur Primärisolierung von Mikroorganismen. Die in der Bouillon enthaltene Glucose stellt eine schnell verfügbare Energiequelle dar. E.coli ist durch Säure- und Gasbildung definiert.

3.2.12. Müller-Hinton-Agar (z.B. OXOID: Art.Nr. CM 337)

Müller-Hinton-Agar wurde als nährstoffhaltiger Kulturnährboden zur Isolierung von Neisseria spp. entwickelt. Die im Nährboden vorhandene Stärke kann toxische Stoffwechselprodukte absorbieren und unterstützt das Wachstum von Mikroorganismen aus sehr kleinen Inokula.

3.3. Keimzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Keimzahlen von E.coli wurde für alle unterschiedlichen Probearten ein Flüssigkulturverfahren mit MUG-Laurylsulfat-Bouillon (*Punkt 3.2.3.*) im Dreifachansatz nach der MPN-Methode angewandt. Zur Erfassung der höchstwahrscheinlichen Keimzahlen wurden die Proben in regelmäßigen Zeitabständen stichprobenartig untersucht (s. Tabelle 13- Tabelle 17). Sobald eine quantitative Bestimmung wegen zu geringer Keimzahlen nicht mehr möglich war, wurde zum Nachweis der Vermehrungsfähigkeit eine rein qualitative Auswertung vorgenommen. In **Tabelle 3** sind Umfang der Probenansätze und das Auswertschema zusammengefaßt.

Erstellung von Verdünnungsreihen:

Von der Flußwasserprobe wurde 1 ml in sterile physiologische Kochsalzlösung (9 ml) einpipettiert (1:10-Verdünnung) und auf dem Whirlimix gemischt. Proben, die beispielsweise in 0,0001 ml oder noch geringeren Volumina untersucht wurden, sind aus obiger 1:10-Verdünnung entsprechend weiterverdünnt worden (1:100) bis hin zu Proben, von denen Verdünnungen in Zehnerschritten bis 10^{-8} ml erstellt wurden.

Die festen Proben wie Sporenerde, Zahnstocher und Deckgläser wurden bis zu einem Gesamtvolumen von 10 ml mit steriler physiologischer Kochsalzlösung übergossen und abhängig von der primär zugeimpften Menge an Keimsuspension (100µl oder 10µl) beispielsweise eine 1:100-Verdünnung bei der Sporenerde oder eine 1:1000-Verdünnung bei den Deckgläsern erstellt. Die Weiterverdünnung erfolgte wie bei obiger Wasserverdünnung.

Probenansatz mit MUG-Laurylsulfat-Bouillon:

Von der Originalprobe und von den Verdünnungen wurden dreimal je 1 ml in jeweils drei Reagenzgläser mit Durham-Röhrchen und 10 ml MUG-Laurylsulfat-Bouillon gegeben, wobei für die Endverdünnung aus der entsprechenden Vorverdünnung auch jeweils nur 0,1 ml Probenmenge analog in drei Kulturröhrchen eingeimpft wurde. Probenmengen von 10 ml (10 ml-Flußwasserproben bzw. 10 ml von 1:100- und 1:1000-Verdünnungen bei festen Proben) wurden dreimal in jeweils drei Reagenzgläser mit Durham-Röhrchen und 2 ml sechsfach konzentrierter MUG-Laurylsulfat-Bouillon gegeben.

Als gaspositiv gelten alle MUG-Laurylsulfat-Röhrchen, die eine Gasbildung innerhalb von 44 ± 4 h bei $36 \pm 1^\circ\text{C}$ aufweisen.

Auswertung:

Nach 44 ± 4 h Bebrütung bei $36 \pm 1^\circ\text{C}$ wurden von den Ansätzen alle gasnegativen Röhrchen aussortiert. Die gaspositiven Röhrchen blieben an ihrem ursprünglichen Platz stehen und wurden nach Entfernung der Verschlußkappen mit 0.5 ml 1 N NaOH-Lösung versetzt. Diese Realkalisierung ist nötig, da es bei tiefen pH-Werten zu einer Fluoreszenzlöschung kommt [Schwien 1988, Seite 24].

Anschließend wurden fluoreszenzpositive Röhrchen im langwelligen UV-Licht (366 nm), am besten in der Dunkelkammer, bestimmt. Günstig für die Ablesung ist es, wenn man den Reagenzglasständer mit den Kulturansätzen ohne Verschlusskappen unter die UV-Lampe hält und schräg von oben auf die im positiven Fall hellblau aufleuchtenden Oberflächen in den Kulturröhrchen blickt.

Für alle Verdünnungsstufen wurde die Anzahl der gaspositiven, fluoreszierenden Röhrchen dokumentiert.

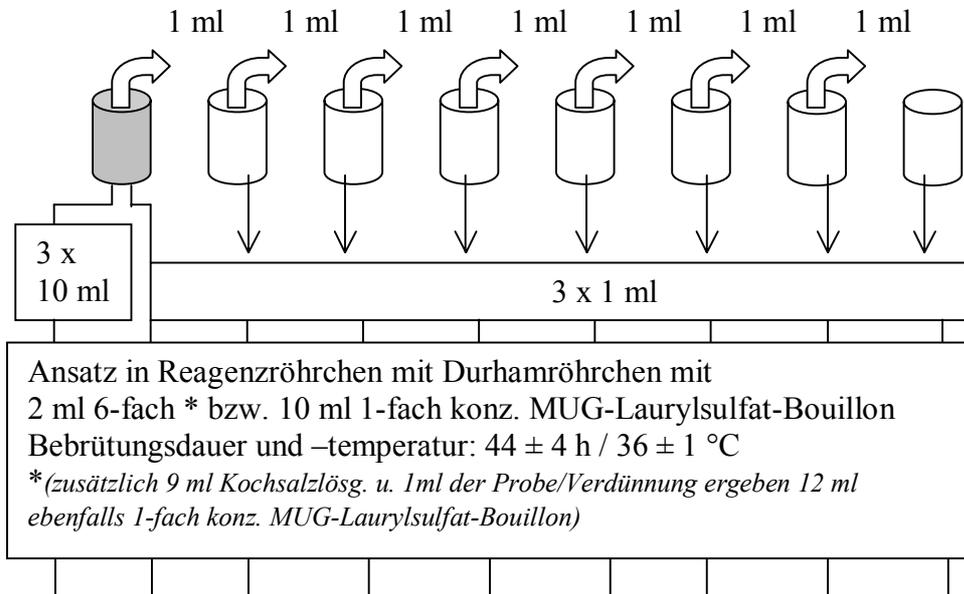
Bei allen Proben sind *Escherichia coli* durch Gasbildung und Fluoreszenz (MUG-Spaltung) charakterisiert.

Anschließend wurden die höchstwahrscheinlichen Keimzahlen nach dem MPN-Verfahren mittels der McCrady-Zahlentabelle bestimmt (s. **Anhang: Tabelle 2**). Prinzipiell werden hierbei drei aufeinanderfolgende Verdünnungsstufen ausgewertet. Das Ergebnis wird als „Spezifische Keimzahl / 100 ml“ mittels Dreifachansatz (MPN-Verfahren) dokumentiert [Naglitsch 1996, Seite 31f].

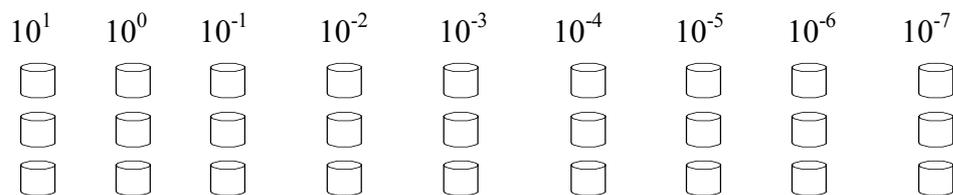
Tabelle 3

Quantitative Untersuchung von Escherichia coli mit der MPN-Methodik:

Originalprobe/Verdünnungsreihe mit jeweils 9 ml steriler, physiologischer Kochsalzlösung



Erhaltene Verdünnungsstufen (jeweils in 3-facher Ausführung):



Auswertung:

1. Entfernen von Gas-negativen Ansatzröhrchen.
2. Zugabe von 0,5 ml 1 N Natronlauge in die Gas-positiven Ansätze u. Dokumentation.
3. Auswerten und Dokumentation von fluoreszierenden Ansätzen unter langwelligem UV-Licht (366 nm)

Escherichia coli sind durch die Gasbildung und Fluoreszenz (MUG-Spaltung) charakterisiert.

Die Bestimmung der höchstwahrscheinlichen Keimzahl ("most probable number") erfolgt nach der McCrady-Tabelle (siehe Anhang).

3.4. Biochemische Charakterisierung

Ab einem Keimgehalt unterhalb der quantitativen Nachweisgrenze, diese liegt nach dem MPN-Verfahren bei 30 / 100 ml für Flußwasser bzw. bei 3 / 10 ml für Zahnstocher, Deckgläser u. Sporenerde, wurde der rein qualitative Keimnachweis der E. coli-Stämme durch Anreicherung in einer Flüssigkultur und anschließend eine biochemische Charakterisierung in der **Bunten Reihe** (*Punkt 3.4.*) und ein Nachweis der Toxinbildungsfähigkeit der EHEC-Pathovare im ELISA vorgenommen (*Punkt 3.5.*). Konnte kein Shigatoxinnachweis mittels ELISA erbracht werden, wurde zusätzlich der Nachweisversuch für das Toxin in der PCR vorgenommen (*Punkt 3.6.*).

Abschließend wurde beim Versuch mit sterilisiertem Wasser der Restwasserbestand von 1000ml filtriert und auf das Vorkommen von E.coli untersucht.

Der Nachweis von E. coli erfolgt mittels Primärkultur, Subkultur und biochemischer Identifizierung verdächtiger Einzelkolonien [Schindler 1996, Seite 42f]. Ein Fließschema ist in **Tabelle 5** angegeben.

Bei der **Primärkultur** wurden 10 ml der Flußwasserproben zu 5 ml 3-fach konz. GN-Anreicherungsbouillon nach HAJNA (*Punkt 3.2.4.*) gegossen. Feste Proben wurden bis zu einem Gesamtvolumen von 10 ml mit steriler physiologischer Kochsalzlösung übergossen. Anschließend wurden diese 10 ml Keimabschwemmung wie die Flußwasserproben angereichert.

Die Flüssigkulturen wurden im Brutschrank bei 36 ± 1 °C maximal 44 ± 4 h bebrütet. Nach 24 ± 4 h wurden die Ansätze erstmals auf Trübung der klaren, gelblichen Bouillon überprüft. Verdächtige Ansätze wurden zur Gewinnung von Einzelkolonien fraktioniert mittels eines sterilen Glasspatels wie beim Dreißenausstrich auf eine Petrischale mit Endo-Agar (Lactose-Fuchsin-Sulfit-Agar) ausgestrichen. Mit den beiden sterilen Spatelenden wurde analog wie beim Verdünnungsausstrich nacheinander ausgedünnt. Unverdächtige Ansätze wurden bis zur Endablesung nach 44 ± 4 h weiterbebrütet, wobei nunmehr verdächtige Proben ebenfalls subkultiviert wurden.

Die **Subkultur** auf Endo-Agar wurde 24 ± 4 h bei 36 ± 1 °C bebrütet. Dieser Selektivnährboden unterdrückt die grampositive Bakterienflora. Lactoseverwertende Bakterienkolonien färben sich intensiv rot an. Bei erhöhter Säurefreisetzung kristallisiert Fuchsin zusätzlich mit metallisch grün-goldenem Glanz (Fuchsinglanz) auf den Kolonien aus. Dies ist meist bei E. coli der Fall, kommt aber auch bei einigen Stämmen von *Enterobacter*, *Klebsiella* und *Citrobacter* sowie bei lactosepositiven Aeromonaden vor. Bei verzögerter Lactoseverwertung und bei zu dichtem Koloniewachstum ist die Rotfärbung geringer ausgeprägt, so daß ein fließender Übergang bis hin zu lactosenegativen nicht oder schwach gefärbten Kolonien auftritt. Daher müssen beim Keimgemisch immer mehrere Einzelkolonien abgeimpft werden, wobei alle morphologisch unterscheidbaren Kolonien mit Fuchsinglanz sowie mit Rot- oder Rosarotfärbung mit zu berücksichtigen sind.

Zur **biochemischen Identifizierung** in einer **Bunten Reihe** wurde Material von verdächtigen Einzelkolonien in Tryptophan-Bouillon (*Punkt 3.2.5.*) eingepflegt und suspendiert. Nach 30–60 min. bei Raumtemperatur wurde mittels ein sterilen Wattetupfers kurz in die Tryptophan-Bouillon eingetaucht und mit der aufgesogenen Flüssigkeit die verschiedenen Reaktionsansätze der Bunten Reihe beimpft.

Die Reaktionsansätze einschließlich der Tryptophan-Bouillon wurden im Brutschrank bei $36 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ für $24 \pm 4 \text{ h}$ bebrütet, mit Ausnahme der Glucose-Bouillon, die bei $44 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert wurde.

Auswertung der **Bunten Reihe** nach $24 \pm 4 \text{ h}$:

Cytochromoxidase-Testung auf der Nähragarplatte (*Punkt 3.2.6.*):

Es wird ein Tropfen Nadi-Reagenz (Cytochromoxidase-Reagenz; *Punkt 3.2.7.*) auf die Bakterienkolonien in den Sektoren getropft.

-*Positive Reaktion*: Die gesamten Kolonien oder deren Ränder färben sich innerhalb von zwei Minuten intensiv blau.

-*Negative Reaktion*: Die Kolonien oder deren Ränder bleiben nahezu farblos. Eine schwache Bläuung, die gelegentlich durch andere Oxidationsprozesse, auch durch die Luft, hervorgerufen wird, ist als negativ zu werten.

Indol-Bildung in der Tryptophan-Bouillon:

In das Röhrchen werden mindestens drei Tropfen KOVÁC's-Reagenz (*Punkt 3.2.8.*) getropft. Auf der Bouillon sollte sich zumindest eine drei Millimeter hohe Überschichtung ausbilden, da bei zu geringer Zugabe sonst selbst im positiven Fall keine Rotfärbung auftritt. Das Röhrchen sollte nur leicht bewegt und nicht aufgeschüttelt werden.

-*Positive Reaktion*: Rosa bis intensiv kirschrote Färbung des Überstandes (Indol-Ring). Die Rotfärbung ist nicht stetig stabil und kann nach wenigen Stunden wieder verschwinden.

-*Negative Reaktion*: Schwach bis stärker gelbliche Verfärbung des Überstandes.

Citrat-Verwertung in dem Ammoniumcitrat-Schrägagar-Röhrchen (*Punkt 3.2.9.*):

-*Positive Reaktion*: Wachstums- und Farbumschlag nach blau auf der Schrägagarfläche. Gelegentlich kommt eine verzögerte Citratverwertung vor, wobei nach 24 h nur schwaches Wachstum und noch keine Blauverfärbung auftreten. Eine derartige Reaktion ist bereits als positiv zu werten.

-*Negative Reaktion*: Kein Wachstum und kein Farbumschlag, die Schrägagarfläche ist unverändert grün.

Lactose-Fermentation in der Lactose-Bouillon (*Punkt 3.2.10.*):

-*Positive Reaktion*: Farbumschlag nach Gelb und Gasbildung im Durham-Röhrchen.

-*Negative Reaktion*: Kein Farbumschlag oder Gelbfärbung ohne Gasbildung.

Lactose-Röhrchen mit negativen Reaktionen müssen zur Erfassung verzögert lactoseverwertender Stämme einen Tag weiterbebrütet werden. Anschließend werden erneut Säure- und Gasbildung ausgewertet. Bei Gasübersättigung in der Suspension perlen Gasbläschen erst dann auf, wenn an das Röhrchen kräftig geklopft wird.

Glucose-Fermentation in der Glucose-Bouillon (Punkt 3.2.11.):

-Positive Reaktion: Farbumschlag nach Gelb und Gasbildung im Durham-Röhrchen.

-Negative Reaktion: Kein Farbumschlag oder Gelbfärbung, keine Gasbildung.

Escherichia coli ist nach 24 ± 4 h Bebrütung in der Bunten Reihe durch folgende Stoffwechselmerkmale definiert:
Cytochromoxidase-negativ – indolpositiv – citratnegativ – Säure- und Gasbildung in der Lactose-Bouillon – Säure- und Gasbildung in der Glucose-Bouillon.

Auswertung:

Die Nachweisreaktionen von E.coli in der Bunten Reihe sind tabellarisch zusammengefaßt:

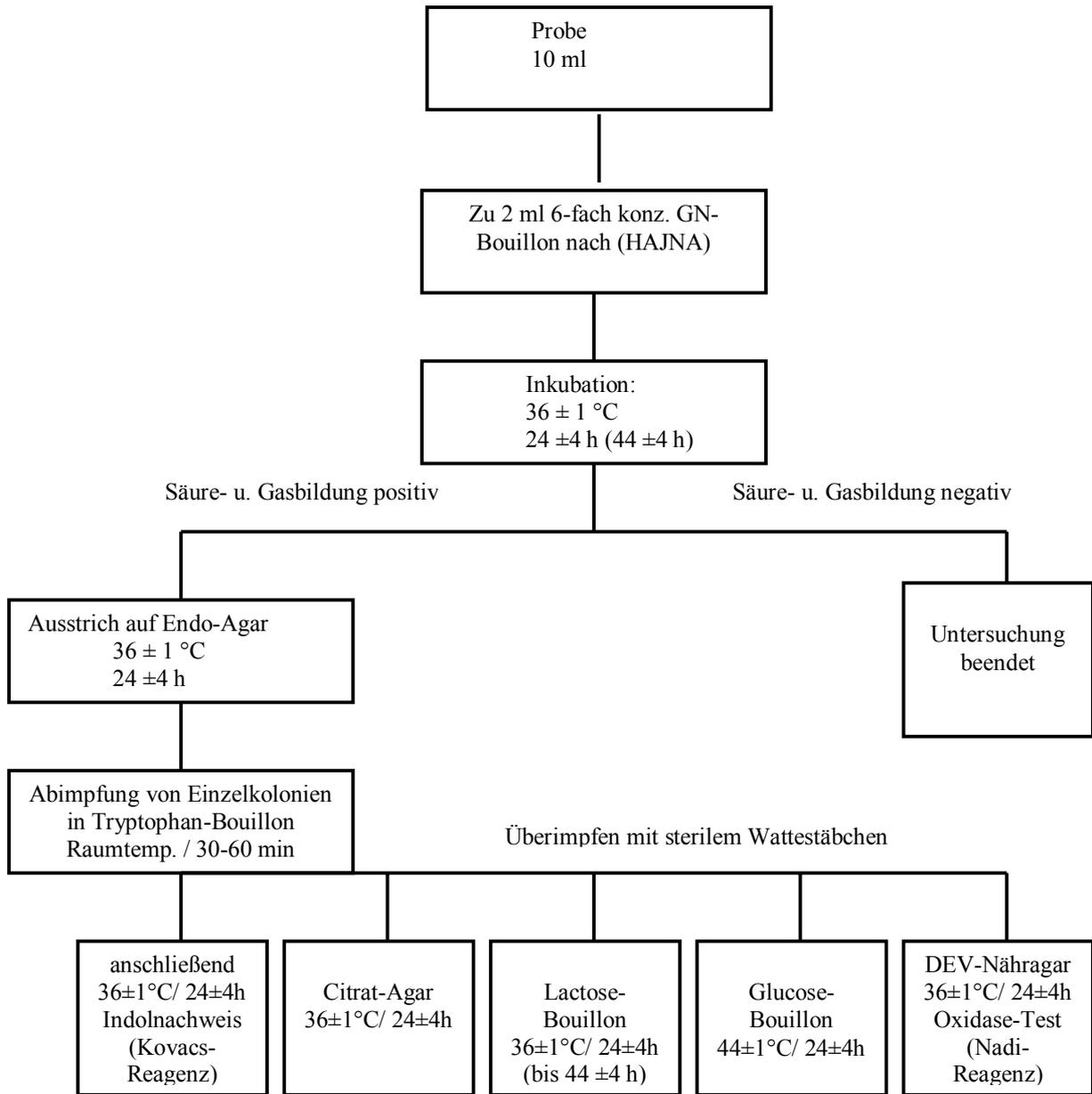
Tabelle 4

Biochemisches Reaktionsverhalten in der Bunten Reihe:

	<u><i>Escherichia coli</i></u>
Cytochromoxidase	negativ
Indolbildung	positiv
Citratverwertung	negativ
Lactose-Säurebildung (24 h)	positiv
Lactose-Gasbildung (24 h)	positiv
Glucose-Säurebildung	positiv
Glucose-Gasbildung	positiv

Tabelle 5

Qualitativer Nachweis von *Escherichia coli* :



Escherichia coli:

Indol	Citrat	Lactose	Glukose	Oxidasetest
+	-	++	++	-

3.5. Durchführung ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

Allgemeines Prinzip:

Der Nachweis von Shigatoxinen 1 und 2 in Kotproben und Kulturoisolaten erfolgt durch einen in vitro Mikrotiter-ELISA. Nachgewiesen werden als Shigatoxine bezeichnete spezifische Antigene in der Kotprobe unter Anwendung des Sandwichprinzips.

An eine feste Phase, Wand der Nöpfe einer Mikrotiterplatte, ist der **monoklonale** Antikörper des nachzuweisenden Antigens (Shigatoxin) immobilisiert (entspricht Boden der Sandwichschicht). Nach Zugabe des Flüssigmediums bindet das Antigen spezifisch an den immobilisierten Antikörper. Anschließend wird nach Einhalten der Inkubationszeit in einem intensiven Waschschrift nicht gebundenes Material entfernt.

Das an den Antikörper immobilisierte spezifische Antigen (Inhalt des Sandwichs) bildet die feste Phase für den nächsten Reaktionsschritt. Ein weiterer **polyklonaler** anti-Shigatoxin-Antikörper (Zweitantikörper) wird zugeführt und bindet an die freie Seite des fixierten Antigens (Dach des Sandwichs).

Nach einem zweiten Waschschrift muß nun der Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex nachgewiesen werden. Dazu werden **polyklonale** Enzym-konjugierte anti-IgG Antikörper (Drittantikörper) zugegeben. Sind Toxine vorhanden, bildet sich ein Antikörper-Enzym-Komplex. Die Menge des gebundenen Drittantikörpers ist in bestimmten Bereichen proportional zur Menge des gebundenen Shigatoxins. Nach einem weiteren Waschschrift wird die Enzymaktivität nach Zugabe des entsprechenden Substrats photometrisch gemessen.

Durchführung:

Eine erbsengroße Menge (ca. 0,5 g) einer Kotprobe wurde in 9 ml Flüssigmedium (GN-Bouillon nach Hajna) eingepflegt und für 10-15 Sekunden auf dem Vortex geschüttelt. Nach Bebrütung der Bouillon für 16-24 Stunden bei 37 °C wurde mit der Kultur der ELISA zum Nachweis der Expression von Shigatoxinen 1 u. 2 entsprechend den Angaben des Herstellers (Premier EHEC Meridian, HiSS Freiburg) durchgeführt.

Positiv bewertet wurde eine optische Dichte (OD) von $\geq 0,150$.
OD-Werte von 0,100 bis 0,149 wurden laborintern als grenzwertig eingestuft.

3.6. Durchführung PCR (Polymerase Chain Reaktion)

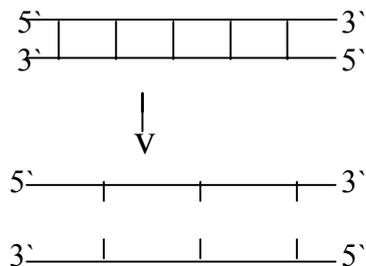
Der Nachweis von Shigatoxingenen (stx_1, stx_2) durch die PCR bei geringen Mengen von Nukleinsäuresequenzen in den Untersuchungsproben gewinnt vor allem dann an Bedeutung, wenn die Bakterien nicht oder nur schwer zu kultivieren sind oder wenn die Kultivierung viel Zeit erfordert. Darüber hinaus kann die Empfindlichkeit des Toxingennachweises mit dieser Methode gesteigert werden.

Allgemeines Prinzip:

Zu Beginn werden die Bakterien durch Erhitzen zerstört und ihre DNA freigelegt. Anschließend muß die DNA in vitro durch eine DNA-Polymerase in folgenden Schritten vermehrt werden:

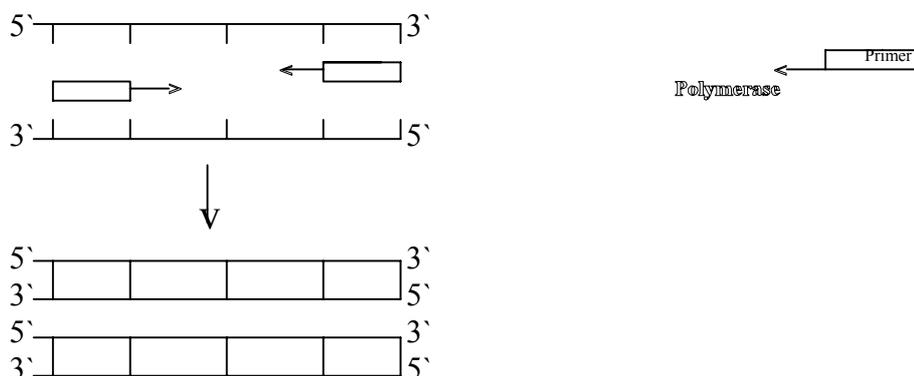
1.Schritt:

Trennung des DNA-Doppelstranges durch Erwärmen



2.Schritt:

Zugabe zweier synthetischer Oligonukleotide (= Primer), die zu den beiden 3`-Enden des gesuchten Toxingenoms komplementär sind. Von einer Polymerase werden dann die Einzelstränge in Richtung des 5`-Endes zu Doppelsträngen kopiert.



Die neuen und alten Stränge werden erneut durch Erwärmen getrennt und die beiden Schritte solange wiederholt bis tausende Kopien der ursprünglichen DNA erreicht werden. Die neusynthetisierten DNA-Sequenzen können mit Hilfe von Restriktionsenzymen in Stücke geschnitten werden, die eine einheitliche Länge aufweisen. Diese lassen sich durch Gelelektrophorese nachweisen.

Durchführung:

Zur Bereitstellung des Materials für die PCR wurde eine Endplatte aus einer GN-Boullion (siehe ELISA) beimpft und über Nacht bei 37°C bebrütet.

Das gewachsene Bakterienmaterial wurde mit einem sterilen Tupfer von der Platte abgenommen und in 1,5ml NaCl (0,9%ig) eingebracht, um von dieser Bakterien-suspension eine 1:20 Verdünnung in sterilem Aqua dest. herzustellen.

Nach Erhitzen der Suspension auf 95 °C für 15 Minuten wurden davon 15 µl in die PCR eingesetzt.

Einzelkolonien wurden überprüft durch Entnahme von der Endplatte und Einreiben des Materials in 200 µl sterile 0,9%ige NaCl-Lösung. Daraus wurde eine 1:20 Verdünnung in sterilem Aqua dest. hergestellt und davon, nach Erhitzen der Suspension auf 95 °C für 15 Minuten, 15 µl in die PCR eingesetzt [Kugler 1998, Seite 15].

Der PCR-Ansatz (50 µl) enthielt folgende Komponenten:

- dNPTs jeweils 50 mM
 - Primer jeweils 10 pmol
 - AmpliTaq-DNA-Polymerase 1Unit
 - Reaktionspuffer: 50 mM KCL, 10 mM Tris-OH/HCL pH 8,3
 - 1,5 mM MgCl₂
- (alle Reagenzien Perkin Elmer, Heidelberg)

Die PCR wurde auf dem Perkin Elmer GeneAmp System 9600 durchgeführt.

Der PCR-Ansatz für *stx 1*, *stx 2* wurde nach einem initialen Temperaturschritt (fünf Minuten bei 94 °C) mit 30 Zyklen (94 °C, 30 s; 57 °C, 60 s; 72 °C, 60 s) amplifiziert. Die verwendeten Primer sind in **Tabelle 6** aufgeführt.

Tabelle 6

Sequenzen der für die PCR verwendeten Primer [n. Kugler 1998, Seite 14]

Primer-bezeichnung	Primersequenz	Zielsequenz
KS 7	5'-CCCGGATCCATGAAAAAACATTATTAATAGC-3'	<i>stx 1</i>
KS 8	5'-CCCGAATTCAGCTATTCTGAGTCAACG-3'	
LP 43	5'-ATCCTATTCCCGGGAGTTTACG-3'	<i>stx 2</i>
LP 44	5'-GCGTCATCGTATACACAGGAGC-3'	

Die PCR-Produkte wurden elektrophoretisch im 2 %igen Agarose-Gel aufgetrennt und anschließend mit Ethidiumbromid gefärbt. Die Dokumentation erfolgte mit PC, nachdem die DNA-Banden durch einen Transilluminator mit UV-Licht sichtbar gemacht wurden

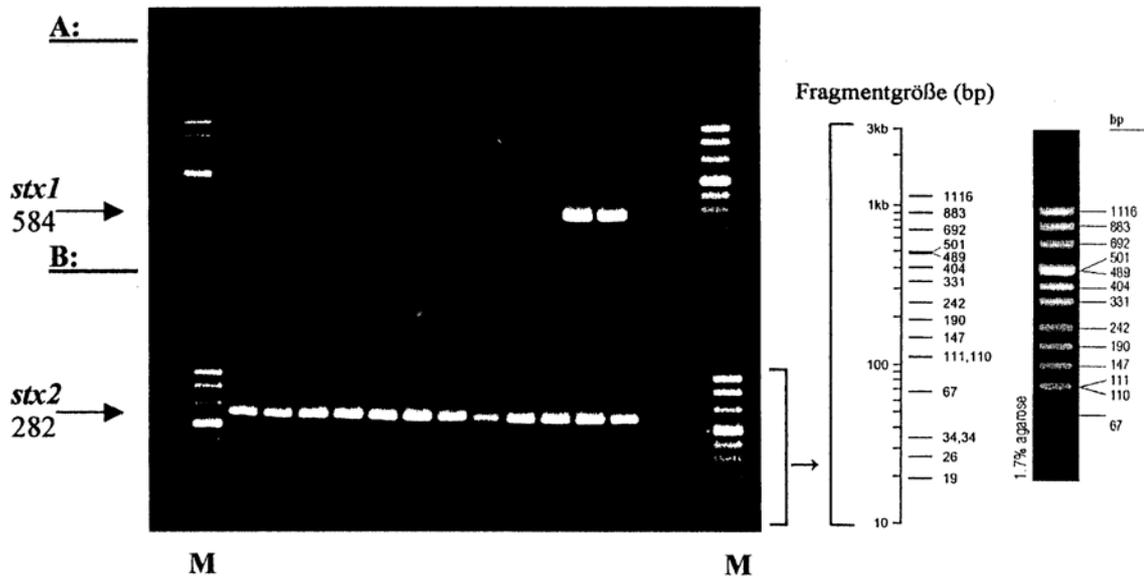


Abbildung 2

Agarose-Gel-Elektrophoresen **A** und **B**: Darstellung der typischen Amplifikationsfragmente für *stx1*- (**A**) und *stx2*-Gene (**B**) in der PCR.
M: Marker (z.B. Fa. Fermentas) ; Fragmentgröße in Basenpaaren (**bp**).

3.7. E. coli an Zahnstocher

Als Gebrauchsgegenstand mit rauher Oberfläche kamen handelsübliche sterilisierte Holzzahnstocher zum Einsatz.

Vorversuch zur Prüfung auf antibakterielle Aktivität im Hemmhofstest:

Jeweils zwei Zahnstocher wurden im gleichen Abstand auf drei Müller-Hinton-Agar-Platten (Durchmesser 90 mm, Schichtdicke 6 mm, pH 7; *Punkt 3.2.12.*), die mit *Bacillus subtilis* ATCC 6051 beimpft waren und auf drei Endo-Agar-Platten, die mit *E. coli* ATCC 11775 beimpft waren, gelegt. Nach 20 h Inkubation bei 36 °C wurde kontrolliert, ob sich auf den Platten ein Hemmhof gebildet hatte. Eine antibakterielle Aktivität war bei keinem Zahnstocher nachweisbar.

3.7.1. Präparation

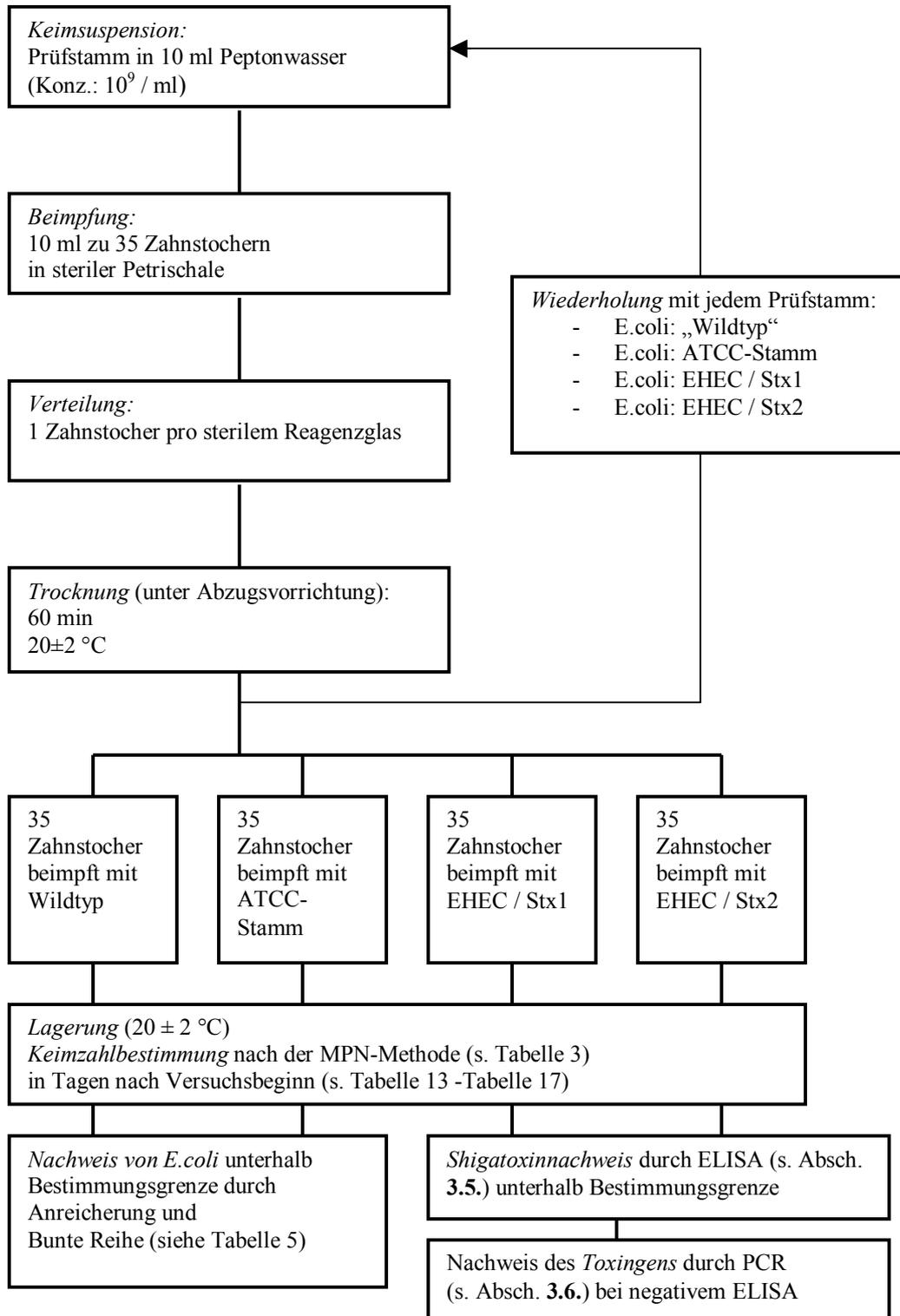
Es wurden von insgesamt 140 sterilisierten Holzzahnstochern je 35 Stück in eine sterile Petrischale gelegt, mit sterilen Pinzetten beschwert und in jede Petrischale eine andere der vier Keimsuspensionen gegossen. Im Vorversuch konnte ein Zahnstocher zwischen 1,0 u. 10,0 µl der Keimsuspension aufsaugen, dies entspricht in etwa einer Keimzahl von 10^6 - 10^7 .

Die so behandelten Holzzahnstocher wurden unter der Abzugvorrichtung in sterilen Petrischalen 60 min. lang getrocknet, um eine Verfälschung der Lebensdauer durch ein feuchtes Milieu zu verhindern. Anschließend folgte das Abfüllen einzelner beimpfter Holzzahnstocher in sterile Reagenzgläser. Alle beimpften Proben wurden bei Raumtemperatur (20 ± 2 °C) abgedunkelt aufbewahrt, um eine Reduktion der Keimzahl durch UV-Bestrahlung zu vermeiden. Die Reagenzgläser dienten zusätzlich als Luftkammer, um anaerobe Bedingungen zu verhindern.

3.7.2. Untersuchungsschema

Tabelle 7

E.coli an Zahnstocher:



3.8. E. coli auf Objektträger

3.8.1. Präparation

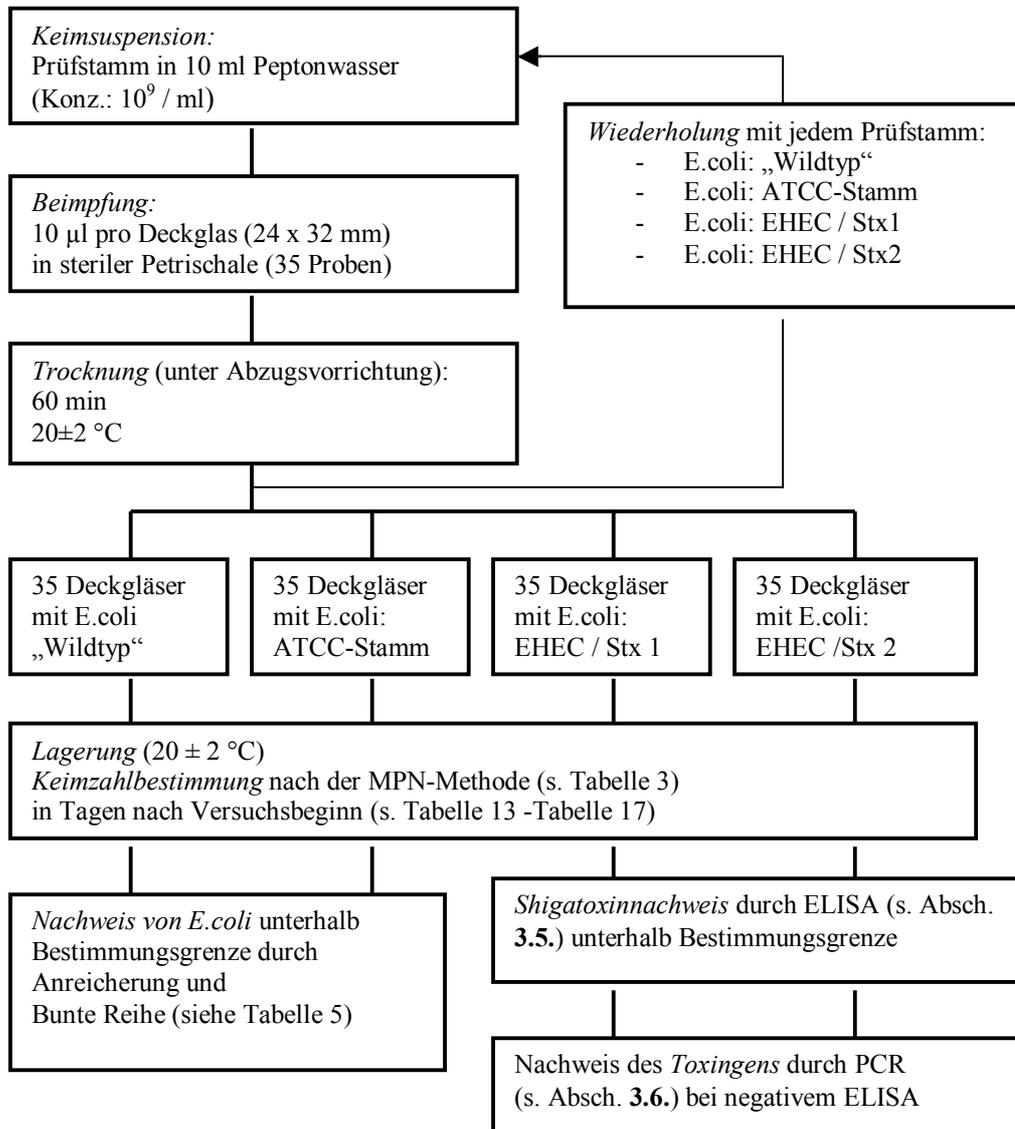
Ebenso wie unter 3.1. beschrieben, wurden auch für diesen Versuch Übernachtansätze der gleichen vier Prüfstämme erstellt, wobei diesmal mittels Pipetierhilfe jeweils 10 µl (entspricht einer Keimzahl von ca. 10⁷) der Keimsuspension auf einzelne Deckgläser getropft und 60 min. lang unter der Abzugsvorrichtung bei Raumtemperatur (20 ± 2 °C) getrocknet wurden.

Alle 140 Deckgläser definierter Größe (24 x 32 mm) wurden nach der Beimpfung abgedunkelt in sterilen Petrischalen bei Raumtemperatur gelagert. Die Petrischalen dienten auch hier zusätzlich als Luftkammer, um anaerobe Bedingungen zu vermeiden.

3.8.2. Untersuchungsschema

Tabelle 8

E.coli auf Objektträger:



3.9. E. coli in Sporenerde

3.9.1. Präparation

Die verwendete **Sporenerde** wurde nach folgender Rezeptur erstellt:

100 g	trockene gesiebte Erde (Humus)
20 g	Tragant (Fa. Merck)
20 ml	Alkohol
100 ml	bis 150 ml Leitungswasser

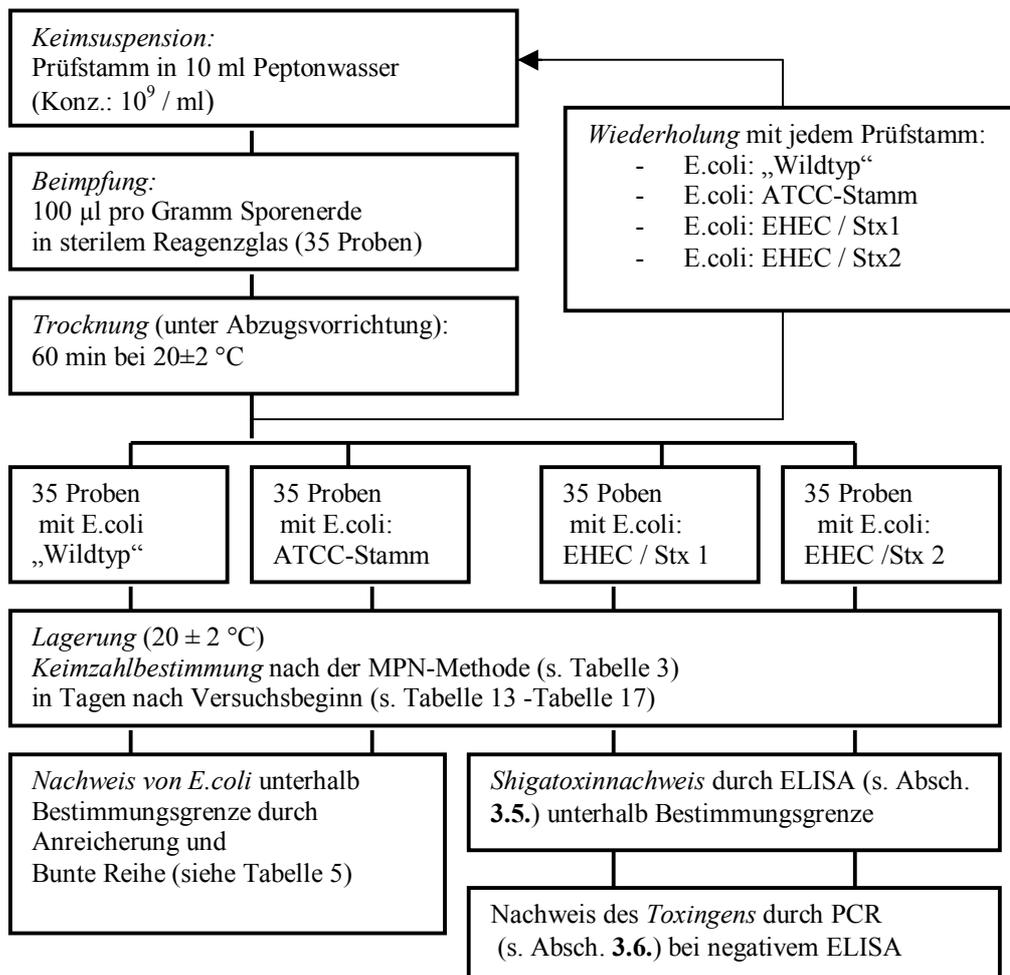
Die gesiebte Erde wurde mit Tragantpulver vermischt, dann das Wasser-Alkohol-Gemisch zugegeben und unter kräftigem Rühren gemischt. Anschließend wurde auf Filterpapierstreifen ausgestrichen und luftgetrocknet.

Insgesamt 140 Reagenzgläser wurden mit je ca. 1g (0,75-1,25 g) Sporenerde gefüllt und anschließend mit gesättigtem Wasserdampf von 120°C bei 1 bar Überdruck sterilisiert. Danach erfolgte die Beimpfung, wobei bei diesem Versuch mittels Pipetierhilfe jeweils 100 µl Keimsuspension auf ein Gramm Sporenerde getropft wurden (entspricht einer Keimzahl von ca. 10⁸). Dadurch wurde eine gleichmäßige, überstandlose Befeuchtung der Erde gewährleistet. Alle beimpften Proben wurden bei Raumtemperatur (20 ± 2 °C) abgedunkelt aufbewahrt, um ebenfalls eine Reduktion der Keimzahl durch UV-Bestrahlung zu vermeiden. Die Reagenzgläser dienen wieder als Luftkammer, um anaerobe Bedingungen zu verhindern.

3.9.2. Untersuchungsschema

Tabelle 9

E.coli in Sporenerde:



3.10. E. coli in Oberflächenwasser

3.10.1. Gewinnung

Die Entnahme des **Flußwassers** erfolgte an einem bewölkten Tag (geringe UV-Bestrahlung), wobei eine Verunreinigung durch grobe Partikel vermieden wurde. Im Labor wurden jeweils 3 Liter des Wassers in acht sterile Steilbrustflaschen mit einem Fassungsvermögen von 5 Litern abgefüllt.

Von den acht wassergefüllten Flaschen wurde eine Hälfte sterilisiert, in den übrigen vier Flaschen wurde das Wasser natürlich belassen.

Vorversuch zur Feststellung einer möglichen Ausgangskonzentration bzw. Verunreinigung durch E. coli in natürlich belassenem Oberflächenwasser:

In einer natürlich belassenen, unbeimpften Flußwasserprobe wurde mittels MPN-Methode die Keimzahl für E. coli ermittelt. Die Keimzahl für E.coli betrug 250 / 100 ml Flußwasser.

Zusätzlich wurde eine Wasserprobe, repräsentativ für das gesamte Flußwasser, auf das Vorkommen von Shigatoxin mittels ELISA untersucht. Shigatoxine konnten hierbei in der ursprünglichen Flußwasserprobe nicht nachgewiesen werden.

3.10.2. Präparation

Je 3 ml eines Prüfstammes wurden nach ca. 18 Std. Bebrütung sowohl in eine Flasche mit sterilisiertem als auch in eine Flasche mit natürlich belassenen Wasser gegossen, d.h. jeweils in 3 Liter Wasser verdünnt, um in jeder Steilbrustflasche eine Keimkonzentration von 10^6 / ml zu erhalten (s. **Tabelle 10**).

Tabelle 10

Oberflächenwasser:

Flasche Nr.	Medium	Prüfstamm	Konz.
1	Flußwasser natürlich belassen	E. coli-Laborstamm: ATCC Nr. 11775	10 ⁶ /ml
2		E. coli-„Wildtyp“	
3		EHEC /Stx 1	
4		EHEC /Stx 2	
5	Flußwasser sterilisiert	E. coli-Laborstamm: ATCC Nr. 11775	
6		E. coli-„Wildtyp“	
7		EHEC /Stx 1	
8		EHEC /Stx 2	

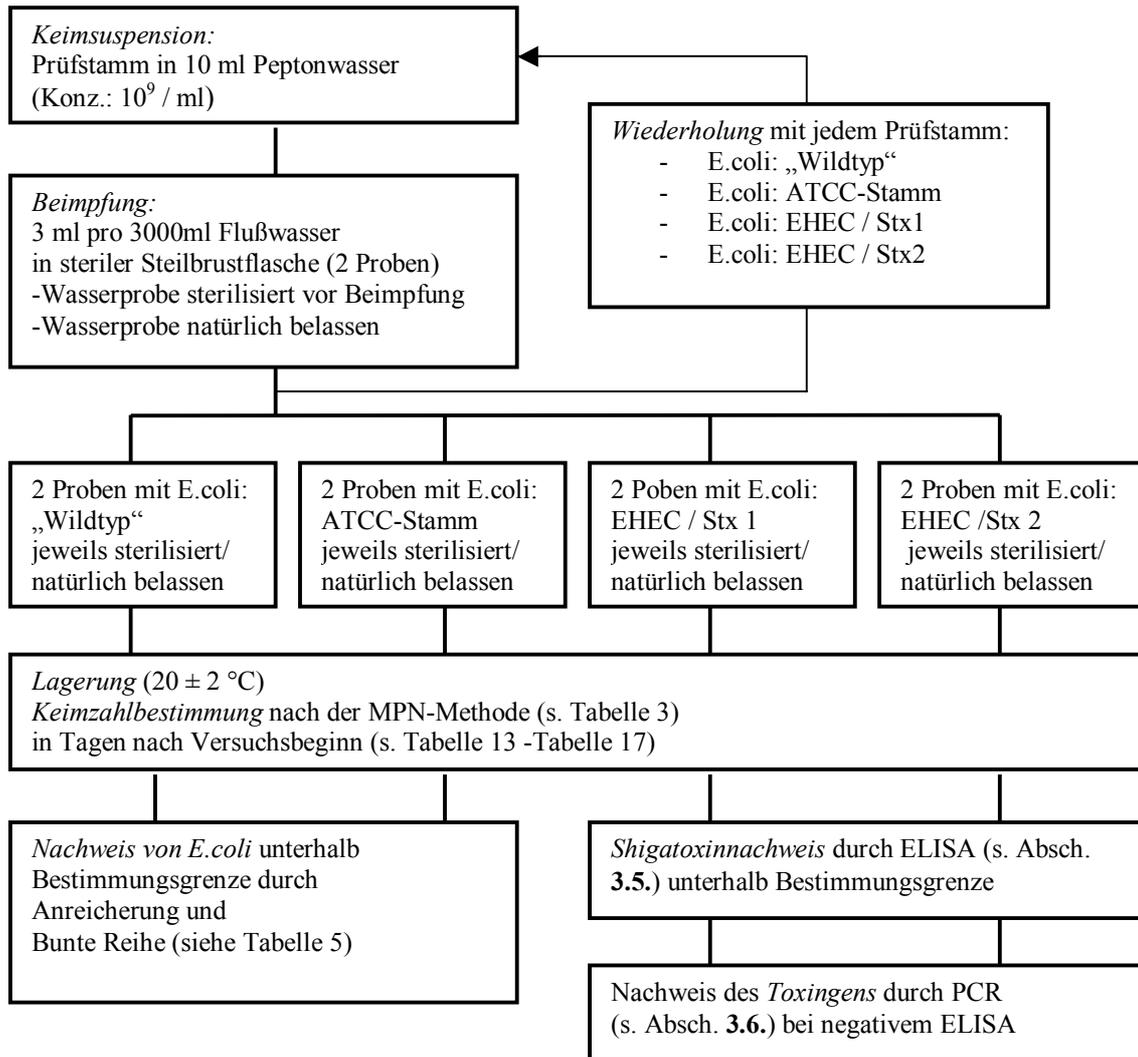
Die Lagerung aller beimpften Proben erfolgte bei Raumtemperatur (20 ± 2 °C). Ein Teil der Proben (Zahnstocher, Deckgläser u. Sporenerde) wurden abgedunkelt aufbewahrt, während die Flaschen bei Tageslicht gelagert wurden. Eine eventuelle Auswirkung der

naturgemäß starken UV-Bestrahlung des Oberflächenwassers sollte bei dieser Versuchsanordnung berücksichtigt werden. Bei der Abdeckung der Flaschen mit Aluminiumfolie wurde bewußt auf einen luftdichten Verschuß verzichtet und bei der Flaschenbefüllung auf eine Luftkammer geachtet, um anaerobe Bedingungen zu vermeiden.

3.10.3. Untersuchungsschema

Tabelle 11

E.coli in Oberflächenwasser:



3.11. Untersuchung von Vogelkotproben

3.11.1. Gewinnung

Vogelkotproben wurden an sechs unterschiedlichen Örtlichkeiten im Raum München und im Landkreis Altötting gesammelt.

Raum München: -*Ostpark (Gartenanlage mit Teichen)*
 -*Isar (auf Höhe Reichenbachbrücke)*
 -*Schloß Oberschleißheim (Gartenanlage)*

Landkreis Altötting: -*Badeseesee, Markt*
 -*Wöhrsee, Burghausen*

Landkreis Weilheim: -*Wielenbach*

Die Proben stammten von Stockenten, *Anas platyrhynchos*, Lachmöwen, *Larus ridibundus*, Sturmmöwen, *L. canus*, Höckerschwänen, *Cygnus olor* und Graugänsen, *Anser anser*.

Die Kotproben wurden in einem luftdichten sterilen Behälter ins Labor transportiert und bis zur Austestung bei 2-8 °C aufbewahrt. Die zu untersuchenden Proben wurden spätestens nach 24 Stunden zur Anreicherung in ein Kulturmedium überführt. Insgesamt 186 Kotproben wurden gesammelt.

Nach Voranreicherung in Flüssigkultur werden die Proben in einem Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) auf Toxinbildung untersucht. Mit einem kommerziell erhältlichen ELISA kann der Toxinnachweis direkt aus einer Kotprobe, wie hier aus einer Flüssiganreicherung oder von einem isolierten Keim geführt werden. Im Falle eines Toxinnachweises werden anschließend auf Selektivnährmedien die Einzelkolonien isoliert. Durch ihre phänotypischen Eigenschaften, wie z.B. Enterohämolysinbildung oder Sorbitverwertung, können die Keime von der residenten Koliflora unterschieden werden. Mittels der PCR-Technik erfolgt gegebenenfalls der molekularbiologische Nachweis von Shigatoxingenen (*stx*). Der Nachweis des kodierenden Gens für weitere Pathogenitätsfaktoren (Enterohämolysin, Intimin) läßt sich durch Auswahl geeigneter Primer führen. Toxingen-tragende Kolonien werden auf dem Nährboden mit Hilfe von Blotting-Methoden erkannt und auf Zugehörigkeit zu bestimmten E.coli-Serogruppen überprüft.

3.11.2. Untersuchungsschema

Tabelle 12 Untersuchung von Vogelkotproben	
1.Tag: Probensammlung Aufbewahrung	<i>Vogelkotprobe:</i> Transport und Aufbewahrung bei 2-8°C max. 24 h bis zur Anreicherung
2.Tag: Anreicherung Inkubation	Zu 10 ml 1-fach konz. GN-Bouillon (n. HAJNA) 36 ± 1 °C 24 ± 4 h
3.Tag: ELISA Inkubation	<i>Shigatoxinnachweis durch ELISA:</i> <u>positiv</u> <u>negativ:</u> oder Untersuchung grenzwertig beendet ↓ Ausstrich auf Endo-Agarplatte 36 ± 1 °C 24 ± 4 h
4.Tag: PCR	<i>Nachweis des Toxingens durch PCR:</i> vom gewachsenen Bakterienrasen

4. Ergebnisse

4.1. Überlebensdauer von apathogenen und Shigatoxin-bildenden E. coli-Stämmen in verschiedenen Umweltproben

Zur Erfassung der höchstwahrscheinlichen Keimzahlen in bzw. auf den verschiedenen Proben wurde die MPN-Methode angewandt. Ab einem Keimgehalt unter der Bestimmungsgrenze nach dem MPN-Verfahren wurde zum rein qualitativen Nachweis der apathogenen E.coli-Stämme eine Anreicherung angesetzt und zum Nachweis der Shigatoxin-bildenden E.coli der Toxinnachweis im ELISA vorgenommen. Bei negativen Ergebnissen im Stx-ELISA, d.h. bei Verlust der Toxinbildungsfähigkeit, wurde durch die PCR-Methode der Toxingennachweis vorgenommen.

Dabei ließ sich feststellen, daß die EHEC-Bakterien ihre Toxinbildungsfähigkeit bis kurze Zeit vor Ende der Reproduktionsfähigkeit beibehalten können. Nur in einem Fall konnte für den Stx 2-Stamm in sterilisiertem Oberflächenwasser (s. **Tabelle 17**) ein Gennachweis bis zu 283 Tagen erbracht werden, obwohl die Toxinbildungsfähigkeit bereits nach 177 Tagen verloren gegangen war.

Die Ergebnisse der fünf Versuche zur Tenazität d.h. zur Widerstandsfähigkeit der vier Prüfstämme gegenüber Umwelteinflüssen in den verschiedenen Medien sind in **Tabelle 13** bis **Tabelle 18** aufgeführt und in dem Diagramm 1 graphisch dargestellt (vergrößerte Darstellung siehe Anhang).

4.1.1. Tenazität der Prüfstämme auf Holz

Eine Übersicht der Überlebenszeiten von E.coli bzw. EHEC auf Zahnstocher gibt die **Tabelle 13** wieder. Dabei wurde der E.coli-Wildtyp über einen Zeitraum von 380 Tagen und der E.coli ATCC-Stamm über 34 Tage auf Zahnstocher nachgewiesen. Die Shigatoxin-bildenden Stämme konnten 210 Tage (Stx 2) bzw. 430 Tage (Stx 1) Toxin produzieren.

Die längste Nachweiszeit erzielte der pathogene Stx 1-Stamm, dessen Nachweiszeit um 50 Tage länger war als die des apathogenen E.coli-Wildtyps. Die Keimzahlen aller 4 Prüfstämme bewegten sich von anfänglich $>10^5$ Organismen pro Probe bis unterhalb der Bestimmungsgrenze nach dem MPN-Verfahren.

Im Vorversuch zur Prüfung auf antibakterielle Aktivität der Zahnstoche im Hemmhoftest war bei keinem Zahnstoche eine Aktivität nachweisbar. Eine mögliche Verkürzung der bakteriellen Überlebenszeit durch eine keimhemmende Vorbehandlung der Zahnstoche konnte dadurch ausgeschlossen werden.

Tabelle 13				
Überlebenszeit von Escherichia coli auf Zahnstoche				
Intervall zu Versuchsbeginn	E. coli: „Wildtyp“	E. coli: ATCC-Stamm	E. coli: EHEC / Stx 1	E. coli: EHEC / Stx 2
0	$9,3 \times 10^5$	$9,3 \times 10^5$	$2,4 \times 10^5$	$4,3 \times 10^5$
1	10^7	$9,3 \times 10^5$	$2,4 \times 10^6$	$2,4 \times 10^6$
2	$2,1 \times 10^6$	$9,3 \times 10^5$	$2,4 \times 10^5$	$9,3 \times 10^5$
3	10^6	10^6	$2,4 \times 10^5$	$4,6 \times 10^5$
5	$2,4 \times 10^5$	$7,5 \times 10^5$	930	$2,4 \times 10^3$
6	$4,6 \times 10^5$	$4,3 \times 10^3$	150	$4,3 \times 10^3$
7	$9,3 \times 10^4$	< 3 (*)	43	10^5
9	930	< 3	240	460
12	10^4	93	93	93
15	930	93	240	$4,6 \times 10^3$
19	930	< 3	< 3 (*)	93
21	430	< 3	93	93
27	$2,4 \times 10^3$	+	240	10^4
34	930	+	150	10^4
50	360	-	< 3	< 3 (*)
56	< 3 (*)	-	< 3	< 3
63	< 3	•	+	+
90	+		+	+
106	+		+	+
140	+		+	+
176	+		+	+
210	+		+	+
245	+		+	-
282	+		+	-
309	+		-	•
380	+		-	
430	-		+	
437	•		•	
(*) Nachweisgrenze nach dem MPN-Verfahren: 3 / Zahnstoche. Nach 2 x igem Unterschreiten dieser Grenze wurden die gesamten 10 ml untersucht.				
< 3: In Anreicherung E. coli nachgewiesen			< 3: Durch ELISA oder PCR Shigatoxinbildung nachgewiesen	

+ : Nachweis von *Escherichia coli* in Bunter Reihe bzw. von Shigatoxinbildung durch ELISA oder PCR.

- : kein Keim-, Toxin- oder Toxingennachweis

• : Versuchende

4.1.2. Tenazität der Prüfstämme auf Glas

In **Tabelle 14** sind die Überlebenszeiten von E.coli bzw. EHEC auf Deckglas dargestellt. Die Nachweiszeiten des apathogenen E.coli-Wildtyps sowie des pathogenen Stx1-Stammes auf Deckglas waren mit 20 Tagen identisch. Der Stx2-Stamm konnte nur 6 Tage, der ATCC-Stamm keine 24 Stunden nachgewiesen werden. Die Keimzahlen lagen dabei bei allen 4 Prüfstämmen anfänglich $>10^4$ Organismen pro Deckglas und sanken bis unterhalb der Bestimmungsgrenze nach dem MPN-Verfahren.

Tabelle 14				
Überlebenszeit von Escherichia coli auf Deckglas				
Intervall zu Versuchsbeginn	E. coli: „Wildtyp“	E. coli: ATCC-Stamm	E. coli: EHEC / Stx 1	E. coli: EHEC / Stx 2
0	$9,3 \times 10^4$	$4,3 \times 10^4$	$4,3 \times 10^5$	$> 10^4$
1	< 3 (*)	-	< 3 (*)	< 3 (*)
2	< 3	-	< 3	< 3
3	+	•	+	+
4	+		+	+
5	+		+	+
6	+		+	+
7	+		+	-
12	+		+	-
14	+		+	•
20	+		+	
22	-		-	
28	-		-	
35	•		•	
(*) Nachweisgrenze nach dem MPN-Verfahren: 3 / Deckglas. Nach 2 x igem Unterschreiten dieser Grenze wurden die gesamten 10ml untersucht.				
< 3: In <i>Anreicherung</i> E. coli nachgewiesen			< 3: Durch <i>ELISA</i> oder <i>PCR</i> Shigatoxinbildung nachgewiesen	

+ : Nachweis von *Escherichia coli* in *Bunter Reihe* bzw. von Shigatoxinbildung durch *ELISA* oder *PCR*.

- : kein Keim-, Toxin- oder Toxingennachweis

• : Versuchende

4.1.3. Tenazität der Prüfstämme in sterilisierter Sporenerde

In **Tabelle 15** sind die Nachweiszeiten der 4 Prüfstämme in sterilisierter Sporenerde dargestellt. Drei der vier Prüfstämme (E.coli-Wildtyp, Stx1- und Stx2-Stamm) erzielten bei Versuchsabbruch wegen Mangel an weiterem Probenmaterial eine einheitliche Nachweiszeit von 423 Tagen. Auch hier fiel die Überlebenszeit des Laborstammes (ATCC-Stamm) mit 84 Tagen am kürzesten aus.

Tabelle 15				
Überlebenszeit von Escherichia coli in Sporenerde				
Intervall zu Versuchsbeginn	E. coli: „Wildtyp“	E. coli: ATCC-Stamm	E. coli: EHEC / Stx 1	E. coli: EHEC / Stx 2
0	$4,3 \times 10^6$	$4,3 \times 10^5$	$1,5 \times 10^6$	$4,3 \times 10^5$
1	$>10^5$	$>15^6$	10^8	$>10^5$
2	$>10^6$	10^7	10^7	$4,6 \times 10^6$
3	$>10^6$	$>10^6$	$>10^6$	$>10^6$
4	$>10^6$	$>15^5$	10^7	$>10^5$
6	10^7	10^8	$2,8 \times 10^6$	10^8
8	$1,5 \times 10^7$	$4,3 \times 10^6$	$1,5 \times 10^7$	$2,4 \times 10^7$
15	$3,6 \times 10^6$	$1,5 \times 10^6$	$3,6 \times 10^6$	$1,5 \times 10^7$
21	10^8	$7,5 \times 10^6$	$4,6 \times 10^7$	$4,3 \times 10^7$
28	$4,6 \times 10^7$	$7,5 \times 10^5$	$2,9 \times 10^6$	$3,6 \times 10^6$
44	$2,4 \times 10^7$	$2,3 \times 10^5$	$2,1 \times 10^6$	$2,9 \times 10^6$
57	$2,4 \times 10^6$	$7,3 \times 10^3$	$9,3 \times 10^5$	$7,3 \times 10^5$
84	< 3 (*)	< 3 (*)	< 3 (*)	< 3 (*)
99	< 3	-	< 3	< 3
133	+	-	+	+
169	+	•	+	+
203	+		+	+
238	+		+	+
275	+		+	+
302	+		+	+
336	+		+	+
373	+		+	+
423	+		+	+
(*) Nachweisgrenze nach dem MPN-Verfahren: 3 / Gramm Sporenerde. Nach 2 x igem Unterschreiten dieser Grenze wurden die gesamten 10 ml untersucht.				
< 3: In Anreicherung E. coli nachgewiesen			< 3: Durch ELISA oder PCR Shigatoxinbildung nachgewiesen	

+ : Nachweis von *Escherichia coli* in Bunter Reihe bzw. von Shigatoxinbildung durch ELISA oder PCR.

- : kein Keim-, Toxin- oder Toxingennachweis

• : Versuchende

4.1.4. Tenazität der Prüfstämme in Oberflächenwasser

Die Übersicht der Überlebenszeiten von apathogenen und pathogenen E.coli in natürlich belassenem Oberflächenwasser ist in **Tabelle 16** dargestellt. Auch bei diesem Versuch zeigten sich vergleichbar lange Überlebenszeiten für den E.coli-Wildtyp (40 Tage) und den Stx1-Stamm (47 Tage). Der Stx2-Stamm war nur 25 Tage, der ATCC-Stamm sogar nur 7 Tage nachweisbar. Die Ausgangskeimzahlen betragen bei allen Prüfstämmen $>10^7$ Organismen/ 100ml Wasser und wurden bis unterhalb der Bestimmungsgrenze nach dem MPN-Verfahren ermittelt.

Tabelle 16				
Überlebenszeit von Escherichia coli in Oberflächenwasser				
Intervall zu Versuchsbeginn	E. coli: „Wildtyp“	E. coli: ATCC-Stamm	E. coli: EHEC / Stx 1	E. coli: EHEC / Stx 2
0	$2,4 \times 10^7$	10^8	$2,4 \times 10^7$	$4,6 \times 10^7$
1	$2,4 \times 10^7$	$2,4 \times 10^7$	$2,4 \times 10^6$	$1,5 \times 10^7$
2	$1,5 \times 10^7$	$2,1 \times 10^5$	$4,3 \times 10^6$	$9,3 \times 10^4$
4	$4,3 \times 10^5$	4 300	$9,3 \times 10^4$	$4,3 \times 10^4$
5	$9,3 \times 10^4$	2 400	$2,4 \times 10^5$	9 300
6	$2,4 \times 10^5$	930	$2,4 \times 10^5$	$7,3 \times 10^4$
7	$2,4 \times 10^5$	2 400	$9,3 \times 10^4$	2 400
11	$2,4 \times 10^4$	< 250 (*)	9 300	930
13	$4,6 \times 10^4$	< 250	$2,4 \times 10^4$	430
15	$4,6 \times 10^4$	< 250	$2,4 \times 10^4$	< 250 (*)
19	$2,4 \times 10^4$	< 250	$9,3 \times 10^4$	< 250
21	4 600	-	$9,3 \times 10^4$	< 250
25	4 600	-	10^4	< 250
33	2 100	•	10^4	-
40	4 600		2 400	-
47	-		< 250	•
57	-		-	
64	•		-	
91			•	
(*) Unterschreiten der natürlichen E. coli-Ausgangskonz. von 250 /100 ml Wasser				
< 250: In <i>Bunter Reihe</i> keine Differenzierung der zugeimpften Prüfstämme möglich			< 250: Durch <i>ELISA</i> oder <i>PCR</i> Shigatoxinbildung nachgewiesen	

- : kein Keim-, Toxin- oder Toxingennachweis

•: Versuchende

Im Vorversuch zur Feststellung einer möglichen Ausgangskonzentration bzw. Verunreinigung durch E. coli oder EHEC in natürlich belassenem Oberflächenwasser konnte eine E. coli-Ausgangskonzentration (kein EHEC) von 250 Organismen / 100 ml Wasser nach dem MPN-Verfahren ermittelt werden. Bei Unterschreiten der Ausgangskonzentration ist eine Differenzierung zwischen den zugeimpften E. coli-Prüfstämmen ohne Shigatoxinbildung und der natürlichen Verunreinigung des Oberflächenwassers mit E. coli nicht mehr möglich. Ein Nachweis der EHEC-Stämme läßt sich mit dem ELISA oder PCR-Methode weiterhin führen.

4.1.5. Tenazität der Prüfstämme in sterilisiertem Oberflächenwasser

In der **Tabelle 17** sind die Überlebenszeiten der Bakterienstämme in sterilisiertem Oberflächenwasser zu sehen. Mit 283 Tagen erzielte der E.coli-Wildtyp zusammen mit dem Stx2-Stamm die längste Überlebenszeit. Der Stx1-Stamm war 177 Tage, der ATCC-Stamm 28 Tage nachweisbar. Die Ausgangskeimzahlen betragen bei dieser Versuchsanordnung $>10^6$ Organismen/ 100 ml Wasser und fielen im Versuchsverlauf unter die Bestimmungsgrenze von 30 Organismen/ 100 ml Wasser nach der MPN-Methode ab.

Tabelle 17				
Überlebenszeit von Escherichia coli in sterilisiertem Oberflächenwasser				
Intervall zu Versuchsbeginn	E. coli: „Wildtyp“	E. coli: ATCC-Stamm	E. coli: EHEC / Stx 1	E. coli: EHEC / Stx 2
0	$4,3 \times 10^6$	$9,3 \times 10^6$	$9,3 \times 10^6$	$4,3 \times 10^6$
1	$9,3 \times 10^6$	$2,4 \times 10^7$	$9,3 \times 10^6$	$2,4 \times 10^7$
2	$4,3 \times 10^6$	10^8	$9,3 \times 10^6$	$4,6 \times 10^7$
3	$9,3 \times 10^6$	$2,4 \times 10^7$	$9,3 \times 10^6$	$4,6 \times 10^7$
4	$2,4 \times 10^6$	$2,4 \times 10^7$	$9,3 \times 10^6$	10^8
6	$9,3 \times 10^5$	$4,6 \times 10^7$	$4,3 \times 10^6$	10^8
7	$9,3 \times 10^5$	$9,3 \times 10^6$	$2,4 \times 10^6$	$4,3 \times 10^6$
10	$9,3 \times 10^6$	$9,3 \times 10^6$	$9,3 \times 10^6$	10^8
14	$4,3 \times 10^6$	$>10^6$	$4,6 \times 10^6$	10^8
16	10^7	$>10^6$	$4,6 \times 10^4$	$2,4 \times 10^7$
20	$1,5 \times 10^6$	$>10^6$	$>10^6$	$>10^6$
22	$4,3 \times 10^6$	$9,3 \times 10^6$	$9,3 \times 10^6$	10^8
28	$2,4 \times 10^6$	$3,6 \times 10^4$	$1,5 \times 10^7$	$4,3 \times 10^7$
35	$4,6 \times 10^6$	-	$2,1 \times 10^6$	$4,4 \times 10^6$
51	$4,6 \times 10^6$	-	$3,6 \times 10^6$	$2,3 \times 10^6$
57	<30 (*)	•	<30 (*)	<30 (*)
64	<30		<30	<30
91	<30		<30	<30
107	<30		<30	<30
141	<30		<30	<30
177	<30		<30	<30
211	<30		-	-
246	<30		-	-
283	<30 ⊗		•	<30 ⊗
(*) Nachweisgrenze nach dem MPN-Verfahren: 30 / 100 ml Wasser.				
< 30: In Anreicherung E. coli nachgewiesen			< 30: Durch ELISA oder PCR Shigatoxinbildung nachgewiesen	

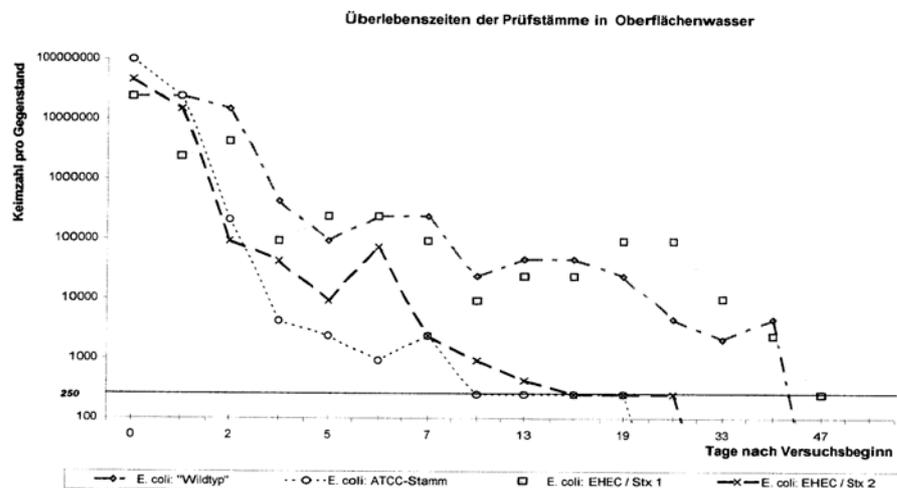
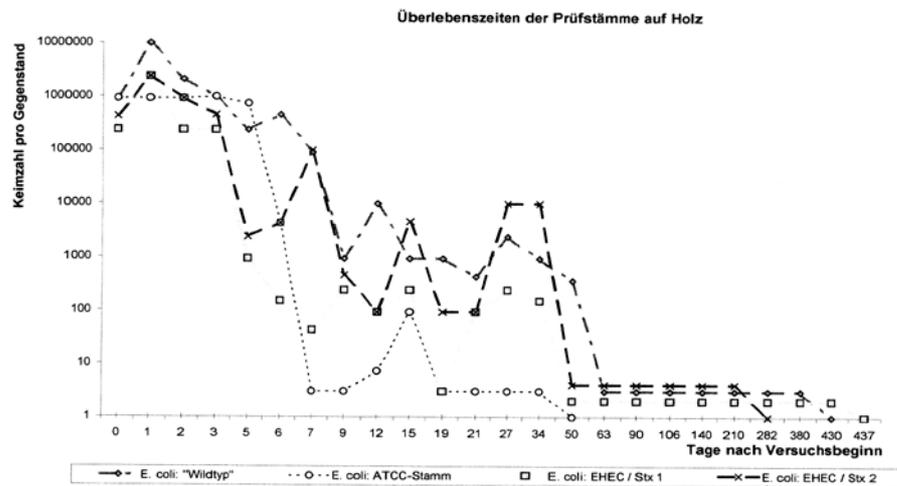
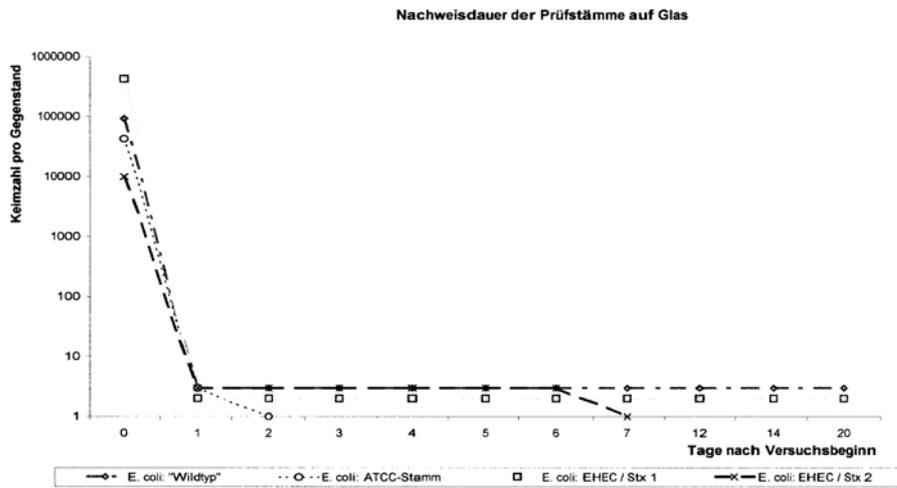
⊗: Abschließende Filtration von 1000ml Wasser, Nachweis des Shigatoxingens (stx₂) durch PCR im Fall des EHEC-Stammes.

- : kein Keim-, Toxin- oder Toxingennachweis

•: Versuchende

4.1.6. Zusammenfassung der Untersuchungsergebnisse zur Tenazität

Eine zusammenfassende Darstellung der Tenazität der E.coli-Prüfstämme unter den verschiedenen Versuchsbedingungen geben Diagramm 1 und Tabelle 18.



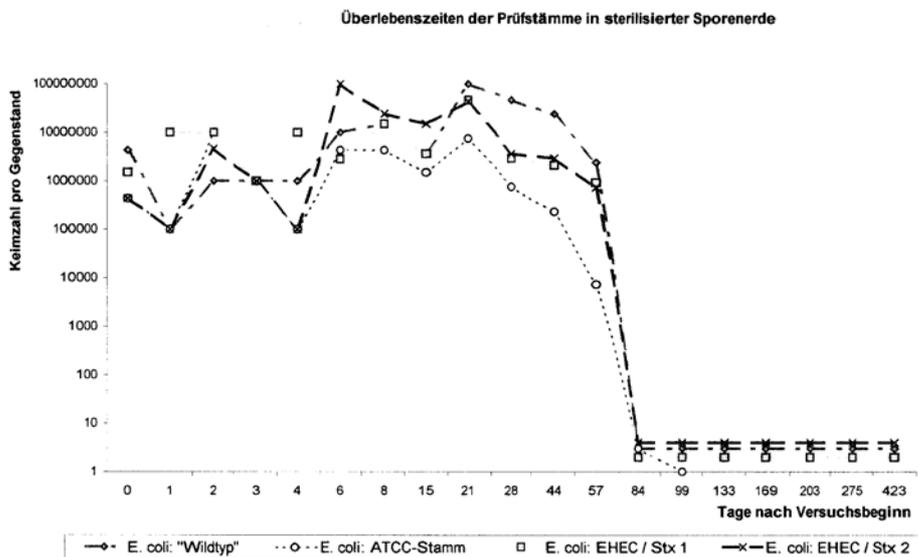
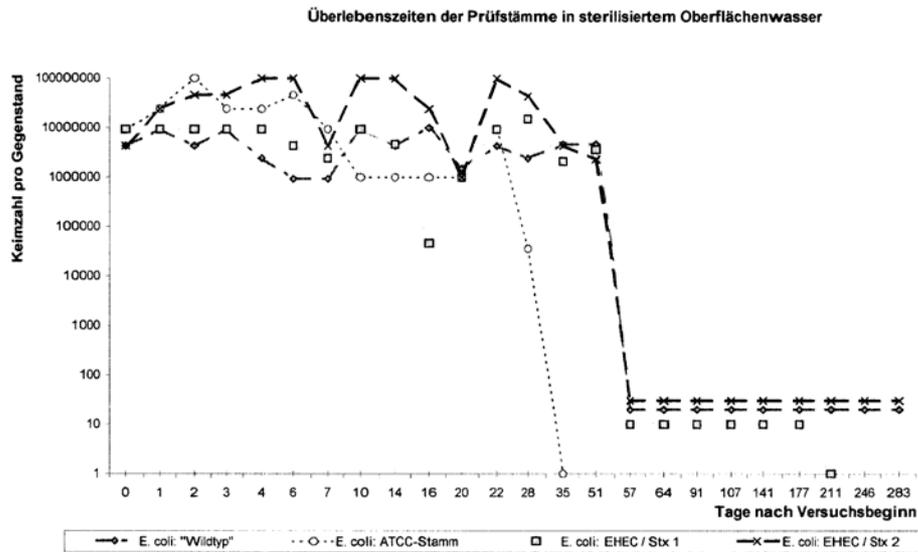


Diagramm 1

Graphische Darstellung der Überlebenszeiten von E.coli: „*Wildtyp*“, E.coli: *ATCC-Stamm*, E.coli: *EHEC / Stx1* und E.coli: *EHEC / Stx2* in Oberflächenwasser (Flußwasser) vor und nach Sterilisation, in sterilisierter Sporenerde sowie auf sterilisiertem Gebrauchsgegenstand mit rauher (Holz) und glatter (Glas) Oberfläche. Die Lagerung aller Proben erfolgte bei Raumtemperatur ($20 \pm 2^\circ\text{C}$). Ein Teil der Proben (Zahnstocher, Glas sowie Sporenerde) wurden abgedunkelt aufbewahrt, während das Wasser bei Tageslicht in Glasflaschen gelagert wurde. Aufgrund im Vorversuch ermittelter E. coli-Ausgangskonzentration von 250 Organismen/ 100 ml Flußwasser, konnte in der Versuchsanordnung mit Oberflächenwasser der Nachweis für die E. coli-Stämme ohne Shigatoxinbildung nur bis zu einem Unterschreiten dieser Konzentration geführt werden (Vergrößerte graphische Darstellung im Anhang).

	Tabelle 18 Max. Nachweiszeit (Tage) der Prüfstämme in bzw. auf verschiedenen Medien				
	Glatte Oberfläche* (Deckglas)	Rauhe Oberfläche* (Zahnstocher)	Flußwasser (natürlich belassen)	Flußwasser*	Sporenerde*
Stx 1 (peritrich begeißelt)	20	430	47	177	423
Stx 2	6	210	25	283	423
Wildtyp (kein EHEC)	20	380	40	283	423
ATCC-Stamm (kein EHEC)	< 1	34	7	28	84

* : sterilisiert vor Beimpfung

283: Gennachweis in PCR bei abschließender Filtration von 1000ml

430: Toxinnachweis in ELISA nach zwei negativen Ergebnissen

Zusammenfassend läßt sich feststellen:

- Die Überlebensfähigkeit der Prüfstämme war auf glatter Oberfläche (Glas) erheblich geringer als auf rauher Oberfläche (Holz) bzw. in saugfähigem Material (Sporenerde).
- Sterilisiertes Flußwasser bot den Keimen erheblich bessere Überlebensbedingungen als natürliches Oberflächenwasser.
- Der Laborstamm wies unter allen Versuchsbedingungen die schlechteste Überlebensfähigkeit auf.

4.2. Untersuchung von Vogelkotproben auf Shigatoxin-bildende Escherichia coli (STEC)

Von den 186 gesammelten Kotproben von Enten, Gänsen, Schwänen und Möwen konnte in keiner einzigen Probe EHEC nachgewiesen werden. In sieben Fällen ergab der ELISA bei der Erstuntersuchung Werte im Grenzbereich (OD: 0,100-149), die mit der PCR nicht bestätigt werden konnten. Diese Proben wurden daher bei der Auswertung als negativ beurteilt. Das Ausgangsmaterial für den ELISA und die PCR wurde jeweils aus dem selben GN-Bouillonansatz entnommen (s. Tabelle 19).

Tabelle 19
Nachweis von Shigatoxinen im ELISA bzw. Shigatoxingenen in der PCR

	<i>Graugänse</i>	<i>Höcker-Schwäne</i>	<i>Lach-, Sturmmöwen</i>	<i>Stockenten</i>	<i>Summe</i>
Kotproben	31	20	29	106	186
Nachweis von Stx1 / Stx2 in ELISA	-	-	-	-	-
Grenzwertige Ergebnisse: OD 0,100-0,149 in ELISA			3	4	7



Nachweis von <i>stx</i>₁ / <i>stx</i>₂ in PCR	-	-	-
--	---	---	---

5. Diskussion

5.1. Zur Methodik

Neben dem Nachweis von Shigatoxinen durch den Stx-ELISA, der den wichtigsten phänotypischen Marker für EHEC darstellt, sowie dem Nachweis der verantwortlichen Toxingene durch die Stx-PCR ist auch die Isolierung Shigatoxin produzierender E. coli-Stämmen mit kulturellen Nachweismethoden Ziel der Labordiagnostik. Dies trifft besonders für den klassischen O157:H7 zu. Mit Hilfe des Sorbitol-MacConkey-Agars (SMAC) gelingt beispielsweise auch der Nachweis von nicht Sorbitol fermentierenden O157:H7.

Eine andere Möglichkeit zur Identifizierung von EHEC-Varianten verschiedener Serovare (O111, O26, O157 etc.) gelingt durch ihre charakteristische Fähigkeit zur Hämolyse auf Enterohämolysin-Agar. Allerdings besteht bei diesen Serovaren zwischen EHEC-Hämolysinbildung und Shigatoxinproduktion nur eine Korrelation von 60-87%, bei anderen E.coli-Serovaren fehlt sie dagegen völlig [Schmidt 1995, Seite 1055f; Boerlin 1998, Seite 2553f]. Weitere Verfahren zur Erregerisolierung sind der Kolonien-Immunoblot und die Kolonienblot-Hybridisierung.

Für die EHEC-Serovare gilt jedoch grundsätzlich, daß naturgemäß eine breite Palette von EHEC-Varianten vorliegt. Der Grund liegt in der Kodierung der Pathogenitätsfaktoren auf mobilen genetischen Elementen, wie z.B. der Pathogenitätsinsel LEE, die in verschiedenen Bakterien auftreten und sich frei kombinieren können [Tschäpe 1995, Seite 441; Bockemühl 1997, Seite 195].

In der Literatur beschriebene Untersuchungen von EHEC-Serogruppen, die im Stuhl EHEC-infizierter Personen nachgewiesen werden konnten, zeigten eine Vielzahl von Serogruppen bei den EHEC-Stämmen an. Mit diagnostischen Methoden, die sich dem Nachweis bestimmter Serogruppen widmen, wird folglich ein großer Teil der EHEC-Infektionen nicht erfaßt. Screening-Methoden auf EHEC sollten daher mit einem Serotyp-unabhängigen Verfahren erfolgen [Bockemühl 1997, Seite 196; Karch 1996, Seite 125]. Dies ist über den Nachweis von Shigatoxinen (mit ELISA oder Verozelltest) oder Toxingenen (mit PCR) möglich.

Des weiteren stellt sich die Frage nach der Keimzahl, ab der eine Erfassung von Shigatoxin im ELISA ermöglicht wird. Zur Erfassung geringster Keimzahlen ist eine Voranreicherung in oder auf geeigneten Nährmedien zwingend erforderlich. Diese Anreicherung der EHEC-Bakterien hat sich nicht nur zur Isolierung von EHEC-Stämmen sondern besonders beim Screening auf Toxingene mit Hilfe der PCR bzw. auf Shigatoxine im ELISA als notwendig erwiesen. Die Ergebnisse direkter Stuhlausstriche (ohne Voranreicherung) sind sowohl bei der PCR als auch beim ELISA auf Grund eines hohen Anteils falscher Ergebnisse weniger gut geeignet.

Einen Überblick zur Labordiagnostik von EHEC-Infektionen geben die im Anhang aufgeführten Empfehlungen des Robert Koch-Instituts [RKI 2003, http://www.rki.de/INFEKT/INF_A-Z/RATGEBER/RAT6.HTM].

ELISA

Der ELISA läßt sich mit geringem Aufwand auf Mikrotiterplatten durchführen. Nach Voranreicherung der Proben in einem Flüssignährmedium und Bebrütung über Nacht läßt sich innerhalb weniger Stunden ein aussagekräftiges Ergebnis erzielen. Die Nachweisrate liegt dabei nur geringfügig unterhalb des Verozelltests. Die Empfindlichkeit des ELISA reicht jedoch nicht aus um bei negativen Ergebnissen eine EHEC-Infektion sicher auszuschließen. Dies kann erst durch die PCR erfolgen [Kehl 1997, Seite 2051; Allerberger 1996, Seite 545].

PCR

In der Empfindlichkeit ist die PCR dem ELISA deutlich überlegen. Die seuchenhygienische Bedeutung der PCR-positiven Ergebnisse bei fehlendem Toxinnachweis ist jedoch noch nicht geklärt. Der große Vorteil der PCR besteht darin, daß sie noch bei sehr geringen Keimzahlen im Probenansatz zu klaren Ergebnissen führt. Einige wenige spezifische DNA-Sequenzen reichen bereits aus, um mit Hilfe der PCR einen Gennachweis zu erbringen. Selbst bei einer Shigatoxinbildung unterhalb der Nachweisgrenzen des ELISA, können mit der PCR kleinste Mengen Shigatoxinproduzierender Erreger noch erfaßt werden. Außerdem werden alle Stx-Gen tragende E. coli-Stämme, auch diejenigen ohne aktive Toxinbildung, in der PCR nachgewiesen, während der Toxinnachweis im ELISA negativ ausfällt. Intermittierende phänotypische Shigatoxinnachweise bei unverändert positiver PCR haben diesen Vorteil belegt. Bei dieser Serovar-unabhängigen Methode werden nicht nur alle Serogruppen gleichermaßen erfaßt, sondern darüber hinaus lassen sich durch die PCR sogar spezifische Pathogenitätsfaktoren von EHEC-Stämmen wie z.B. Enterohämolysin oder das hitzestabile Enterotoxin EAST nachweisen. Ein limitierender Faktor im Vergleich zum ELISA ist jedoch der höhere Zeitaufwand bei dem Routineinsatz der PCR. Kleinere Probenmengen sind dabei noch gut zu bewältigen, während bei großen Probenzahlen (>50) die zeitliche sowie apparative Bewältigung dieses Verfahrens problematisch ist. Hier greift die viel preiswertere und in der Handhabung einfachere Methode des ELISA.

5.2. Tenazität der EHEC

Der Imitation realer Umweltbedingungen, gemessen an den vorherrschenden Zuständen während eines Krankheitsausbruches z.B. in Kindertagesstätten, sollte einerseits durch die Wahl alltäglicher Gebrauchsgegenstände (Glasoberflächen bzw. Holz) und andererseits durch Lagerung bei Zimmertemperatur und unter UV-Schutz Rechnung getragen werden. Beachtet wurde auch, daß alle Proben vor der Lagerung gleichmäßig an der Luft trockneten, um ein feuchtes Milieu und somit eine möglicherweise längere Überlebenszeit in einzelnen Proben auszuschließen. Dadurch wurden nahezu gleiche Ausgangsbedingungen geschaffen.

Zur genaueren Differenzierung der Überlebensfähigkeit der vier untersuchten E. coli-Stämme wurden konträre Umweltbedingungen und Umweltpollen verschiedenster Beschaffenheit gewählt: flüssig / fest – sterilisiert / natürlich belassen – rauhe / glatte Oberfläche.

Bei den Versuchsanordnungen auf den verschiedenen Medien wurden jeweils Shigatoxin-bildende E.coli (EHEC) mit E.coli-Stämmen ohne Produktion von Shigatoxin verglichen, um eine diskutierte höhere Resistenz der EHEC-Stämme gegenüber widriger Umweltfaktoren überprüfen zu können. Eine höhere Widerstandsfähigkeit würde sich dabei in längeren Nachweiszeiten zeigen. Die Ergebnisse der Versuchsreihen zeigten jedoch keine wesentlichen Unterschiede in den maximalen Nachweiszeiten der pathogenen EHEC. In dieser Arbeit konnten EHEC-Stämme keine höhere Widerstandsfähigkeit beweisen.

Im Vergleich der beiden EHEC-Stämme (Stx1 / Stx2), war der Stx1-produzierende Stamm in der natürlich belassenen Flußwasserprobe und auf Gebrauchsgegenständen mit rauher/ glatter Oberfläche länger überlebensfähig (s. **Tabelle 18**). Der Grund für die längere Überlebensfähigkeit kann in der Begeißelung des Stx1-produzierenden Stammes (O11: H48) gelegen haben, der dadurch im Gegensatz zu dem Stx2-Stamm mobil war. Es ist vorstellbar, daß die Mobilität einen Vorteil z.B. durch Chemotaxis darstellte, und dadurch auch zu einer höheren Überlebensdauer beigetragen haben könnte.

5.2.1. Auf festen Gegenständen

Über EHEC-Infektionen durch Übertragung von Mensch zu Mensch wurde schon in mehreren Fällen berichtet. Mensch zu Mensch-Übertragungen kommen vor allem in Kindertagesstätten vor [Verweyen 2000, Seite 78f]. Ein Beispiel hierfür liefert der Ausbruch in Minnesota 1988, der in Verbindung stand mit ungenügend gekochtem Fleisch an einer Junior High School. Insgesamt 32 Krankheitsfälle wurden erfaßt, darunter ein 12 Jahre alter Junge, dessen Mutter in einer Kindertagesstätte arbeitete. Etwa 1 Woche nach Erkrankung des Jungen entwickelten zwei Kleinkinder der Kindertagesstätte eine hämorrhagische Kolitis. Dabei konnte E.coli O157:H7 aus den Stuhlproben nachgewiesen werden [Belongia 1993, Seite 883].

Bei diesem Beispiel einer Infektionskette kommt neben einer direkten Kontaktinfektion auch eine sekundäre Übertragung der Bakterien durch fäkalkontaminierte Oberflächen in Frage. Bei der Übertragung könnten z.B. Gebrauchsgegenstände unterschiedlicher Oberflächenbeschaffenheit wie z.B. glatte Oberflächen von Glas- u. Stahlgegenständen oder rauhe Oberflächen von Holzgegenständen eine Rolle gespielt haben. Dabei ist die

Überlebensfähigkeit von E. coli bzw. EHEC auf unterschiedlichen Oberflächen von besonderem Interesse bei der Beurteilung der Infektionsgefahr, die von den Gebrauchsgegenständen ausgeht.

Besonders in Kindertagesstätten liegt die Gefahr einer fäkal-oralen Schmierinfektion nahe, da das Hygienebewußtsein bei den Altersgruppen zwischen 3 und 5 Jahren wohl noch nicht ausgeprägt ist und ein sorgfältiges Händewaschen nach Defäkation noch nicht erfolgt. Es ist anzunehmen, daß durch den intensiven, natürlichen und ungezwungenen Kontakt der Kinder untereinander eine hohe Übertragungswahrscheinlichkeit besteht. Hier ist besonderes Augenmerk auf die permanente Reinigung von Spielzeug zu legen. Von anderen Gegenständen, wie z.B. Speisegeschirr und Trinkgläsern geht wohl ein geringeres Infektionsrisiko aus, da diese ausreichend gereinigt werden (z.B. Spülmaschine). Kinderkrippen, in denen Kleinst- und Kleinkinder einen weit höheren Betreuungs- und Überwachungsbedarf im Hygieneverhalten benötigen, fordern eine besondere Pflege und Reinigung der Gebrauchs- und Einrichtungsgegenstände. Sorgfalt gilt besonders der Reinigung von Oberflächen, die prädestiniert sind für eine fäkale Kontamination. Hierzu gehören vor allem Oberflächen im sanitären Bereich wie beispielsweise Klobrillen, Waschbecken sowie Wasserhähne, aber auch häufig berührte Oberflächen im häuslichen Bereich, wie z. B. Türgriffe. Neben diesen Oberflächen ist die tägliche Reinigung der Flaschensauger und meistgenutzten Spielzeuge dringend zu empfehlen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zur Überlebensfähigkeit auf Gebrauchsgegenstand mit glatter Oberfläche, verwendet wurde trockenes Glas, erbrachten eine Nachweisdauer von 20 Tagen für E. coli sowie für EHEC (s. **Tabelle 14**). Es gibt hier Vergleichsuntersuchungen, die sogar eine Überlebensfähigkeit des Bakteriums über 2 Monate auf trockenem Edelstahl beweisen konnten [Keevil und Hudson 1997, Seite 2086]. Stahloberflächen, wie sie beispielsweise in Großküchen vorkommen, müssen daher neben anderen glatten Oberflächen über diesen langen Zeitraum als Infektionsquelle bei epidemiologischen Überlegungen berücksichtigt werden.

Auffallend lang fielen die Nachweiszeiten auf Gebrauchsgegenstand mit rauher Oberfläche aus, bei dem trockene Holzzahnstocher verwendet wurden. Drei der untersuchten vier Prüfstämme, nämlich der „Wildtyp“, der Stx 1- und der Stx 2-Typ“ überlebten 210 Tage (s. Tabelle 13). Von diesen drei Prüfstämmen ließen sich der E. coli „Wildtyp“ 380 Tage, der Stx 1- sowie der Stx 2-Stamm 430 Tage nachweisen. Diese langen Nachweiszeiten, bei denen die Keimzahlen zwar zuletzt unter der Nachweisgrenze nach der MPM-Methode lagen, beinhalten dennoch aufgrund des Nachweises von E. coli-Bakterien in der Bunten Reihe bzw. von Shigatoxinbildung in dem Elisa ein Infektionsrisiko über einen Zeitraum von mindestens 210 bis max. 430 Tagen. Dies läßt an eine Infektionsgefahr von mehr als 1 Jahr, ausgehend z.B. von Holzspielzeug, denken und ermahnt dazu Reinigungsmaßnahmen bei entsprechenden Gegenständen ggf. besonders intensiv durchzuführen.

5.2.2. In Erde

Erst ein Vergleich der unterschiedlichen Überlebenszeiten in den verschiedenen Medien ermöglicht eine Gewichtung der Infektionsgefahr, die von kontaminierten festen Gegenständen, von Wasser oder auch von Erdreich ausgeht, und erlaubt genauere Aussagen über die möglichen Infektionsketten. Das Überleben der Bakterien in der Erde wird von vielen Faktoren beeinflusst. Diese Faktoren können z.B. die Zusammensetzung des Erdreiches, der Wassergehalt, der pH-Wert, die Temperatur sowie das Vorhandensein anderer Mikroorganismen sein. Negativ auf das Wachstum der Bakterienpopulation kann

sich auch Austrocknung sowie UV-Strahlung auswirken. In der vorliegenden Arbeit wurde die Sporenerde autoklaviert, um residente Mikroorganismen, die einen negativen Einfluß auf das Überleben der E. coli-Stämme haben könnten, auszuschalten. Das Fehlen kompetitiver Bakterien, z.B. bei der Nahrungsaufnahme, kann möglicherweise besonders gute Ausgangsbedingungen schaffen und sich positiv auf das Wachstum der Population auswirken.

Jiang et al. haben in einer Studie das Wachstum von E.coli O157:H7 in mit Rinderkot gedüngter Erde untersucht. Dabei wurde ein Teil der Erdproben vor Düngung und Beimpfung autoklaviert. Die Bakterien konnten in den autoklavierten Proben länger überleben und sich sogar vermehren, was die Autoren auf fehlende Konkurrenz durch andere Mikroorganismen zurückführten [Jiang 2002, Seite 2605]. Bei einer Temperatur von 21°C überlebte E.coli O 157:H 7 bis zu 231 Tage. Damit haben die Ergebnisse von Jiang gezeigt, daß E.coli bzw. EHEC in sterilisierter Erde zu besonders langem Überleben fähig sind. Maule konnte das Überleben von E. coli O 157 über 130 Tage bei 18°C in natürlich belassenem, grabbewachsenem Erdreich nachweisen [Maule 2000, Seite 71].

Bei den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Medien konnten die längsten einheitlichen Nachweiszeiten in autoklavierter Sporenerde erzielt werden. Die Nachweiszeiten für den E. coli-„Wildtyp“ sowie die beiden EHEC-Stämme betragen einheitlich 423 Tage (s. Tabelle 15). Nur in der Versuchsanordnung mit rauher Oberfläche konnten diese langen Nachweiszeiten von einem Bakterienstamm (EHEC/Stx 1) mit 430 Tagen erreicht werden. Allerdings waren nach einer Frist von 423 Tagen alle bereit gestellten Sporenerdeproben aufgebraucht, so daß dieser Zeitraum nur als untere Grenze für die Überlebenszeit von E. coli in Erde zu betrachten ist.

Alle vier Prüfstämme konnten in Erde über den langen Zeitraum von 57 Tagen sogar quantitativ erfaßt werden. Die Keimzahlen lagen dabei nach 57 Tagen bei $7,3 \times 10^3$ koloniebildenden Einheiten (KBE) für den E. coli-Laborstamm sowie bei $2,4 \times 10^6$ KBE für den E. coli-„Wildtyp“. Bei einem Ausgangswert von $4,3 \times 10^6$ KBE hatte über 57 Tage fast keine Abnahme der Bakterienzahl stattgefunden. Während dieser Zeit konnten sich alle Bakterienstämme sogar um 1-2 Zehnerpotenzen vermehren. Die dargelegten Studien verdeutlichen, daß auch bei ungünstigen Umweltbedingungen wie z.B. Austrocknung ein Überleben von EHEC in Erdreich über einen Zeitraum von mindestens 4 Monaten bis über 1 Jahr möglich ist. Von kontaminiertem Erdreich geht verglichen mit den übrigen Medien somit über den längsten Zeitraum ein Infektionsrisiko aus. Über kontaminiertes Erdreich kann es während dieses langen Zeitraums zur Verschmutzung von Vegetabilien kommen, die sowohl auf landwirtschaftlichen Nutzflächen als auch in Kleingärten Bestandteil der Nahrungskette des Menschen werden können. Auch eine Reinfektion von Rinderbeständen ist durch Futterpflanzen denkbar (vgl. **Abbildung 2**).

5.2.3. In Wasser

Seit 1991 kam es in den USA wiederholt zu Ausbrüchen von EHEC-Infektionen, die in Zusammenhang mit dem Schwimmen in Badegewässern standen und an eine Übertragung z.B. durch orale Aufnahme kontaminierten Wassers denken ließen. Untersuchungen erbrachten bei zwei der Ausbrüche [Keene 1994, Seite 579; Ackman 1997, Seite 1f], daß die Wasserkontamination mit E. coli O 157: H 7 von infizierten Schwimmern ausging. Im Juli 1995 kam es im Bundesstaat Illinois erneut zu einem Ausbruch, bei dem 12 EHEC – Infektionen, darunter ein Fall von HUS, nachgewiesen werden konnten. Diese Ausbrüche veranlaßten die lokalen Gesundheitsbehörden zu einer Reihe von Untersuchungen, die u.a. die Konzentrationen und Überlebenszeiten von E. coli in Badewasser überprüften. Das

Überleben von E.coli O157:H 7 in Seewasser ließ sich dabei bis zu einem Monat nachweisen.

Ein Vergleich mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit zur Überlebenszeit in natürlich belassenem Oberflächenwasser (s.**Tabelle 16**) zeigt ähnlich lange Nachweiszeiten. Bei hohen Ausgangskonzentrationen von $>10^7$ /100 ml Wasser betrug die Überlebenszeit von E. coli bzw. EHEC unter Laborbedingungen sogar 40 Tage. Maule konnte das Überleben von E. coli O 157 über 27 Tage in Flußwasser nachweisen [Maule 2000, Seite 71]. Berücksichtigt man die Temperaturabhängigkeit, lassen sich nach den Ergebnissen von Wang u. Doyle bei niedriger Wassertemperatur von 8°C ein Großteil der Bakterien mehr als 80 Tage lang nachweisen [Wang und Doyle 1998, Seite 662]. Bei höherer Wassertemperatur von 25°C konnte ein Großteil der Bakterien ebenfalls über einen Monat nachgewiesen werden und somit die Gültigkeit der Ergebnisse vorliegender Arbeit unterstrichen werden. Eine Darstellung der Überlebenszeiten von E. coli O 157 : H 7 in Abhängigkeit von der Wassertemperatur gibt **Tabelle 20**.

Tabelle 20

Überleben von E.coli O157:H7 in Wasser [n. Wang und Doyle 1998, Seite 664]
Inokulum 10^3 Organismen/ml

Sorte Wasser und Aufbew.temp.	Aufbewahrungszeit in Wochen		
	4	8	12
<i>Trinkwasser</i>			
8°C	2,2*)	1,9	1,8
15°C	2,4	1,5	0,4
25°C	2,3	0,4	0,3
<i>Wasser Badesee</i>			
8°C	2,0	1,9	1,7
15°C	1,8	1,5	0,3
25°C	1,2	< 0,3	< 0,3

*) Anzahl E.coli in \log_{10} Einheiten

Verglichen mit den Überlebenszeiten in sterilisiertem Wasser weisen E.coli bzw. EHEC in natürlich belassenem Wasser eine kürzere Überlebenszeit auf. Möglicherweise weil unbehandeltes Flußwasser eine natürliche Population an kompetitiven Mikroorganismen beinhaltet. Dies würde bedeuten, daß sich auch in flüssigen Medien die Konkurrenz durch andere Mikroorganismen negativ auf das Überleben von E.coli bzw. EHEC auswirkt.

Neben den Überlebenszeiten sind auch die Bakterienkonzentrationen, die zu einem Krankheitsausbruch führen können, ausschlaggebend. Bei den Untersuchungen in Illinois im Juli 1995 betrug die Konzentration an E. coli 660 bis 900 Organismen/100 ml Badewasser. Bei dem damaligen Ausbruch wurde der Badestrand einen Monat lang wegen zu hohen Konzentrationen von über 500 Coliformen/100 ml Wasser gesperrt. Grundsätzlich richten sich die Aussagen über die Wasserqualität nach der Konzentration sogenannter Indikatorkeime, für die in den EG-Richtlinien über die Qualität der Badegewässer Leit- und Grenzwerte festgelegt sind. Zum einen zählen hierzu die *Fäkalcoliformen* bzw. *E.coli*, die eine frische fäkale Verunreinigung nachweisen. Die beiden Begriffe bezeichnen dabei dieselbe Bakterienart. Zum anderen die *Gesamtcoliformen* bzw. *Coliformen*, die Indikatoren sowohl für eine bereits länger zurückliegende fäkale Verunreinigung als auch allgemein für Verunreinigungen oder eine

Eutrophierungstendenz sind. Eine Konzentration von 500 Gesamtcoliformen (=Coliformen) bzw. von 100 Fäkalcoliformen (=E. coli) /100 ml Badewasser ist auch als Leitwert für die Badegewässer in den EG-Richtlinien sowie der Bayerischen Badegewässerverordnung vorgegeben [EG-Richtlinie Nr. C112, 1994; Bayer. Gesetzes-u. Verordnungblatt Nr.15, 1998, Seite 506]. Während die Qualitätsanforderungen eine Einhaltung der Leitwerte bei 80 v. H. der entnommenen Wasserproben während einer Badesaison fordern, dürfen bei 95 v. H. der entnommenen Proben die jeweiligen Grenzwerte nicht überschritten werden. Diese liegen bei 10 000 Gesamtcoliformen bzw. 2000 Fäkalcoliformen pro 100 ml Wasser.

Bei dem untersuchten Oberflächenwasser in dieser Arbeit betrug die natürliche Ausgangskonzentration an E. coli bereits 250/100 ml Wasser, so daß der genannte kritische Wert von über 500 Organismen/100 ml Badewasser wohl leicht zu erreichen ist. Schon nach einem Gewitter kann es in der Nähe von Städten, wenn zur Entlastung der städtischen Kanalisation Mischwasser in die Flüsse gelangt und die Abschwemmungen von den Feldern einfließen, zu einer schlagartigen Überschreitung der Grenzwerte kommen.

Daraus läßt sich bei Verdacht auf eine badewasserassoziierte EHEC-Infektion eine potentielle Infektionsgefahr in Gewässer über mindestens 4-6 Wochen auch ohne Neueinträge erwarten.

Laut Wang und Doyle konnte E.coli O157 bei den meisten durch Wasser verursachten Krankheitsausbrüche aus dem Stuhl der erkrankten Patienten nicht aber aus der für kontaminiert gehaltenen Wasserquelle isoliert werden [Wang und Doyle 1998, Seite 662]. Ein möglicher Grund dafür wäre, daß Bakterien ihren Stoffwechsel sowie ihre physiologischen Eigenschaften ändern können. Dieses Verhalten erlaubt den Bakterien unter unwirtlichen Umweltbedingungen zu überleben. Die Untersuchungen von Wang u. Doyle haben dabei ergeben, daß sich die Eiweißzusammensetzung der Außenmembran von E. coli während der Aufbewahrung ändert und die Organismen in Folge dessen in eine nicht kultivierbare Form übergehen können. Die Veränderungen der bakteriellen Membran repräsentieren eine Überlebensstrategie, die auch bei anderen gramnegativen Bakterien bekannt ist. Eine Reihe von Umweltfaktoren, zu nennen wären Temperatur, Nährstoffgehalt, Salzgehalt, osmotischer Druck aber auch pH-Wert, könnten den Übergang in eine widerstandsfähigere aber nicht kultivierbare Form des Bakteriums einleiten. Den Überlegungen von Wang u. Doyle zu Folge sind die so veränderten Bakterien möglicherweise dennoch in der Lage Krankheiten zu verursachen. Für eine Reihe anderer pathogener Bakterien, hierunter *Vibrio cholerae* [Colwell 1985, Seite 817], *Vibrio fischeri* [Lee 1995, Seite 278], *Pasteurella piscicida* [Magarinos 1994, Seite 180] und *Shigella dysenteriae* [Rahman 1996, Seite 115] konnte bereits bewiesen werden, daß diese Bakterien auch in nicht kultivierbarem Zustand die Fähigkeit besitzen eine Infektion herbeizuführen [Oliver 1993, Seite 239f].

Ein Vergleich aufgeführter Literaturdaten mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit bestätigt epidemiologische Überlegungen, die eine Übertragung von E. coli durch Badesowie Trinkwasser für möglich halten, und läßt darüber hinaus auf die Gefahr der Krankheitsübertragung auch nach Versagen kultureller Nachweismethoden schließen.

Daher muß vor allem auf präventive Maßnahmen zur Vermeidung bzw. zur Reduktion einer möglichen fäkalen Kontamination von Badewasser geachtet werden. Solche präventiven Maßnahmen können das Verbot der Ausbringung von Wirtschaftsdünger in ufernahen Bereichen, die Bereitstellung angemessener sanitärer Einrichtungen, die Einrichtung von Wickelstuben für Kleinkinder in Badeanstalten und das Badeverbot für Badegäste mit gastrointestinalen Erkrankungen sein. Für Kleinkinder, die noch nicht alleine zum Toilettengang fähig sind, muß eine Kontrolle zur Hygiene Einhaltung durch Erwachsene gewährleistet sein oder ebenfalls ein Badeverbot ausgesprochen werden.

5.3. Nachweis in Vogelkotproben

Als humanpathogene Erreger haben EHEC erst in jüngster Zeit, aufgrund ihrer Fähigkeit den Darm von Wiederkäuern wie z.B. Rindern, Schafen und Ziegen zu kolonisieren, eine weite Verbreitung in der Umwelt erreicht und sich seit ihrer Entdeckung 1977 als Zoonoseerreger etabliert [Wang 1996, Seite 2567; Bülte 1997, Seite 109]. In weltweiten Untersuchungen konnten EHEC-Serovare aus bis zu 50 % der Kotproben von Rindern isoliert werden [Richter 1997, Seite 121f]. Einige in Deutschland durchgeführten Untersuchungen zu den aus Rinderkot isolierten EHEC-Stämmen zeigten zudem, daß in bis zu 70 % der Fälle alle typischen Pathogenitätsmerkmale der EHEC-Bakterien zu finden waren [Wieler 1996, Seite 2980].

Ähnlich hohe Prävalenzraten fand man auch bei anderen Wiederkäuern (v. a. Ziegen und Schafe). Seltener (in weniger als 5 % der Proben) wurden EHEC aus Kotproben anderer domestizierter Tierarten wie Schweine, Hunde, Katzen, Pferde und Geflügel, vereinzelt auch von Rehen, Antilopen, Wildschweinen, Kaninchen, Waschbären, Fasanen, Tauben, Möwen, Wildgänsen und sogar aus Fliegen isoliert [Baljer 1999, Seite 341]. Wegen ihrer Mobilität könnten Fliegen, Tauben, Zugvögel und andere Vogelarten den Erreger über große Strecken verschleppen und dadurch besondere Bedeutung für die Verbreitung von EHEC in der Umwelt erlangen. Wasservögel könnten beispielsweise zur EHEC-Besiedlung von Oberflächenwasser in Badeseen beitragen.

Einige Wasservogelarten wie z. B. die Schwarzkopfmöwe haben die Vorzüge urbaner Ballungszentren, deren Mülldeponien ihnen als Nahrungsquelle dienen, entdeckt. Gemeinsam mit Enten und Schwänen bevölkern sie Naherholungsgebiete sowie Ausflugsziele und hinterlassen dort ihren Kot. Die Wasservögel könnten sich hier z.B. über mit menschlichen Fäkalien verschmutztes Badewasser mit den EHEC-Bakterien infizieren, was Fenlon mit Salmonellen nachweisen konnte [Fenlon 1983, Seite 47]. Die Vögel müssen dabei keinerlei Krankheitssymptomen aufweisen, können aber als Erregerreservoir der Verbreitung der Bakterien in der Umwelt sowie der Übertragung auf Haustiere [Coulson 1983, Seite 437] und Menschen [Varslot 1996, Seite 3366] dienen.

Eine entsprechende Infektionskette konnte bereits im Falle von *Campylobacter jejuni* nachgewiesen werden, dessen Übertragung auf den Menschen bei einigen Krankheitsausbrüchen von mit Vogelkot verschmutztem Wasser ausging [Hasselvedt 1996]. Für diesen humanpathogenen Erreger gelten Wasservögel (Enten, Gänse und Möwen) sogar als die in der Natur am weitesten verbreiteten Erregerreservoir. Ebenso konnten andere Vogelarten wie Tauben und Krähen als Träger dieser Darmbakterien identifiziert werden. Weitere Studien über die Verbreitung von humanpathogenen Bakterien haben gezeigt, daß unter den Wasservogelarten v.a. Möwen als Erregerreservoir für Salmonellen, *Campylobacter* und andere enteropathogene Bakterien in Betracht gezogen werden müssen [Fenlon 1981, Seite 195; Kapperud 1983, Seite 375; Ito 1988, Seite 467f; Hubalek 1995, Seite 21f; Palmgren 1997, Seite 565].

Palmgren untersuchte in einer schwedischen Studie 151 Wildvögel, darunter 50 Möwen, auf enteropathogene Bakterien. Dabei konnten 4,9% der Schwarzkopfmöwen als Träger von *Salmonella typhimurium* identifiziert werden. Insgesamt 3% der Kotproben enthielten *Campylobacter jejuni*. EHEC konnten in dieser Studie nicht nachgewiesen werden [Palmgren 1997, Seite 566].

Wallace jedoch gelang auch der Nachweis von EHEC O157 in migrierenden Vogelarten (Brandgänse, Möwen) in England. Dabei wurden von insgesamt 691 isolierten Bakterienstämmen, die hauptsächlich von Möwen stammten, 1,9% als E. coli O157 erkannt [Wallace 1997, Seite 401]. Dies zeigt, daß neben Salmonellen und Campylobacter auch EHEC bei diesen Spezies vorkommen.

In der vorliegenden Arbeit wurden Wasservogelbestände hierzulande im Hinblick auf ihre Bedeutung als potentielle Infektionsquelle für EHEC untersucht. Unter den 186 Vogelkotproben von Möwen, Stockenten, Graugänsen und Höckerschwänen konnten in keinem einzigen Fall Shigatoxin-bildende E.coli-Stämme nachgewiesen werden. Daraus läßt sich eine nur sehr geringe bzw. fehlende Durchseuchung der Wasservögel mit EHEC ableiten. Die Ergebnisse deuten darauf hin, daß zumindest die untersuchten Wasservogelbestände keine herausragende Rolle als Erregerreservoir für EHEC spielen.

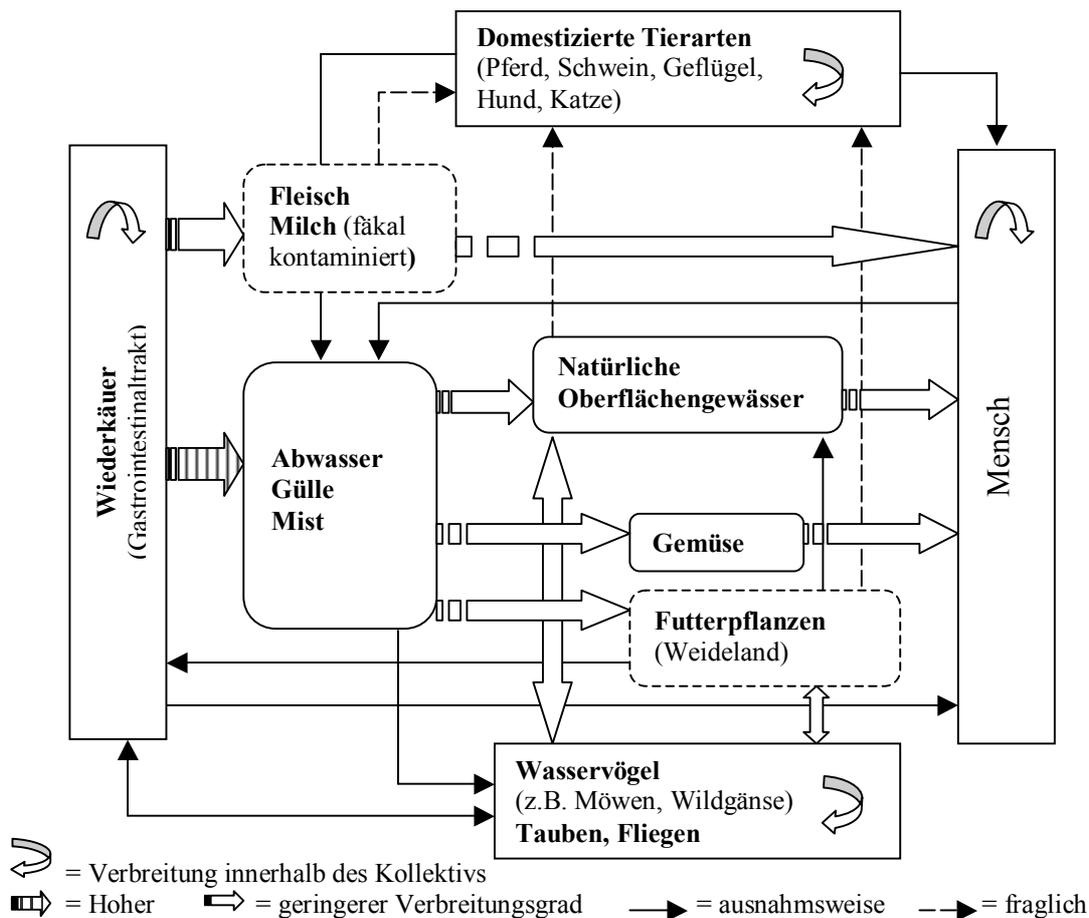
Nach bisheriger Datenlage läßt sich zusammenfassend über die Verbreitung in Tierreservoirs sagen, daß nach Richter bis zu 50% der Kotproben von Rindern sowie nach Baljer weniger als 5% der Kotproben von Pferden, Hunden, Schweinen, Katzen und Geflügel Shigatoxin-bildende E.coli-Stämme (STEC) enthalten. Die Prävalenz in Wasservogelbeständen ist in England mit max. 1,9% nach Wallace vergleichsweise gering. Hierzulande stellen nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit Wasservögel keine signifikante EHEC-Kontaminationsquelle für Badegewässer dar.

5.4. Wichtigste EHEC-Infektionsquellen

Für die Verbreitung von EHEC-Bakterien in der Umwelt ergeben sich nach Erfassung von Daten aus Umweltuntersuchungen folgende in Abbildung 2 dargestellte Infektionsketten. Eine Schlüsselrolle dabei spielen Wiederkäuer, darunter v.a. Rinder.

Abbildung 2

Verbreitungswege von *E. coli* (EHEC) in der Umwelt [n. Baljer 1999, Seite 341]



In Rinderbeständen kommen oft symptomlose Ausscheider vor, die eine Infektionsquelle für eine direkte oder indirekte Übertragung von EHEC auf Haustiere und Menschen darstellen. Dieser epidemiologische Zusammenhang konnte erst kürzlich durch eine Untersuchung von Bielaszewska nachgewiesen werden. Hierbei wurden genotypisch und phänotypisch identische Stämme bei erkrankten Menschen und den als Infektionsquelle dienenden Rindern festgestellt [Bielaszewska 2000, Seite 3470].

Einerseits ist der direkte Kontakt zu infizierten Tieren durch deren Haltung als landwirtschaftliche Nutztiere gegeben, andererseits kommt es zu einer indirekten Übertragung der Erreger durch fäkale Kontamination tierischer und pflanzlicher Lebensmittel.

Direkte Tierkontakte sind abgesehen von der Tierhaltung beispielsweise in Streichelzoos, bei Besuchen auf dem Bauernhof oder bei der Tierverarbeitung in Schlachthöfen möglich. Unter den tierischen Lebensmitteln spielen v.a. Rohmilch- und Rohfleischprodukte bzw. ungenügend hitzebehandelte Milch- und Fleischprodukte als Infektionsquelle eine Rolle [Allerberger 1997, Seite 669]. EHEC besiedeln beim lebenden Tier nicht die inneren Organe oder das Muskelfleisch und werden auch nicht über die Milch ausgeschieden, sondern sind obligate Darmbewohner. Das eigentliche Risiko für den Verbraucher stellt daher eine fäkale Kontamination von Lebensmitteln dar. Diese kann während der Gewinnung, Verarbeitung, Lagerung, beim Transport und beim Verkauf von Lebensmitteln geschehen. Daraus ergeben sich folgende hygienische Maßnahmen, die bereits 1997 von der WHO als Richtlinien zur Nahrungsmittelverarbeitung aufgestellt wurden [WHO-Report 1997, Seite 252f]:

- 1) Verwendung von einwandfreiem Trinkwasser zur Nahrungsmittelherstellung;
- 2) Striktes Einhalten von Hygienevorschriften beim Umgang mit Schlachtvieh;
- 3) Verbesserte Hygienestandards während des Schlachtvorgangs;
- 4) Ordnungsgemäße Nahrungsmittelverarbeitung;
- 5) Gründliches Erhitzen leicht verderblicher Nahrungsmittel bzw. roher Lebensmittel tierischer Herkunft (v.a. Rohmilch- u. Rohfleischprodukte) vor dem Verzehr;
- 6) Ausbildung Angestellter der Lebensmittelindustrie, der Schlachthöfe und der Landwirtschaft nach den Richtlinien und unter Einhaltung der Nahrungsmittelhygiene;

Neben tierischen Lebensmitteln haben auch pflanzliche eine Bedeutung als EHEC-Infektionsquellen. EHEC-Bakterien können über den Stuhl bzw. Kot von infizierten Menschen und Tieren in die Umwelt gelangen und über fäkal kontaminiertes Oberflächenwasser, Abwasser oder Dung zur Verschmutzung von Vegetabilien (Gemüse u. Futterpflanzen) führen [Gallien 1998, Seite 26].

Pflanzliche Lebensmittel können aber nicht nur oberflächlich nach Düngung mit tierischem Kot kontaminiert, sondern auch im Pflanzengewebe nach Aufnahme fäkal kontaminierten Wassers mit EHEC infiziert sein. Bisherige Hygieneempfehlungen der WHO und des Robert Koch-Instituts, Rohkost vor dem Verzehr sorgfältig mit Trinkwasser abzuwaschen, sind dann ineffektiv, da sich EHEC-Stämme im Pflanzengewebe dem Zugriff entziehen [Itoh 1998, Seite 1532].

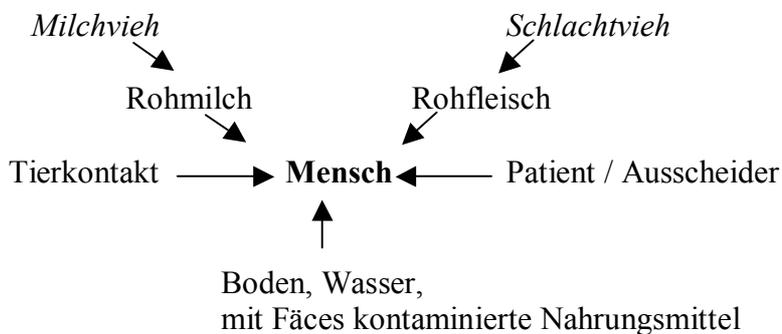
Rinderkotabschwemmungen von Tierweiden sowie der Stuhl infizierter Schwimmer können direkt zur Verschmutzung von Oberflächenwasser (z.B. Badegewässer) führen, daß nicht nur indirekt über verschmutzte Vegetabilien sondern auch direkt über orale Aufnahme durch den Schwimmer zur Ausbreitung der Infektion führen kann. Wasser, das aus den Kläranlagen in den Vorfluter fließt, ist ein weiterer potentieller Lieferant der EHEC-Bakterien. Eine Ausbreitung der Erreger über Düngung mit tierischen Fäkalien führt nicht nur zur Kontamination von Vegetabilien auf landwirtschaftlichen Nutzflächen sondern auch in Kleingärten.

Für den Menschen ergeben sich aus den genannten Verbreitungswegen für EHEC in der Umwelt hauptsächlich folgende in Abbildung 3 dargestellten Infektionsquellen. Eine orale Infektion kann entweder direkt oder indirekt erfolgen über:

- 1) den Verzehr von fäkal kontaminierten Lebensmitteln (v.a. Rohmilch-, Rohfleischprodukte u. Gemüse);
- 2) den Kontakt zu infizierten Menschen und Tieren (v.a. Wiederkäuer);
- 3) die Aufnahme von fäkal kontaminiertem Oberflächenwasser (z.B. beim Baden).

Abbildung 3

EHEC-Infektionsquellen für den Menschen:



Außerdem ist nach gegenwärtigem Kenntnisstand nicht auszuschließen, daß die Bakteriophagen, welche die Gene für Shigatoxine tragen, selbst infektiös sind. Nach oraler Aufnahme können sie die residente E.coli-Darmflora lysogenisieren und zur Toxinbildung befähigen. In diesem Falle bräuchte zwischen den Shigatoxin-produzierenden E. coli (STEC) im Viehbestand als dem eigentlichen Erregerreservoir und den durch Phagentransfer daraus entstandenen STEC beim Menschen keine Übereinstimmung im Serotyp zu bestehen [Beutin 1997, Seite 2175; Bockemühl 1996, Seite 290]. Die sich daraus ergebenden neuen Möglichkeiten der schnellen Verbreitung von Shigatoxingenen konnten durch Untersuchungen von Bakteriophagen aus Abwasser nachgewiesen werden [Muniesa 1998, Seite 2443]. Stx 2-Gen tragende Bakteriophagen wurden in hohen Konzentrationen von 1–10 / ml Abwasser nachgewiesen. Bei dieser Untersuchung reichten außerdem kleinste Volumina von 0,02 ml Abwasser aus, um daraus Bakteriophagen anzureichern, die ihr Stx 2-Gen auf E.coli-Stämme übertragen konnten. Derartige Untersuchungen von evolutionären Prozessen, die zur Entstehung der EHEC und ihrer vollen Virulenz geführt haben, können unser Verständnis zur Dynamik der Entstehung neuer Krankheitserreger erweitern.

Häufig kann wegen der relativ langen Latenzzeit zwischen Ingestion der Bakterien und Ausbruch einer HUS-Erkrankung (ca. 3-12 Tage) der genaue Übertragungsweg nicht mehr ermittelt werden. Erschwerend kommt hinzu, daß die Infektionsdosis sehr niedrig zu sein scheint und möglicherweise weniger als 100 Einzelorganismen beträgt [Paton 1996, Seite 1622]. Derart geringe Mengen labortechnisch nachzuweisen scheint nur sehr schwer durchführbar. Epidemiologische Zusammenhänge werden oft nur erkannt, wenn Erkrankungshäufung in einem eng zusammenlebenden Kollektiv auftritt. Da auch wieder genesene Patienten den Erreger noch einige Wochen ausscheiden können, lassen sich kaum

Rückschlüsse auf die primäre Infektionsquelle ziehen. Daher ist die umfassende Aufklärung über mögliche Infektionsquellen zur Vorbeugung von EHEC-Infektionen von großer Bedeutung.

Die Öffentlichkeit muß umfassend über die Gefahren beim Verzehr von unpasteurisierter Milch, ungenügend gekochtem/gebratenem Fleisch und der Bedeutung des Händewaschens nach dem Umgang mit rohen Fleischprodukten aufgeklärt werden. Bei der Gewinnung und Weiterverarbeitung bis zum Verkauf von Lebensmitteln ist ein striktes Einhalten von Hygienevorschriften unbedingt nötig. Leicht verderbliche Lebensmittel bzw. rohe Lebensmittel tierischer Herkunft (z.B. Milcherzeugnisse, Feinkostsalate, Mettwurst u.s.w.) sollten bis zu ihrem Verzehr stets kühl gelagert werden. Einen sicheren Schutz vor einer Lebensmittelinfektion mit EHEC bietet das Erhitzen der Nahrungsmittel auf 70 °C (Kerntemperatur) für 10 Minuten vor dem Verzehr. Außerdem sollten Fleischprodukte zur Vermeidung einer Kreuzkontamination nicht mit den selben Arbeitsgeräten oder auf den gleichen Arbeitsflächen zeitgleich mit den übrigen zum Verzehr bestimmten Speisen verarbeitet werden. Da sogar von glatten kontaminierten Arbeitsoberflächen bis zu zwei Monaten eine Infektionsgefahr ausgehen kann (s. Absch. 5.2.1.), sollten Arbeitsflächen vor einer Weiterverwendung gründlich gereinigt werden. Auf den Verzehr ungenügend erhitzter Lebensmittel tierischer Herkunft sollten insbesondere Kinder, ältere Menschen, Schwangere und immunsupprimierte Personen verzichten. Fäkal-orale Schmutz- und Schmierinfektionen können durch striktes Einhalten der Händehygiene nach der Zubereitung roher Fleischprodukte sowie nach dem Kontakt zu Tieren und infizierten Menschen weitgehend verhindert werden. Besonders der Kontakt von Kleinkindern zu Tieren, z.B. beim Besuch von Streichelzoos oder Bauernhöfen, sollte nur unter Aufsicht von Erwachsenen stattfinden.

Laut Informationen des Robert-Koch-Instituts (RKI) wurden EHEC-Bakterien bei 3,2% der sporadisch aufgetretenen Durchfallerkrankungen in Deutschland nachgewiesen [RKI 2003, http://www.rki.de/INFEKT/INF_A-Z/RATGEBER/RAT6.HTM]. Weltweit stellen diese Bakterien besonders in Industriestaaten mit hochentwickelter Landwirtschaft und Nahrungsmittelproduktion sowohl ein gesundheitliches als auch zunehmend ein volkswirtschaftliches Problem dar. EHEC gilt als einer der gefährlichsten E.coli-Pathovaren. In den USA geht man nach Schätzungen des *Centers for Disease Control* von 60000-73000 jährlichen Infektionsfällen durch O157:H7 in Nahrungsmitteln aus [CDC 2003, http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/escherichiacoli_g.htm]. Über 1800 dieser Krankheitsfälle müssen stationär therapiert werden, in 52-61 Fällen tritt sogar der Tod ein [FSIS 2002, <http://www.fsis.usda.gov/oa/background/ec0902.htm>].

Die Zukunft liegt in der Prävention von EHEC-Infektionen, hierbei gibt es Ansätze zur Immunisierung. Zu diesem Zweck wurde die physiologische Immunantwort im Serum symptomatischer Patienten untersucht. Li konnte die Antikörperbildung gegen Intimin sowie gegen EspA und EspB nachweisen [Li 2000, Seite 5090]. Die Bildung von Antikörpern gegen diese Virulenzfaktoren läßt die Vermutung zu, daß sich diese bakteriellen Strukturen zur Immunisierung gegen EHEC-Infektionen einsetzen lassen. Dies würde einen bedeutenden Schritt auf der Suche nach Präventivmaßnahmen darstellen. Zukünftig müssen alle Faktoren, die das Infektionsrisiko während der Tierhaltung, in der Landwirtschaft, in der Gastronomie oder in Privathaushalten erhöhen könnten durch Aufklärung und gezielter Zusammenarbeit auf den verschiedenen Ebenen erkannt und ausgeschaltet werden.

6. Zusammenfassung

Zur Feststellung der Überlebensfähigkeit von enterohämorrhagischen Escherichia coli (EHEC) in der Umwelt und zur Bestimmung tierischer Erregerreservoirs wurden folgende Untersuchungen durchgeführt:

1. Mit Hilfe von ELISA und PCR wurden die Persistenz von zwei EHEC-Stämmen im Vergleich mit zwei E.coli-Stämmen ohne Shigatoxin-Bildung in bzw. auf folgenden Medien bestimmt (s. **Tabelle 18**):

- a) Auf sterilisierten Gegenständen mit rauher Oberfläche (Holz).
- b) Auf sterilisierten Gegenständen mit glatter Oberfläche (Glas).
- c) In sterilisierter Sporenerde.
- d) In natürlich belassenem sowie sterilisiertem Oberflächenwasser.

Die maximale Überlebensdauer der beiden EHEC-Stämme bei Raumtemperatur ($20 \pm 2^\circ\text{C}$) betrug auf Holz 430 / 210 Tage, auf Glas 20 / 6 Tage, in sterilisierter Sporenerde ≥ 423 / ≥ 423 Tage, in Oberflächenwasser 47 / 25 Tage und in sterilisiertem Oberflächenwasser 177 / ≥ 283 Tage für den jeweiligen Stamm.

Ein E.coli-„Wildtyp“ (Isolat aus Oberflächenwasser ohne Shigatoxin-Bildung) wies unter den Versuchsbedingungen ähnlich lange Überlebenszeiten wie die EHEC-Stämme auf; hingegen zeigte ein E.coli-Laborstamm ohne Shigatoxin-Bildung (ATCC 11775) in /auf allen Medien eine deutlich geringere Tenazität.

2. Ferner wurden mit Hilfe von ELISA und PCR Kotproben von Wasservögeln auf das Vorkommen von EHEC-Bakterien untersucht (s. **Tabelle 19**).

Unter den 186 gesammelten Kotproben von Enten, Gänsen, Schwänen und Möwen konnte in keiner einzigen Probe EHEC nachgewiesen werden. Wie die Ergebnisse zeigen spielen zumindest hierzulande die untersuchten Wasservogelbestände als EHEC-Kontaminationsquelle für Badegewässer keine herausragende Rolle.

7. Literaturverzeichnis

- Ackman D., Marks S., Mack P., Caldwell M., Birkhead G., Root T.:** Swimming-associated hemorrhagic colitis due to *Escherichia coli* O157:H7 infection. *Epidemiol. Infect.* 119 (1997) 1-8.
- Akashi S., Joh K., Tsujii A.:** A severe outbreak of hemorrhagic colitis and haemolytic uraemic syndrome associated with *Escherichia coli* O157:H7 in Japan. *Eur. J. Pediatr.* 153 (1994) 650-655.
- Allerberger F., Rossboth D., Dierich M.P., Aleksic S., Schmidt H., Karch H.:** Prevalence and clinical manifestations of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in Austrian children. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 15 (1996) 545-550.
- Allerberger F., Söldner B., Caprioli A., Karch H.:** Enterohämorrhagische *Escherichia coli* und hämolytisch-urämisches Syndrom. *Wien. Klin. Wschr.* 109/17 (1997) 669-677.
- Baljer G., Pirro F., Wieler L.H., Failing K., Bauerfeind R.:** Neutralizing antibodies against Shiga-like toxins from *Escherichia coli* in colostrum and sera of cattle. *Vet. Microbiol.* 43/2-3 (1995) 131-141.
- Baljer G., Wieler L.H.:** Tiere als Infektionsquelle für den Menschen durch EHEC hervorgerufene Erkrankungen. *Dtsch. tierärztl. Wschr.* 107 (1999) 339-343.
- Bayer. Staatsministerien für Landesentwicklung und Umweltfragen sowie für Arbeit u. Sozialordnung, Familie, Frauen u. Gesundheit:** Verordnung über die Qualität der Badegewässer (Bayerische Badegewässerverordnung-BayBadeGewV) vom 20. Juli 1998. *Bayer. Gesetz- und Verordnungsblatt* Nr. 15 (1998) 504-508.
- Bell B.P., Goldoft M., Griffin P.M.:** A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7-associated bloody diarrhea and haemolytic uraemic syndrome from hamburgers. *JAMA* 272 (1994) 1349-1353.
- Belongia E.A., Osterholm M.T., Soler J.T.:** Transmission of *Escherichia coli* O157:H7 infection in Minnesota child day care facilities. *JAMA* 269 (1993) 883-888.
- Beutin L., Geier D., Steinruck H.:** Prevalence and some properties of verotoxin (Shiga-like-toxin)-producing *Escherichia coli* in seven different species of healthy domestic animals. *J. Clin. Microbiol.* 31 (1993) 2483-2488.
- Beutin L., Geier D., Zimmermann S., Aleksic S., Gillespie H. A., Whittam S.:** Epidemiological relatedness and clonal types of natural populations of *E. coli* strains producing shigatoxins in separate populations of cattle and sheep. *Appl. Environm. Microbiol.* 63 (1997) 2175-2180.
- Bielaszewska M., Schmidt H., Liesegang A., Prager R., Rabsch W., Tschäpe H., Cizek A., Janda J., Blahova K., Karch H.:** Cattle can be a reservoir of sorbitol-fermenting shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H(-) strains and source of human diseases. *J. Clin. Microbiol.* 38 (2000) 3470-3473.
- Bockemühl J., Karch H.:** Infektionen des Menschen durch enterohämorrhagischen *E. coli* (EHEC) in Deutschland, 1995. *Bundesgesundhbl.* 39 (1996) 290-296.

- Bockemühl J., Karch H., Tschäpe H.:** Infektionen des Menschen durch enterohämorrhagischen E. coli (EHEC) in Deutschland, 1996. Bundesgesundhbl. 40 (1997) 194-197.
- Boerlin P., Chen S., Colbourne J.K., Johnson R., deGrandis S., Gyles C.:** Evolution of EHEC hemolysin plasmids and the LEE in Shiga toxin-producing E coli. Infect. Immun. 66 (1998) 2553-2561.
- Bülte M.:** Infektionen durch enterohämorrhagischen E. coli (EHEC): Gefährdung des Verbrauchers. Münch. med. Wschr. 139 (1997) 109.
- Bundesministerium für Gesundheit und soziale Sicherheit:** Verordnung zur Novellierung der Trinkwasserverordnung vom 28.Mai 2001 BGBl I Nr. 24 (2001) 959-980.
- Centres for disease control (1992-93)** Update: multistate outbreak of Escherichia coli O157:H7 infections from Hamburgers-western United States, 1992-93. Morbid. Mortal. Weekly Rep. 42 (1992-93) 258-263.
- Centres for disease control (1993):** Escherichia coli O157:H7 outbreak linked to home cooked hamburger-California. Morbid. Mortal. Weekly Rep. 43 (1993) 213-215.
- Centres for disease control (2003):** *Escherichia coli* O157:H7. Frequently asked Questions
Website at: http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/escherichiacoli_g.htm
- Colwell R. R., Brayton P. R., Grimes D. J., Rozak D. R., Huq S. A., Palmer L. M.:** Viable but non-culturable *V. cholerae* and related pathogens in the environment: implication for release of genetically engineered microorganisms. Bio/Technology 3 (1985) 817-820.
- Coulson J. C., Butterfield L., Thomas C.:**The hering gull *Larus argentatus* as a likely transmitting agent of *Salmonella montevideo* to sheep and cattle. J. Hyg. Lond. 91 (1983) 437-443.
- Dell'Omo G., Morabito S., Quondam R., Agrimi U., Ciuchini F., Macri A., Caprioli A.:** Feral pigeons as a source of verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. Vet. Rec. 142 (1998) 309-310.
- Dev V.J., Main M., Gould I.:** Waterborne outbreak of *Escherichia coli* (Letter) Lancet 337 (1991) 1412.
- EG-Richtlinie:** Vorschlag für eine Richtlinie des Rates über die Qualität der Badegewässer vom 29.März.1994 (94/C 112/03). Amtsbl. EG Nr. C 112 (1994) 3-10.
- Fenlon D. R.:** A comparison of salmonella serotypes found in the faeces of gulls feeding at a sewage works with serotypes present in the sewage. J. Hyg. Lond. 91 (1983) 47-52.
- Fenlon D. R.:** Seagulls (*Larus* spp.) as vectors of salmonellae: an investigation into the range of serotypes and numbers of salmonellae in gulls faeces. J. Hyg. Lond. 86 (1981) 195-202.
- FSIS (Food Safety and Inspection Service), Congressional and Public Affairs Staff:** New measures to address E.coli O157:H7 contamination, backgrounders/ key facts, September 2002.
United States Department of Agriculture, Washington, D.C. 20250-3700.
Website at: <http://www.fsis.usda.gov/oa/background/ec0902.htm>
- Gallien P., Richter H., Klie, Helma, Timm, Marita, Karch H., Lehmann S., Perlberg K.-W., Teufel P., Protz D.:** Nachweis von Shigatoxin-produzierenden *Escherichia coli* (STEC) in Lebensmitteln und Charakterisierung der Isolate. Bundesgesundhbl. 41 (1998) 26-30.

- Hallmann L., Burkhardt F.:** Klinische Mikrobiologie
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1974, 4. Auflage, 648.
- Hasselvedt V., Blystad H., Kapperud G.:** MSIS Rapport 38 (1996).
- Hubalek Z., Sixl W., Mikulaskiva M., Sixl-Voigt B., Thiel W., Halouzka J.:**
Salmonella in gulls and other free-living birds in the Czech Republic.
Centr. Eur. J. Public Health 3 (1995) 21-24.
- Isaacson M., Canter P. H., Effler P., Aentzen L., Bomans P. and Heenon R.:**
Haemorrhagic colitis epidemic in Africa.
Lancet 341 (1993) 961.
- Ito K., Kubokura Y., Kaneko K., Totake Y., Ogawa M.:** Occurrence of Campylobacter jejuni in free-living birds from Japan.
J. Wildl. Dis. 24 (1988) 467-470.
- Itoh Y., Sugita-Konishi Y., Kasuga F., Iwaki M., Hara-Kudo Y., Saito N., Noguchi Y., Konuma H., Kumagai S.:** Enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 present in radish sprouts.
Appl. Environm. Microbiol. 64 (1998) 1532-1535.
- Jiang X., Morgan J., Doyle M.P.:** Fate of Escherichia coli O157:H7 in manure-amended soil.
Appl. Environm. Microbiol. 68 (2002) 2605-2609.
- Kapperud G., Rosef O.:** Avian wildlife reservoir of Campylobacter fetus subs. jejuni, Yersinia spp and Salmonella spp in Norway.
Appl. Environm. Microbiol. 45 (1983) 375-80.
- Karch H., Schmidt H., Schwarzkopf A.:** Enterohämorrhagische E. coli (EHEC).
Die gelben Hefte 36 (1996) 125-135.
- Keene W.E., McAnulty J.M., Hoesly F.C.:** A swimming-associated outbreak of hemorrhagic colitis caused by Escherichia coli O157:H7 and Shigella sonnei.
N. Engl. J. Med. 331 (1994) 579-584.
- Keevil B., Hudson M.:** Survival of Enterohemorrhagic E. coli (EHEC).
New Scientist 12 (1997) 2086.
- Kehl K.S., Havens P., Behnke C.E., Acheson D.W.K.:** Evaluation of the Premier EHEC assay for detection of Shiga toxin-producing Escherichia coli.
J. Clin. Microbiol. 35 (1997) 2051-2054.
- Kugler R., Busch U., Bayer M., Gerber L., Hellein G., Barankay V., Huber H.Ch.:**
Vergleich von ELISA, Verozelltest, PCR und immunmagnetischer Separation (IMS) in der Diagnostik von enterohämorrhagischen Escherichia coli (EHEC) in Stuhlproben.
Bundesgesundhbl. Sonderheft (1998) 13-19.
- Lee K.-H. and Ruby E. G.:** Symbiotic role of the viable but nonculturable state of Vibrio fischeri in Hawaiian coastal seawater.
Appl. Environm. Microbiol. 61 (1995) 278-283.
- Li Y., Frey E., Mackenzie A.M., Finlay B.B.:** Human response to Escherichia coli O157:H7 infection: antibodies to secreted virulence factors.
Infect. Immun. 68 (2000) 5090-5095.
- Magarinos B., Romalde J. L., Barja J. L., Toranzo A. E.:** Evidence of a dormant but infective state of the fish pathogen Pasteurella piscicida in seawater and sediment.
Appl. Environm. Microbiol. 60 (1994) 180-186.
- Maule A.:** Survival of verocytotoxigenic Escherichia coli O157:H7 in soil, water and on surfaces.
J. Appl. Microbiol. Symp. Suppl. 88 (2000) 71-78.

- McDaniel T.K., Jarvis K.G., Donnenberg M.S., Kaper J.B.:** A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 92 (1995) 1664-1668.
- McGowan K. L., Wickersham E. and Strockbine N. A.:** Escherichia coli O157:H7 from water. Lancet (1989) 967-968.
- MERCK Nährboden Handbuch,** Ausgabe 1990, 1-200.
- Munesia M., Jofre J.:** Abundance in sewage of bacteriophages that infect Escherichia coli O157:H7 and that carry the Shiga toxin 2 gene. Appl. Environm. Microbiol. 64 (1998) 2443-2448.
- Naglitsch F., Blüml Th.:** Biometrie
In: „Hygienisch-mikrobiologische Wasseruntersuchungen“,
Schulze E. (Hrsg.),
Gustav Fischer Verlag, Jena, 1996, 26-33.
- Oliver J. D.:** Formation of viable but non-culturable cells.
In: “Starvation in bacteria”,
Kjelleberg S. (ed.), Plenum Press, New York, 1993, 239-272.
- OXOID Handbuch,** Unipath GmbH (Hrsg.),
Wesel, 1993, 5.Auflage, 1-493.
- Palmgren H., Sellin M., Bergström S., Olsen B.:** Enteropathogenic bacteria in migrating birds arriving in Sweden.
Scand. J. Infect. Dis. 29 (1997) 565-568.
- Paton A.W., Rarcliff R., Doyle R.M., Seymour-Murray J., Davos D., Lanser J.A., Paton J.C.:** Molecular microbiological investigation of an outbreak of hemolytic-uremic syndrome caused by dry fermented sausage contaminated with Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli*.
J. Clin. Microbiol. 34 (1996) 1622-1627.
- Phillips A.D., Navabpour S., Hicks S., Dougan G., Wallis T., Frankel G.:** Enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 target Peyer's patches in humans and cause attaching/effacing lesions in both human and bovine intestine.
Gut. 47 (2000) 377-381.
- Pohl P., Daube G., Lintermans P., Kaeckenbeeck A., Mainil J.:** Description de 70 souches d'Escherichia coli d'origine bovine possédant les gènes des vérotoxines.
Ann. Med. Vet. 135 (1991) 267-272.
- Pradel N., Livrelli V., De Champs Ch., Palcoux J.-P., Reynaud A., Scheutz F., Sirot J., Joly B., Forestier Ch.:** Prevalence and characterization of shiga toxin-producing Escherichia coli isolated from cattle, food, and children during a one year prospectiv study in France.
J. Clin. Microbiol. 38 (2000) 1023-1031.
- Rahman I., Shahamat M., Chowdhury M. A. R. and Colwell R. R.:** Potential virulence of viable but nonculturable Shigella dysenteriae type 1.
Appl. Environm. Microbiol. 62 (1996) 115-120.
- Richter H., Klie, Helma, Timm, Marita, Gallien P., Steinrück H., Perlberg K.-W., Protz D.:** Verotoxinbildende E.coli (VTEC) im Kot von Schlachtrindern aus Deutschland.
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 110 (1997) 121-127.
- Riley L.W., Robert S.R., Steven D.H., McGee H.B., Wells J.G., Betty R.D., Richard J.H., Olcott E.S., Johnson L.M., Hargrett N.T., Blake P.A., Cohen M.L.:** Hemorrhagic colitis associated with rare Escherichia coli serotype.
N. Engl. J. Med. 308/12 (1983) 681-685.

- Robert Koch-Institut:** Falldefinitionen des Robert Koch-Instituts zur Übermittlung von Erkrankungs- oder Todesfällen und Nachweisen von Krankheitserregern. Bundesgesundhbl. 43 (2000) 845-869.
Im Internet: [-http://www.rki.de/INFEKT/IFSG/IFSG_FALLDEF.HTM](http://www.rki.de/INFEKT/IFSG/IFSG_FALLDEF.HTM)
- Robert Koch-Institut:** Ratgeber Infektionskrankheiten. Infektionen durch enterohämorrhagische Escherichia coli (EHEC), Stand 2003.
Im Internet: [-http://www.rki.de/INFEKT/INF_A-Z/RATGEBER/RAT6.HTM](http://www.rki.de/INFEKT/INF_A-Z/RATGEBER/RAT6.HTM)
- Schindler P.R.G.:** Coli und Coliforme.
In: „Hygienisch-mikrobiologische Wasseruntersuchungen“,
Schulze E. (Hrsg.),
Gustav Fischer Verlag, Jena, 1996, 36-53.
- Schindler P.R.G.:** MUG-Laurylsulfat-Bouillon – ein optimales Nachweismedium für gesamtcoliforme und fäkalcoliforme Bakterien im Rahmen der hygienischen Überprüfung von Badewasser gemäß der EG-Richtlinie 76/160 EWG.
Zbl. Hyg. 191 (1991) 438-444.
- Schmidt H., Beutin L., Karch H.:** Molecular analysis of the plasmid-encoded haemolysin of Escherichia coli O157:H7 strain EDL 933
Infect. Immun. 63 (1995) 1055-1061.
- Schmidt H., Montag M., Bockenmühl J., Heeseman J., Karch H.:** Shiga-like toxin II-related cytotoxins in *Citrobacter freundii* strains from humans and beef samples.
Infect. Immun. 61 (1993) 534-543.
- Schmidt H., Scheef J., Morabito S., Caprioli A., Wieler L.H., Karch H.:** A new Shiga toxin 2 variant (Stx 2f) from Escherichia coli isolated from pigeons.
Appl. Environm. Microbiol. 66 (2000) 1205-1208.
- Schwiens U.:** Der fluoreszenzoptische Nachweis von E. coli – Auswirkungen des pH auf die Fluoreszenzausbeute.
In: „Fluoreszenzoptische Nachweis von E. coli - Grundlagen u. Praxis.“ Merck Seminar Würzburg 1988,
Hofmann G., Schwien, U. (Hrsg.),
GIT-Verlag, Darmstadt, 1989, 24-34.
- Swerdlow D.L., Woodruff B.A., Brady R.C., Griffin P.M., Tippet S., Donnell D., Geldreich E., Payne B.J., Meyer A., Wells J.G., Greene K.D., Bright M., Bean N.H., Blake P.A.:** A waterborne outbreak in Missouri of Escherichia coli O157:H7 associated with bloody diarrhea and death.
Ann. Intern. Med. 117 (1992) 812-819.
- Tschäpe H., Prager R., Streckel W., Fruth A., Tietze E., Böhme G.:** Verotoxinogenic *Citrobacter freundii* associated with severe gastroenteritis and cases of haemolytic uraemic Syndrome in a nursery school: green butter as the infection source.
Epidemiol. Infect. 114 (1995) 441-450.
- Varslot M., Resell J., Fostad I.G.:** Water-borne outbreak of campylobacter infektion probably caused by pink-footed geese.
Tidsskr. Nor. Laegeforen 116 (1996) 3366-3369.
- Verweyen H.M., Karch H., Brandis M., Zimmerhackl L.B.:** Enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections: following transmission routes.
Pediatr. Nephrol. 14 (2000) 73-83.
- Verweyen H.M., Karch H., Garz C., Brandis M., Zimmerhackl L.B.:** Enterohämorrhagische Escherichia coli (EHEC): ein wichtiger Krankheitserreger für den Menschen. Kennen wir die Übertragungswege ?
Pädiatrie und Pädologie (1997) 198-205.
- Wallace J.S., Cheasty T., Jones K.:** Isolation of Verocytotoxin-producing Escherichia coli O157 from wild birds.
J. Appl. Microbiol. 82 (1997) 399-404.

- Wang G., Doyle P. M.:** Survival of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in water. *Journal of Food Protection* 61 (1998) 662-667.
- Wang G., Zhao T., Doyle P. M.:** Fate of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in bovine feces. *Appl. Environm. Microbiol.* 62 (1996) 2567-2570.
- WHO-Report, 28 April to 1 May 1997:** Based on: Prevention and control of EHEC infections (unpublished document WHO/FSF/FOS/97.6, available upon request from Director, programme of food safety and food aid, WHO, 1211 Geneva 27, Switzerland).
WHO Bulletin 76 (1997)245-255.
- Wieler L.H., Vieler E., Erpenstein C., Schlapp T., Steinrück H., Bauerfeind R., Byomi A., Baljer G.:** Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) from bovines: association of adhesion with the carriage of eae and other genes. *J. Clin. Microbiol.* 34 (1996) 2980-2984.
- Yamamoto T., Taneike I.:** The sequences of enterohemorrhagic *Escherichia coli* and *Yersinia pestis* that are homologous to the enteroggregative *E. coli* heat-stable enterotoxin gene: cross-species transfer in evolution. *Federation of European biochemical societies* 472 (2000) 22-26.

8. Anhang

Zu Seite 13:

Anhang zu 1.5. Diagnostik:

Als erprobtes diagnostisches Verfahren ist z.Z. ein Stufenplan empfohlen

(Bundesgesundheitsbl 43, 2000, Seite 310-317, im Internet: [-http//www.rki.de/INFEKT/IFSG/IFSG_FALLDEF.HTM](http://www.rki.de/INFEKT/IFSG/IFSG_FALLDEF.HTM)):

- Voranreicherung bzw. Anreicherung der EHEC-Bakterien in flüssigen Nährmedien unter Schütteln (+37°C 18 Std. ca. 160 rpm) oder auf geeigneten Indikatornährboden,
- Shigatoxin-ELISA zum Screenen aus der Anreicherungsbouillon (Beachte: der ELISA ist für den direkten Nachweis von Shigatoxinen im Stuhl von Durchfallpatienten ohne Voranreicherung bzw. Anreicherung ungeeignet)
- PCR-Nachweis von Shigatoxin-Genen oder Nachweis der Shigatoxine mit EIA-Techniken aus dem erhaltenen Bakterienrasen bzw. den Bakteriensuspensionen,
- Isolierung nach Anzucht auf Selektivnährmedien,
- Diskriminierung und Identifizierung einzelner Kolonien mit Hilfe des Immunoblots, der PCR und der Sondentechnik (Kolonie-Blot),
- Charakterisierung des isolierten Erregers hinsichtlich der Shigatoxinogenität durch PCR, ELISA oder Vero-Zellkultur, der Adhäsine, der Serotypie, ggf. auch andere epidemiologische Subtypisierungen.
- Serologische Untersuchungen auf Antikörper (z. B. gegen das O157 LPS, O26 LPS) durch ELISA, insbesondere wenn der Erregernachweis nicht mehr gelingt und der Antikörperrnachweis als einziger diagnostischer Zugang verbleibt.

Für den Nachweis Shigatoxin-bildender E. coli in Lebensmitteln wurden die im Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV) erarbeiteten Verfahren "Vorläufiges Verfahren zum qualitativen Nachweis von Verotoxin-bildenden Escherichia coli (VTEC) in Lebensmitteln" und "Vorläufiges Verfahren zum qualitativen Nachweis von Escherichia coli O157 in Lebensmitteln" den zuständigen obersten Landesbehörden zur einheitlichen Anwendung in den Landesuntersuchungsämtern empfohlen sowie von Experten für den DIN-Ausschuss "Fleisch" der Entwurf der DIN 10 167 "Mikrobiologische Untersuchung von Fleisch und Fleischerzeugnissen - Nachweis von Escherichia coli O157:H7" erarbeitet.

Zur Bestätigung bei Verdachtsdiagnosen, zur Aufdeckung von Infektionsquellen und zur Verfolgung von Infektionswegen kann eine weitere Subdifferenzierung im Nationalen Referenzzentrum für Salmonellen und andere Enteritiserreger am Robert Koch-Institut (bei Patientengut) und im Nationalen Veterinärmedizinischen Referenzlabor für E. coli am BgVV (bei Lebensmitteln) durchgeführt werden.

Anhang zu 1.5. Gesetzliche Regelung:

Falldefinition des IfSG für Gesundheitsämter: *Escherichia coli*, enterohämorrhagische Stämme (EHEC):

(Im Internet: [-http://www.rki.de/INFEKT/IFSG/IFSG_FALLDEF.HTM](http://www.rki.de/INFEKT/IFSG/IFSG_FALLDEF.HTM))

Klinisches Bild

Klinisches Bild vereinbar mit einer EHEC-Erkrankung, charakterisiert durch Durchfall (oft blutig), Bauchkrämpfe mit oder ohne eine der folgenden Komplikationen:

- komplettes enteropathisches hämolytisch-urämisches Syndrom (HUS): hämolytische Anämie, Thrombopenie und Nierenversagen.
- inkomplettes enteropathisches HUS: nur zwei der oben genannten Krankheitszeichen.
- thrombotisch-thrombozytopenische Purpura (TTP): komplettes oder inkomplettes HUS, zerebrale Symptome (z.B. Krampfanfälle).

Labordiagnostischer Nachweis

Bei EHEC-Erkrankung ohne enteropathisches HUS/TTP

- Erregerisolierung (kulturell) aus Stuhl, ggf. Bestimmung des Serovars und
- Nachweis des Shiga-Toxins (Stx) (z.B. ELISA) oder des Shiga-Toxin-Gens (z.B. PCR) aus dem *E.-coli*-Isolat (der alleinige Stx-Nachweis aus der Stuhlanreicherung gilt lediglich als Verdacht, s. Anmerkung).

Bei enteropathischem HUS/TTP

- Erregerisolierung (kulturell) aus Stuhl, ggf. Bestimmung des Serovars und
- Nachweis des Shiga-Toxins (Stx) (z.B. ELISA) oder des Shiga-Toxin-Gens (z.B. PCR) aus dem *E.-coli*-Isolat (der alleinige Stx-Nachweis aus der Stuhlanreicherung gilt lediglich als Verdacht, s. Anmerkung).

Falls Erregerisolierung nicht möglich

- alleiniger Anti-LPS-IgM-Antikörper-Nachweis (z.B. ELISA, Eastern-Blot) oder
- alleiniger Anti-LPS-IgG-Antikörper-Nachweis (\geq vierfacher Titeranstieg in zwei Proben, z.B. ELISA).

Über zuständige Landesbehörde an das RKI zu übermittelnde Infektion/Erkrankung Klinisch bestätigte Erkrankung

Klinisches Bild vereinbar mit einer EHEC-Erkrankung und komplettem oder inkomplettem enteropathischen HUS ohne labordiagnostischen EHEC-Nachweis nach Ausschluss nichtinfektöser Ursachen.

Klinisch-epidemiologisch bestätigte Erkrankung

Klinisches Bild vereinbar mit einer EHEC-Erkrankung und Nachweis eines epidemiologischen Zusammenhangs mit einer durch labordiagnostischen Nachweis bestätigten Infektion (Inkubationszeit für EHEC ca. 2–8 Tage, für enteropathisches HUS bis zu ca. 2 Wochen nach Beginn des Durchfalls).

Epidemiologischer Zusammenhang: Mensch-zu-Mensch-Übertragung wie z.B. auch das Wickeln von Säuglingen/Kleinkindern oder gemeinsame Expositionsquelle wie z.B. kontaminierte Lebensmittel, kontaminiertes Wasser, infizierte Tiere.

Klinisch und durch labordiagnostischen Nachweis bestätigte Erkrankung

Klinisches Bild vereinbar mit einer EHEC-Erkrankung und labordiagnostischer Nachweis.

Durch labordiagnostischen Nachweis bestätigte asymptomatische Infektion

Labordiagnostischer Nachweis bei fehlendem klinischen Bild, soweit nicht bereits als Ausscheider bekannt.

Nur durch labordiagnostischen Nachweis bestätigte Infektion

Labordiagnostischer Nachweis vorhanden, Angaben zum klinischen Bild nicht ermittelbar.

Anmerkung

Vom Gesundheitsamt wird nach § 6 Abs. 1 Nr. 2 der Krankheitsverdacht, definiert als klinisches Bild vereinbar mit einer EHEC-Erkrankung ohne enteropathisches HUS/TTP mit alleinigem Stx-Nachweis aus der Stuhlanreicherung bei negativem kulturellen Nachweis und ohne Nachweis eines epidemiologischen Zusammenhangs, erfasst. Dieser ist jedoch darüber hinaus nicht übermittlungspflichtig.

Ein alleiniger Stx-Nachweis aus der Stuhlanreicherung sollte Veranlassung zur kulturellen Isolierung des Erregers und Stx-Nachweis im *E.-coli*-Isolat sein. Kann der Erreger nicht isoliert werden, so ist ein Fall mit Stx-Nachweis aus der Stuhlanreicherung als klinisch (nur bei HUS) oder klinisch-epidemiologisch bestätigte Erkrankung einzuordnen, sofern entsprechende Symptome vorliegen.

Zu Seite 16:

Anhang: Tabelle 1

Herstellung der Bariumsulfat-Trübungsreihe nach McFarland

Röhrchen Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
BaCl ₂ (1%ig) (ml)	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0
H ₂ SO ₄ (1%ig) (ml)	9,9	9,8	9,7	9,6	9,5	9,4	9,3	9,2	9,1	9,0
Ungefähre Bakterienzahl/ml ¹ (x 10 ⁶)	300	600	900	1200	1500	1800	2100	2400	2700	3000

McFarland-Skala: Zur Trübungsmessung bzw. zum Trübungsvergleich z.B. bei der Herstellung von Bakteriensuspensionen. Man benötigt eine 1%ige Lösung BaCl₂ und eine 1%ige Lösung von H₂SO₄ (in Aqua dest.)

Zu Seite 16:

Anhang: Tabelle 2

Bestimmung der höchstwahrscheinlichen Keimzahlen (MPN – Most Probable Numbers) nach McCrady im Dreifachansatz in 100-ml-Proben mit jeweils drei Ansatzröhrchen je Verdünnungsstufe, beginnend mit 1-ml-Proben.

Anzahl positiver Röhrchen in den Verdünnungen			MPN in 100ml	Anzahl positiver Röhrchen in den Verdünnungen			MPN in 100ml
1 ml	0,1 ml	0,01 ml		1 ml	0,1 ml	0,01 ml	
0	0	0	< 30	2	0	0	91
0	0	1	30	2	0	1	140
0	0	2	60	2	0	2	200
0	0	3	90	2	0	3	260
0	1	0	30	2	1	0	150
0	1	1	61	2	1	1	200
0	1	2	92	2	1	2	270
0	1	3	120	2	1	3	340
0	2	0	62	2	2	0	210
0	2	1	93	2	2	1	280
0	2	2	120	2	2	2	350
0	2	3	160	2	2	3	420
0	3	0	94	2	3	0	290
0	3	1	130	2	3	1	360
0	3	2	160	2	3	2	440
0	3	3	190	2	3	3	530
1	0	0	36	3	0	0	230
1	0	1	72	3	0	1	390
1	0	2	110	3	0	2	640
1	0	3	150	3	0	3	950
1	1	0	73	3	1	0	430
1	1	1	110	3	1	1	750
1	1	2	150	3	1	2	1200
1	1	3	190	3	1	3	1600
1	2	0	110	3	2	0	930
1	2	1	150	3	2	1	1500
1	2	2	200	3	2	2	2100
1	2	3	240	3	2	3	2900
1	3	0	160	3	3	0	2400
1	3	1	200	3	3	1	4600
1	3	2	240	3	3	2	11000
1	3	3	290	3	3	3	> 11000

Zu Seite 48

Anhang zu 5.1. Methodik:

Empfehlungen des RKI zur Labordiagnostik von EHEC-Infektionen:

(Im Internet: [-http://www.rki.de/INFEKT/INF_A-Z/RATGEBER/RAT6.HTM](http://www.rki.de/INFEKT/INF_A-Z/RATGEBER/RAT6.HTM))

Verfahren für den Toxinnachweis (Stx-Direktnachweis):

- Stx-ELISA aus Anreicherung (Zeitbedarf ca. 20–24 Stunden). Der Stx-ELISA direkt aus dem Stuhl ohne vorherige Anreicherung ist zu unspezifisch.
- Stx-PCR aus Kolonieabschwemmung oder Anreicherung (Zeitbedarf insgesamt ca. 36 Stunden)
- Verozellen-Zytotoxizitätstest aus Stuhlüberstand, mit oder ohne Vorkultur (Zeitbedarf 1 – 3 Tage)

Verfahren für die Erregerisolierung:

- Enterohämolysin-Agar (mit/ohne Antibiotika-Supplement)
- Sorbitol-MacConkey-Agar (SMAC, Indikatornährboden zum Nachweis von nicht Sorbit fermentierenden O157:H7)
- Kolonien-Blot-Hybridisierung
- Nur für *E. coli* O157: Immunmagnetische Separation in Kombination mit Subkultivierung auf festen Nährböden (SMAC oder CT-SMAC; Sorbit fermentierende *E. coli* O157 wachsen nicht auf CT-SMAC)
- Kolonie-Immunoblot (Antikörper gegen Stx, auch getrennt Stx1/Stx2; Zeitbedarf 24–28 Stunden; gleichzeitig zur Erregerisolierung geeignet)

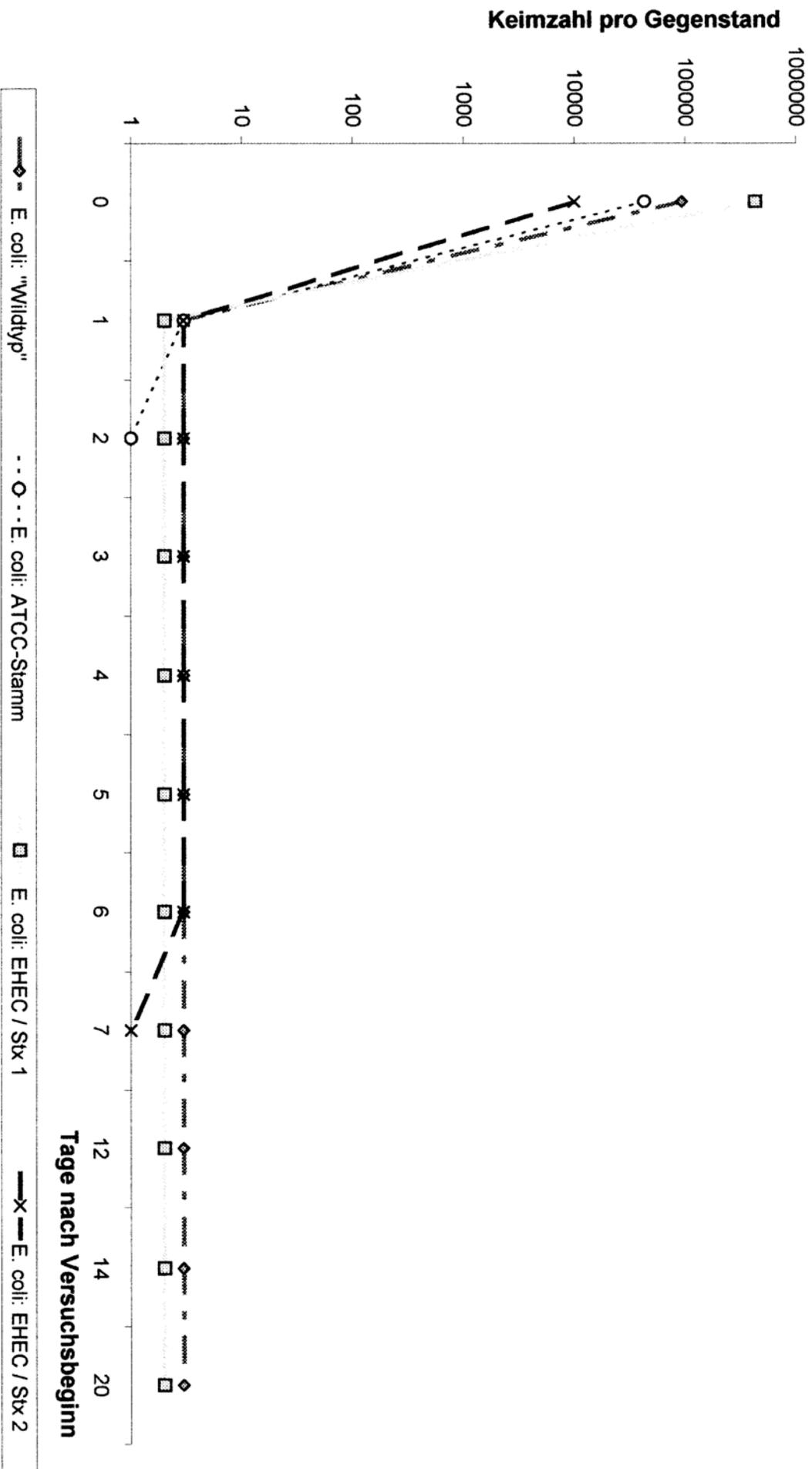
Zum **Screening** sollten zwei der oben angegebenen Verfahren verwendet werden, darunter zwingend ein Verfahren zum Stx-Nachweis.

Die **Verdachtsdiagnose** bedarf der Bestätigung durch **eine** der folgenden Untersuchungen:

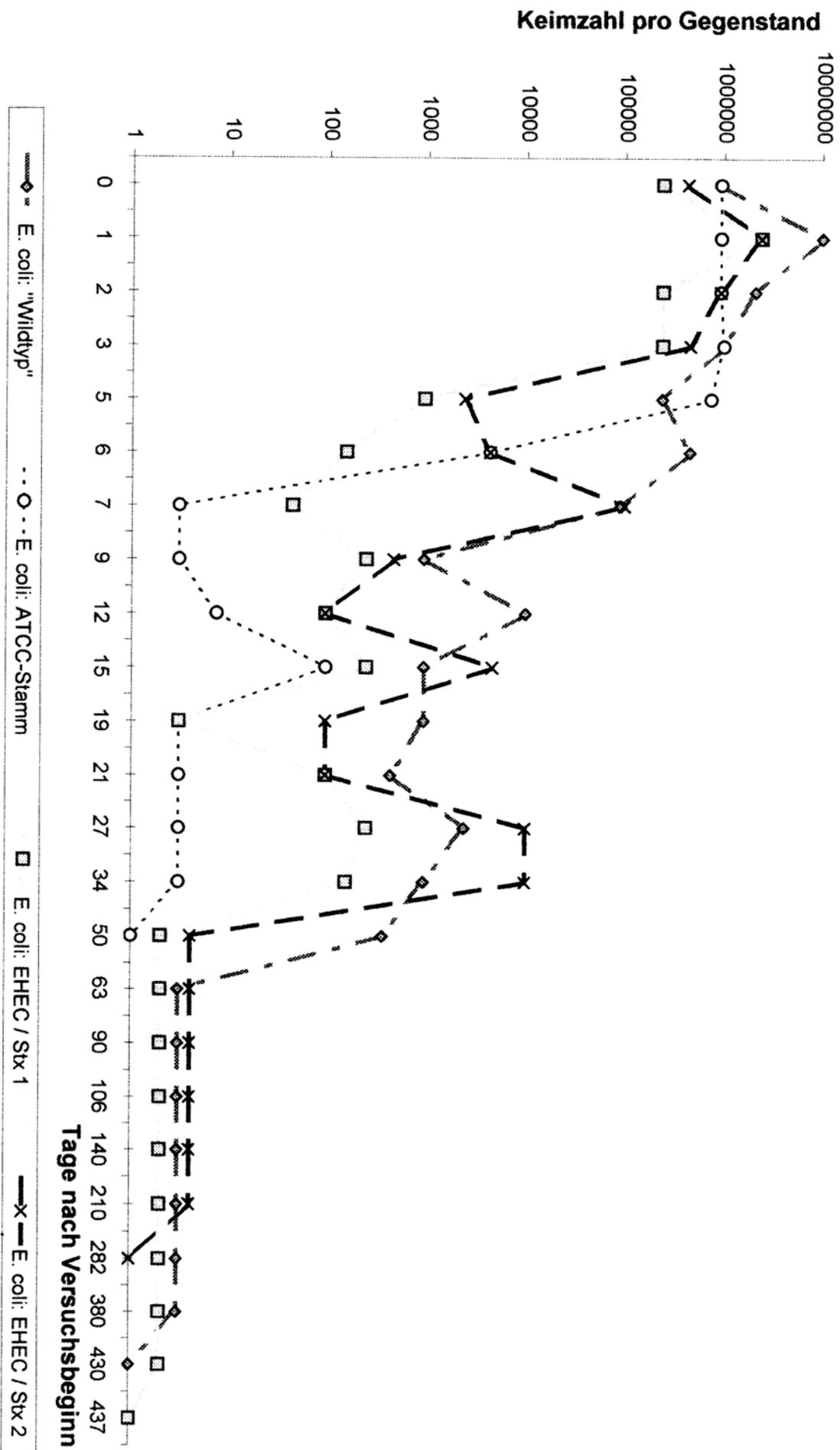
- ein weiteres der oben genannten Testverfahren
- Charakterisierung des Isolats als EHEC (phänotypischer oder genotypischer Stx-Nachweis)

Bei HUS oder TTP sollte zusätzlich eine Untersuchung des Serums auf LPS-Antikörper gegen *E. coli* O157 u. a. erfolgen. Die weitergehende Charakterisierung der Erreger, insbesondere für epidemiologische Fragestellungen, sollte in Abhängigkeit von der Herkunft der Isolate in den Referenzlaboratorien erfolgen.

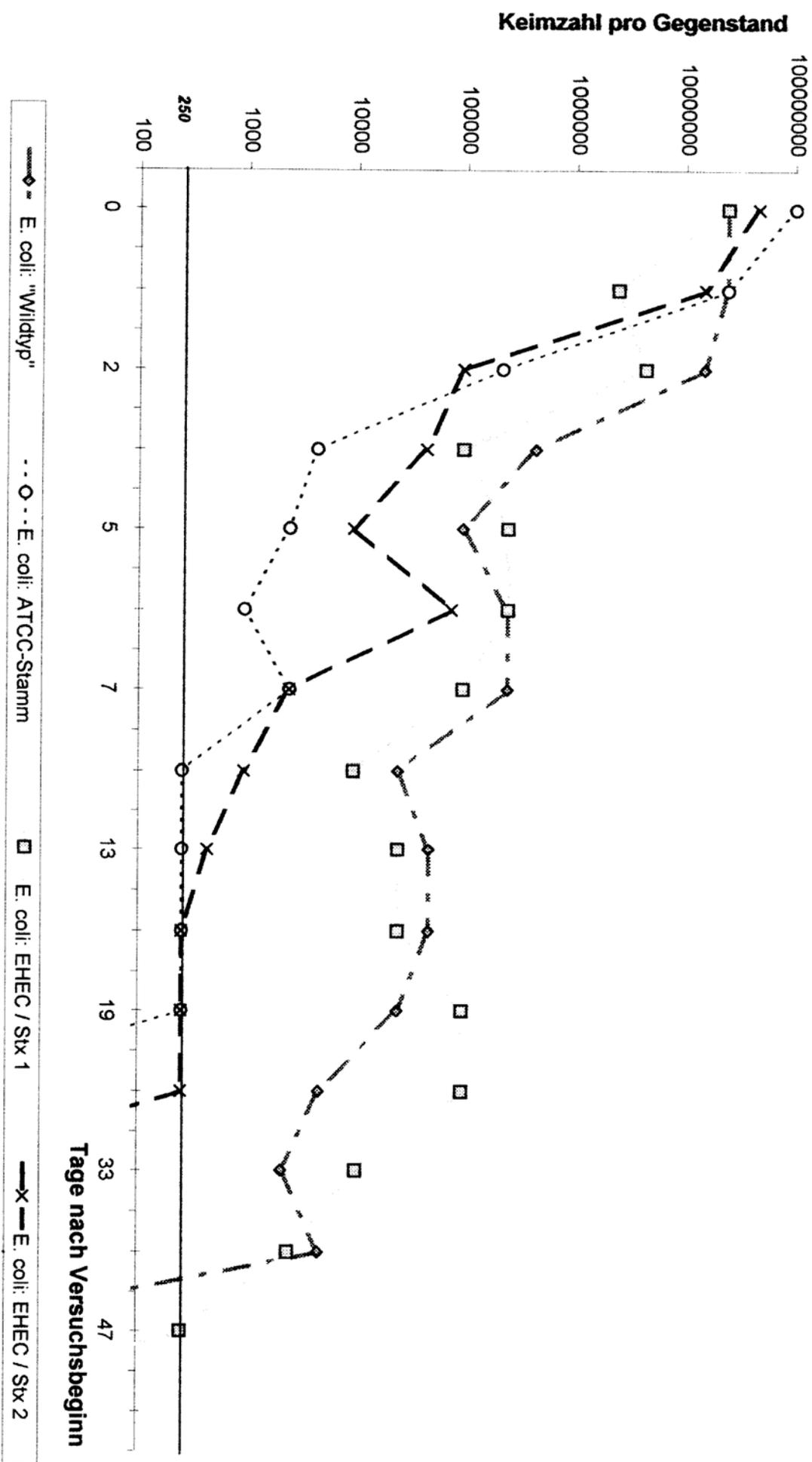
Zu Diagramm 1 (Seite 44): Nachweisdauer der Prüfstämmen auf Glas



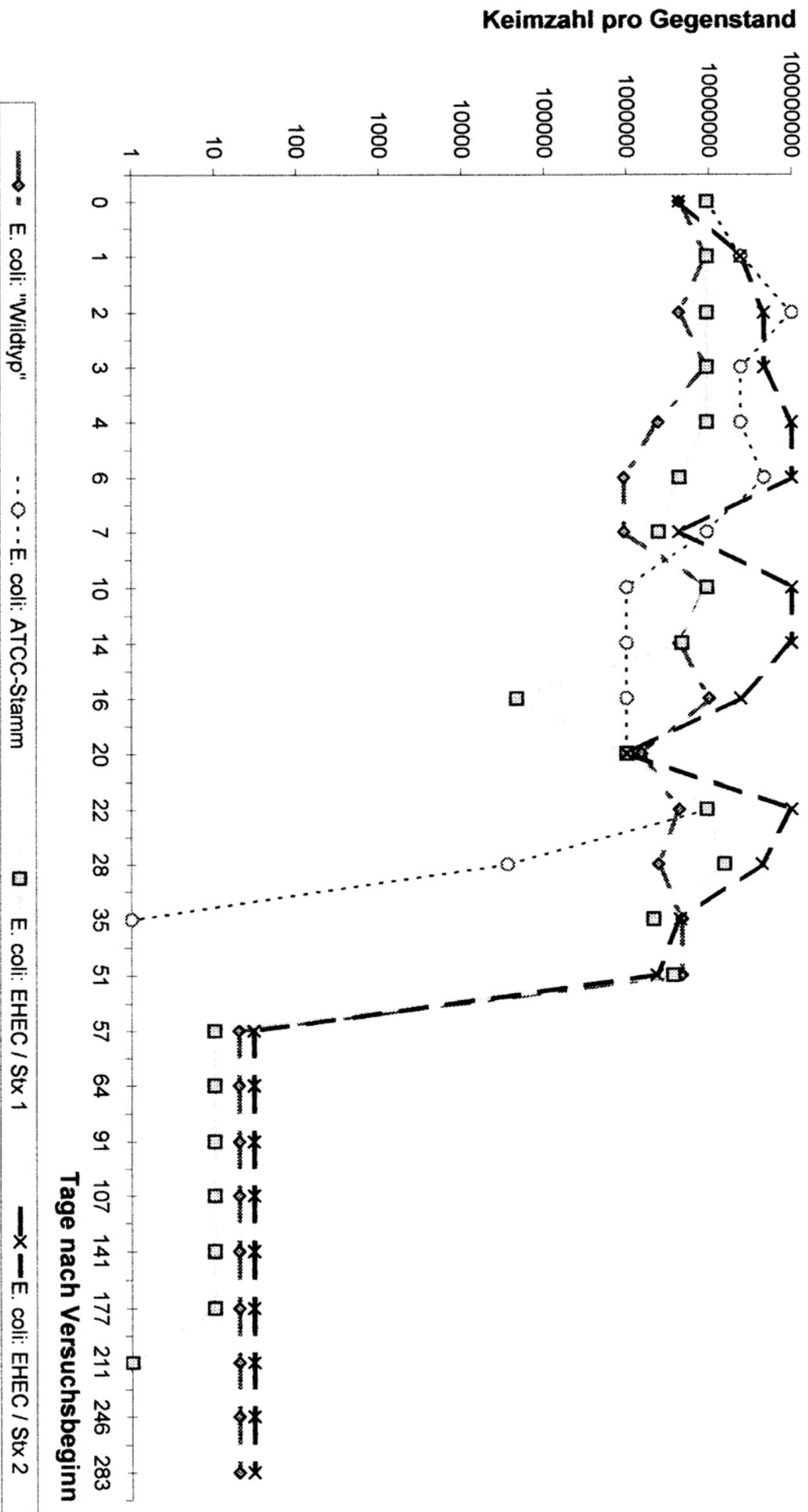
Zu Diagramm 1 (Seite 44): Überlebenszeiten der Prüfstämme auf Holz



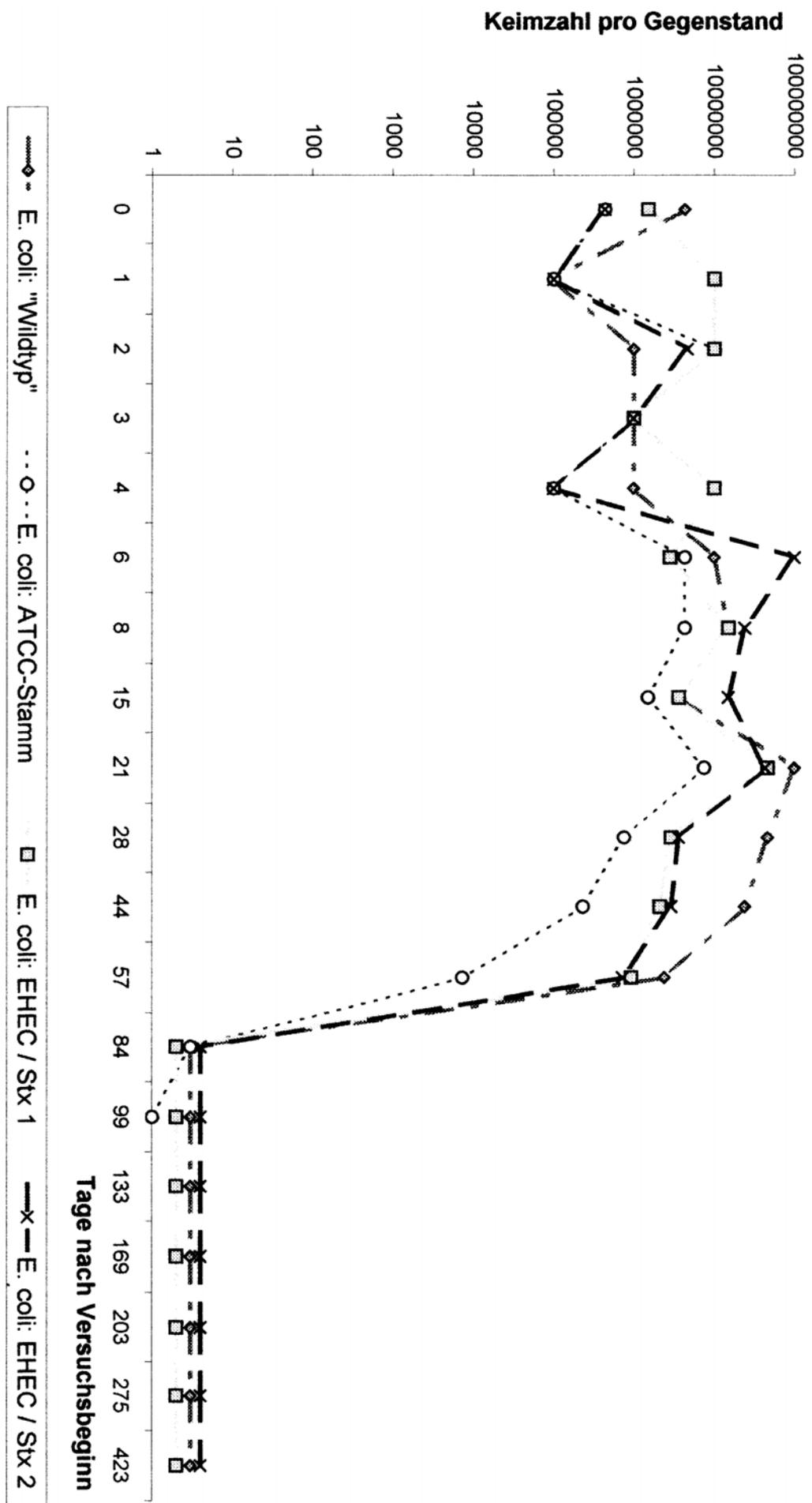
Zu Diagramm 1 (Seite 44): Überlebenszeiten der Prüfstämme in Oberflächenwasser



Zu Diagramm 1 (Seite 45): Überlebenszeiten der Prüfstämme in sterilisiertem Oberflächenwasser



Zu Diagramm 1 (Seite 45): Überlebenszeiten der Prüfstämmen in sterilisierter Sporenerde



9. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Familienname

Vorname

Roth

Christian

Geburtsdatum

10.09.70

Geburtsort

Hermannstadt

Familienstand

verheiratet

Schulbesuche:

Grundschule in Hermannstadt u. Burghausen von 09/77 bis 07/81

Gymnasium in Burghausen von 09/81 bis 06/90

Ersatzdienst:

Pflegedienst am Kreiskrankenhaus Burghausen von 08/90 bis 09/91

Berufsausbildung:

zum Krankenpfleger von 10/91 bis 08/94

Studienzeit:

Universität Regensburg Humanmedizin von 11/94 bis 08/96
Hochschule *Studiengang*

Technische Universität München Humanmedizin von 11/96 bis 04/01
Hochschule *Studiengang*

Arzt im Praktikum:

Kreisklinik Burghausen: Abteilung für Innere Erkrankungen von 07/01 bis 12/02

Approbierter Arzt:

Kreisklinik Burghausen: Abteilung für Innere Erkrankungen ab 01/03

DANKSAGUNG

In erster Linie danke ich recht herzlich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. H. Ch. Huber für die hervorragende Betreuung bei der Verwirklichung dieser Arbeit.

Besonderer Dank gilt Herrn Dr. rer. nat. P.R.G. Schindler für die sehr hilfreichen Ratschläge sowie die ausgezeichnete Unterstützung.

Außerdem danke ich allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Landesuntersuchungsamtes für das Gesundheitswesen Südbayern, die mich unermüdlich unterstützten und mir ausgezeichnete Arbeitsbedingungen bereiteten.

Nicht zuletzt danke ich meiner Ehefrau Dagmar Roth-Strasser für die liebevolle sowie verständnisvolle Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit.