

Aus dem **Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen**
des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin
und dem **Institut für Tierzucht und Tierhaltung**
der Agrar- und Ernährungswissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Shiga-Toxin bildende *Escherichia coli* in Milchviehbetrieben Schleswig-Holsteins: Analyse von Risikofaktoren und Ausscheidungsmustern



Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades
eines Doktors
der Veterinärmedizin
an der Freien Universität
Berlin

vorgelegt von
Andrea Menrath
Tierärztin aus Kiel

Journal-Nummer: 3333

Bibliografische Informationen der Deutschen Bibliothek

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

1. Auflage 2009

© 2009 by Verlag: Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH,
Gießen
Printed in Germany

ISBN 978-3-941703-66-7

Verlag: DVG Service GmbH
Friedrichstraße 17
35392 Gießen
0641/24466
geschaeftsstelle@dvg.net
www.dvg.net

Aus dem
Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin
und dem
Institut für Tierzucht und Tierhaltung
der Agrar- und Ernährungswissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Shiga-Toxin bildende *Escherichia coli* in Milchviehbetrieben Schleswig-Holsteins:
Analyse von Risikofaktoren und Ausscheidungsmustern**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Andrea Menrath
Tierärztin aus Kiel

Berlin 2009

Journal-Nr.: 3333

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Leo Brunnberg
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Lothar H. Wieler
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Edgar Schallenberg
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Karl-Hans Zessin

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus)

cattle, dairy cattle, gastroenteritis, Germany, pathogenicity, polymerase chain reaction,
reservoir hosts, risk factors, shedding, *Escherichia coli*, Schleswig-Holstein, Shiga toxins,
virulence, zoonoses

Tag der Promotion: 17.02.2010

Die Dissertation wurde mit dankenswerter finanzieller Unterstützung der
H. W. Schaumann Stiftung und des BMBF-Netzwerks "FBI-Zoo"
(Food-borne infections of humans) angefertigt.

für meine Familie und Freunde

Inhalt

1	Einleitung	1
2	Literaturübersicht	3
2.1	Escherichia coli	3
2.1.1	Taxonomie	3
2.2	<i>E. coli</i> -Pathovare	4
2.3	Shiga-Toxin bildende <i>E. coli</i> (STEC)	9
2.3.1	Definition	10
2.3.2	Historie	11
2.3.3	Nomenklatur	12
2.4	Eigenschaften und Virulenzfaktoren der STEC	13
2.4.1	Virulenzeigenschaften	13
2.4.2	Tenazität	17
2.4.3	Vielfalt der an STEC-Infektionen beteiligten Serovaren	19
2.4.4	Shiga-Toxin	25
2.5	STEC beim Menschen	31
2.5.1	Humane STEC-Infektion	32
2.5.2	Vorkommen und Epidemiologie von humanen STEC-Infektionen	34
2.6	STEC beim Rind	43
2.6.1	Bovine STEC-Infektion	43
2.6.2	Vorkommen und Epidemiologie von bovinen STEC-Infektionen	46
2.7	Übertragungswege für den Menschen	61
3	Eigene Untersuchungen	68
3.1	Material	68
3.1.1	Versuchsbetriebe und Probenzahl	68
3.1.2	Probennahme	70
3.2	Methoden	70
3.2.1	Voruntersuchungen	72
3.2.2	Referenzstämme	72

3.2.3	Anreicherung der Proben	72
3.2.4	DNA-Isolierung aus den Proben	72
3.2.5	Screening-PCR	73
3.2.6	Koloniehybridisierung	77
3.2.7	Konservierung der Isolate	80
3.2.8	Charakterisierung der Isolate	80
3.2.9	Weitere durchgeführte Untersuchungen	80
3.2.10	Statistische Analyse	82
4	Ergebnisse	87
4.1	Ergebnisse auf Betriebsebene unter Berücksichtigung der Saisonalität ...	94
4.1.1	Untersuchungen der STEC-Prävalenzen von Betrieb A	94
4.1.2	Untersuchungen der STEC-Prävalenzen von Betrieb B	96
4.1.3	Untersuchungen der STEC-Prävalenzen von Betrieb C	98
4.1.4	Untersuchungen der STEC-Prävalenzen von Betrieb D	100
4.1.5	Untersuchungen der STEC-Prävalenzen von Betrieb E	102
4.1.6	Untersuchungen der STEC-Prävalenzen von Betrieb F	104
4.1.7	Vergleich der STEC-Prävalenzen zwischen den Betrieben	106
4.2	Deskriptive und statistische Auswertung	112
4.2.1	Statistische Auswertung mit Modell 1 (<i>stx</i> - Nachweis mittels Screening-PCR) auf Einzeltierebene	112
4.2.2	Statistische Auswertung mit Modell 2 (STEC-Nachweis mittels Kolonie-Hybridisierung) auf Einzeltierebene	121
4.2.3	Vergleich der Risikobewertungen verschiedener Faktoren durch Modell 1 (<i>stx</i> -Nachweis mittels Screening-PCR) und Modell 2 (STEC-Nachweis mittels Kolonie-Hybridisierung)	130
4.2.4	Analyse Tier-individueller <i>stx</i> -Ausscheidungsmuster	135
4.3	Weitere Analyse ausgewählter Isolate	139
4.3.1	Serotypisierung und Virulenzmuster	139
4.3.2	Weitere Charakterisierung	140
5	Diskussion	145
5.1	Bewertung der angewandten Methodik	145
5.1.1	Diskussion der Methoden zur Identifikation der STEC-Ausscheider	145

5.1.2	Diskussion der Methoden zur Isolierung der STEC	146
5.2	Bewertung der erhobenen STEC-Prävalenzen.....	148
5.2.1	Diskussion des Einflusses von Stress auf die STEC-Ausscheidung.....	149
5.2.2	Diskussion der Bedeutung der Laktationskennzahlen	151
5.2.3	Diskussion der Bedeutung der weiteren erhobenen Merkmale.....	154
5.2.4	Diskussion der Bedeutung saisonaler Faktoren	156
5.2.5	Diskussion des Vergleiches der Risikobewertungen verschiedener Faktoren durch Modell 1 (<i>stx</i> -Nachweis mittels Screening-PCR) und Modell 2 (STEC-Nachweis mittels Kolonie-Hybridisierung).....	157
5.3	Bewertung der Prävalenz von Shiga-Toxin-Typen.....	158
5.4	Konsequenzen für die Bewertung der humanen Gefährdung	159
5.5	Prophylaxemöglichkeiten und Ausblick	160
6	Schlussfolgerungen.....	161
7	Zusammenfassung.....	163
8	Summary	165
9	verwendete Literatur	167
10.	Anhang	221
10.1.	Verwendete Geräte	221
10.2.	Verwendetes Labormaterial	222
10.3.	Odds Ratio für <i>stx</i> -Nachweis in Fäzes von Milchrindern mit 95%- Konfidenzintervall, saisonal ausgewertet.....	223
10.4.	Angabe der 95%-Konfidenzintervalle für Tabelle 41	224
11	Vorabveröffentlichungen	225
12	Selbständigkeitserklärung	226
13	Danksagungen.....	227

verwendete Abbildungen

Abbildung 1: Anteile humanpathogener O-Gruppen an STEC-Infektionen bei Menschen in Deutschland	20
Abbildung 2: Anteile bisher isolierter STEC-Serovare bei am Hämolytisch-Urämischen Syndrom erkrankten Menschen	21
Abbildung 3: Übersicht über die Anteile Lebensmittel-assoziiertes Infektionen durch Zoonose-Erreger beim Menschen in den Jahren 2007 und 2008 in Deutschland	31
Abbildung 4: Entwicklung der Anzahl der STEC-Enteritis- und HUS-Fälle des Menschen von 2003 bis 2008 in Deutschland	40
Abbildung 5: Überblick von mit STEC-Ausscheidung durch Rinder assoziierten Faktoren (unvollständig)	51
Abbildung 6: Übersicht über mögliche Infektionswege von bovinen STEC für den Menschen	61
Abbildung 7: Nylonmembran nach dem Kolonielift (links) von einer LB-Agarplatte mit abgeklatschtem Koloniematerial (gelb) und nach der Kolonie-Hybridisierung (rechts)	79
Abbildung 8: Entwicklung der STEC-Prävalenzen bei den untersuchten Milchkühen von sechs Milchvieh-haltenden Betrieben (n=1.646) im saisonalen Verlauf bei monatlichem Untersuchungsrythmus	88
Abbildung 9: Vorkommen der Virulenzfaktoren stx_1 , stx_2 , eae und EHEC-hly _A bei den untersuchten Milchkühen auf den sechs Betrieben A, B, C, D, E und F	92
Abbildung 10: Anteile der aus bovinen Kotproben gewonnenen STEC-Isolate mit potentiell humanpathogenem Virulenzprofil (stx_2 , eae, EHEC-hly _A) an der Gesamtzahl (n=1.105), separat für die Milchvieh-haltenden Betriebe A, B, C, D, E und F, gewonnen per Koloniehybridisierung	93
Abbildung 11: Entwicklung der STEC-Prävalenzen und Anzahl stx -positiver Milchkühe von Betrieb A im Verlauf des Probenahmezeitraums bei monatlichem Untersuchungsrythmus	95
Abbildung 12: Entwicklung der STEC-Prävalenzen und Anzahl stx -positiver Milchkühe von Betrieb B im Verlauf des Probenahmezeitraums bei monatlichem Untersuchungsrythmus	97
Abbildung 13: Entwicklung der STEC-Prävalenzen und Anzahl stx -positiver Milchkühe von Betrieb C im Verlauf des Probenahmezeitraums bei monatlichem Untersuchungsrythmus	99

- Abbildung 14:** Entwicklung der STEC-Prävalenzen und Anzahl *stx*-positiver Milchkühe von Betrieb D innerhalb des Probenzeitraums bei monatlichem Untersuchungsrythmus..... 101
- Abbildung 15:** Entwicklung der STEC-Prävalenzen und Anzahl *stx*-positiver Milchkühe von Betrieb E innerhalb des Probenzeitraums bei monatlichem Untersuchungsrythmus..... 103
- Abbildung 16:** Entwicklung der STEC-Prävalenzen und Anzahl *stx*-positiver Milchkühe von Betrieb F innerhalb des Probenzeitraums bei monatlichem Untersuchungsrythmus..... 105
- Abbildung 17:** Milchleistung der untersuchten Probtierere in den verschiedenen Laktationsabschnitten für die konventionell (links) und ökologisch bewirtschafteten (rechts) Betriebe A, B, C, D, E und F 109
- Abbildung 18:** Vergleich der Entwicklung der STEC-Prävalenzen der Milchkühe auf den sechs Betrieben A, B, C, D, E und F im Verlauf des Probenahmezeitraums, geordnet nach regional zusammen liegenden Betriebspaaren 111
- Abbildung 19:** Verteilung der *stx*-Ausscheidungshäufigkeiten von mindestens sechsfach beprobten Milchkühen (n=140) innerhalb des zwölfmonatigen Probenzeitraums, 135
- Abbildung 20:** Verteilung der *stx*-Ausscheidungshäufigkeiten von zwölfmal beprobten Milchkühen (n=90) innerhalb des zwölfmonatigen Probenzeitraums..... 136
- Abbildung 21:** Maximale Anzahl der aufeinander folgenden *stx*-positiven Proben in der Screening-PCR für alle mindestens sechsfach beprobten, mindestens einmal *stx*-positiven Milchkühe (n=122) innerhalb des zwölfmonatigen Probenzeitraums 137
- Abbildung 22:** *stx*-Ausscheidungsmuster der Kühe von Betrieb B, von denen STEC isoliert und serotypisiert wurden (B18, B6, B15) über den Zeitraum der Probenahme (Kuh B18 von Februar 2007 bis Januar 2008; Kuh B6 von Mai 2007 bis Januar 2008 und Kuh B15 von Juni 2007 bis Januar 2008) unter Angabe von Häufungen derselben Serovaren (O22:H8, O113:H- und O130:H11)..... 143

verwendete Tabellen

Tabelle 1: Einteilung darmpathogener E. coli-Pathovaren.....	5
Tabelle 2: Übersicht über weltweit mit HUS beim Menschen assoziierte STEC-Serovare, sortiert nach O-Gruppe (MicroBioNet, 2008)	22
Tabelle 3: Übersicht über bisher aus Rinder-Kotproben isolierte STEC-Serovare, sortiert nach O-Gruppe (MicroBioNet, 2008)	24
Tabelle 4: Vergleich von Stx ₁ - und Stx ₂ -Varianten (nach Melton-Celsa et al. (1998), modifiziert; Schmidt et al. (2000) Leung et al.(2003))	28
Tabelle 5: Infektionen des Menschen durch Shiga-Toxin bildende Escherichia coli, chronologisch sortiert	36
Tabelle 6: Beispiele von STEC-Infektionen bei Kälbern, verursacht durch Intimin-positive Isolate, chronologisch geordnet (nach Naylor et al. (2005a), modifiziert)	44
Tabelle 7: Übersicht über nachgewiesene STEC-Prävalenzen bei Rindern in Deutschland, chronologisch sortiert.....	47
Tabelle 8: Übersicht über nachgewiesene STEC-Prävalenzen bei Rindern in Europa, nach Ländern alphabetisch sortiert.....	48
Tabelle 9: Übersicht über nachgewiesene STEC-Prävalenzen bei Rindern außerhalb Europas, nach Ländern alphabetisch sortiert.....	49
Tabelle 10: Saisonal-bedingte STEC-Ausscheidungsunterschiede des Serovares O157:H7 bei Rindern, nach Ländern alphabetisch sortiert.....	52
Tabelle 11: Assoziation der Fütterung mit der Ausscheidung von der STEC-Serovare O157:H7, nach Ländern alphabetisch und nach Art der Beeinflussung sortiert 57	
Tabelle 12: Übersicht über nachgewiesene Prävalenzen von STEC bei kleinen Wiederkäuern und Wildwiederkäuern, nach Ländern alphabetisch sortiert.....	65
Tabelle 13: Übersicht der teilnehmenden Milchvieh-haltenden Betriebe A, B, C, D, E und F und Anzahl der jeweils monatlich untersuchten Kotproben in den drei Guppen der Kühe mit unterschiedlichen Anzahlen absolvierter Laktationen.....	69
Tabelle 14: Referenzstämme, Verwendung für die PCR und die Koloniehybridisierung	72
Tabelle 15: Eingesetzte Substrate für die PCR.....	74
Tabelle 16: Angaben zu den verwendeten Primern zum Nachweis der verschiedenen Virulenzfaktoren	75

Tabelle 17: Reaktionsbedingungen der PCR zum Nachweis der verschiedenen Virulenzfaktoren	76
Tabelle 18: Normwerte der Variablen, die vom Landeskontrollverband zur Verfügung gestellt wurden und ihre Klasseneinteilung für die statistische Auswertung	84
Tabelle 19: Erhobene Variablen zur Beurteilung des Gesundheitszustandes der Probenkühe	86
Tabelle 20: Vorkommen von Virulenzfaktoren bei isolierten STEC, gewonnen per Koloniehybridisierung aus bovinen Kotproben, Charakterisierung mittels PCR	89
Tabelle 21: Virulenzmuster der isolierten STEC, gewonnen per Koloniehybridisierung aus bovinen Kotproben, Charakterisierung mittels PCR	90
Tabelle 22: Entwicklung der BCS-Scores der untersuchten Probenkühe (n=1.646) im Laufe des Laktationszyklus auf den Milchvieh-haltenden Betrieben A, B, C, D, E und F	106
Tabelle 23: Überblick über beobachtete Erkrankungsschwerpunkte in den Betrieben A, B, C, D, E und F bei den untersuchten Probenkühen (n=1.646)	107
Tabelle 24: Durchschnittliche Milchkennzahlen (Milchmenge, prozentualer Milcheiweiß und -fettanteil, Milchwahnhstoffgehalt und somatische Zellzahl) der Probenkühe auf den sechs untersuchten Milchviehbetrieben A, B, C, D, E und F	108
Tabelle 25: Bewertung des Risikos eines <i>stx</i> -Nachweises im Kot der Probenkühe mittels Screening-PCR in Assoziation mit der Anzahl absolvierter Laktationen, Angabe von Anteilen <i>stx</i> -positiver Kühe, sowie der jeweiligen Odds Ratio, die mit Modell 1 (<i>stx</i> -Nachweis mittels Screening-PCR) berechnet wurden.....	113
Tabelle 26: Bewertung des Risikos eines <i>stx</i> -Nachweises im Kot der Probenkühe mittels Screening-PCR in Assoziation mit dem Laktationstag, Angabe von Anteilen <i>stx</i> -positiver Tiere, nach Laktationsstadien sortiert, sowie der jeweiligen Odds-Ratio, die mit Modell 1 (<i>stx</i> -Nachweis mittels Screening-PCR) berechnet wurden	114
Tabelle 27: Bewertung des Risikos eines <i>stx</i> -Nachweises im Kot der Probenkühe mittels Screening-PCR in Assoziation mit dem Laktationstag, Angabe von weiteren signifikanten Odds-Ratio zwischen den Laktationsstadien, nach Laktationsstadien sortiert, berechnet mit Modell 1 (<i>stx</i> -Nachweis mittels Screening-PCR)	115
Tabelle 28: Bewertung des Risikos eines <i>stx</i> -Nachweises im Kot der Probenkühe mittels Screening-PCR in Assoziation mit der Milchleistung, Angabe von Anteilen <i>stx</i> -positiver Tiere sowie der jeweiligen Odds-Ratio, die mit Modell 1 (<i>stx</i> -Nachweis mittels Screening-PCR) berechnet wurden.....	116

- Tabelle 29:** Bewertung des Risikos eines *stx*-Nachweises im Kot der Probenkühe mittels Screening-PCR in Assoziation mit den Milchinhaltsstoffen, Berechnung der Odds-Ratio mit Modell 1 (*stx*-Nachweis mittels Screening-PCR)117
- Tabelle 30:** Bewertung des Risikos eines *stx*-Nachweises im Kot der Probenkühe mittels Screening-PCR in Assoziation mit dem Ernährungszustand, erfasst in Form des Body Condition Scores, Berechnung in Form von Odds-Ratio mit Modell 1 (*stx*-Nachweis mittels Screening-PCR).....118
- Tabelle 31:** Bewertung des Risikos eines *stx*-Nachweises im Kot der Probenkühe mittels Screening-PCR in Assoziation mit dem Probenahme-Monat, Berechnung in Form von Odds-Ratio mit Modell 1 (*stx*-Nachweis mittels Screening-PCR) 120
- Tabelle 32:** Bewertung des Risikos einer STEC-Isolierung aus dem Kot der Probenkühe mittels Kolonie-Hybridisierung in Assoziation mit der Anzahl absolvierter Laktationen, Angabe von Anteilen gelungener STEC-Isolierungen bei Probenkühen, sowie den jeweiligen Odds Ratio, die mit Modell 2 (STEC-Nachweis mittels Kolonie-Hybridisierung) berechnet wurden.....122
- Tabelle 33:** Bewertung des Risikos einer STEC-Isolierung aus dem Kot der Probenkühe mittels Kolonie-Hybridisierung in Assoziation mit dem Laktationstag, Angabe von Anteilen gelungener STEC-Isolierungen bei Probenkühen, sowie den jeweiligen Odds Ratio, die mit Modell 2 (STEC-Nachweis mittels Kolonie-Hybridisierung) berechnet wurden.....124
- Tabelle 34:** Bewertung des Risikos einer STEC-Isolierung aus dem Kot der Probenkühe mittels Kolonie-Hybridisierung in Assoziation mit dem Laktationstag, Angabe von Anteilen gelungener STEC-Isolierungen bei Probenkühen, sowie den jeweiligen Odds Ratio, die mit Modell 2 (STEC-Nachweis mittels Kolonie-Hybridisierung) berechnet wurden.....125
- Tabelle 35:** Bewertung des Risikos einer STEC-Isolierung aus dem Kot der Probenkühe mittels Kolonie-Hybridisierung in Assoziation mit der Milchleistung, Angabe von Anteilen gelungener STEC-Isolierungen bei Probenkühen, sowie den jeweiligen Odds Ratio, die mit Modell 2 (STEC-Nachweis mittels Kolonie-Hybridisierung) berechnet wurden126
- Tabelle 36:** Bewertung des Risikos einer STEC-Isolierung aus dem Kot der Probenkühe mittels Kolonie-Hybridisierung in Assoziation mit den Milchinhaltsstoffen, Angabe von Anteilen gelungener STEC-Isolierungen bei Probenkühen, sowie den jeweiligen Odds Ratio, die mit Modell 2 (STEC-Nachweis mittels Kolonie-Hybridisierung) berechnet wurden.....127

- Tabelle 37:** Bewertung des Risikos einer STEC-Isolierung aus dem Kot der Probenkühe mittels Kolonie-Hybridisierung in Assoziation mit dem Ernährungszustand, erfasst in Form des Body Condition Scores, Angabe von Anteilen gelungener STEC-Isolierungen bei Probenkühen, sowie den jeweiligen Odds Ratio, die mit Modell 2 (STEC-Nachweis mittels Kolonie-Hybridisierung) berechnet wurden..... 128
- Tabelle 38:** Bewertung des Risikos einer STEC-Isolierung aus dem Kot der Probenkühe mittels Kolonie-Hybridisierung in Assoziation mit dem Quartal der Probenahme, Angabe von Anteilen gelungener STEC-Isolierungen bei Probenkühen, sowie Berechnung in Form von Odds-Ratio mit Modell 2 (STEC-Nachweis mittels Kolonie-Hybridisierung)..... 129
- Tabelle 39:** Vergleich der Risikobewertungen durch Modell 1 (*stx*-Nachweis mittels Screening PCR) und Modell 2 (STEC-Nachweis mittels Kolonie-Hybridisierung) in Assoziation mit den Milchinhaltsstoffen, Berechnung von Odds-Ratio mit den jeweiligen Modellen 132
- Tabelle 40:** Vergleich der Risikobewertungen durch Modell 1 (*stx*-Nachweis mittels Screening PCR) und Modell 2 (STEC-Nachweis mittels Kolonie-Hybridisierung) in Assoziation mit den Ernährungszustand, erhoben in Form des Body Condition Scores Berechnung von Odds-Ratio mit den jeweiligen Modellen 133
- Tabelle 41:** Vergleich der Risikobewertungen durch Modell 1 (*stx*-Nachweis mittels Screening PCR) und Modell 2 (STEC-Nachweis mittels Kolonie-Hybridisierung) in Assoziation mit den Quartal der Probenahme, Berechnung von Odds-Ratio mit den jeweiligen Modellen..... 134
- Tabelle 42:** Eigenschaften der auf Sorbitol-MacConkey-Agar nicht Sorbitol-fermentierenden STEC-Isolate, gewonnen mittels Kolonie-Hybridisierung aus Kotproben von Kuh B18 von Betrieb B 140
- Tabelle 43:** Serovarzugehörigkeit und Virulenzprofile ausgewählter STEC-Isolate (n=61), gewonnen von als kontinuierlich ausscheidend definierten Kühen 141

verwendete Abkürzungen

AA	Aggregative Adhärenz	d	Tage
A/E-Läsionen	Attaching and Effacing Läsionen	DAEC	Diffus adhärenzte <i>E. coli</i>
AAF	Aggregative Adherence Fimbriae	Df	Durchfall
AHL	Acyl-Homoserin-Lakton	DIG-11-UTP	Digoxigenin-11-2'Desoxyuridin-5'-Triphosphat
AI	Auto-Inducer	DK	Dänemark
AIDA	Adhesin Involved in Diffuse Adherence	DNA/ DNS	Desoxyribonukleinsäure
APEC	aviär pathogene <i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
a _w - Wert	Wert der Wasseraktivität	E	Spanien
B	Belgien	Eae	<i>E. coli</i> Attaching und Effacing Protein, Intimin
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indoxylphosphat	<i>eae</i>	Intimin-codierendes Gen
BCS	Body Condition-Score	EAF	EPEC Adherence Factor
bfp	bundle-forming-pili	EAggEC	Enteroaggregative <i>E. coli</i>
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung	EAST	EAggEC Heat Stable Enterotoxin
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool	EAU	Uganda
bp	Basenpaare	EDTA	Ethylendiamintetraacetat
BR	Brasilien	EG	Europäische Gemeinschaft
bzw.	beziehungsweise	EHEC	Enterohämorrhagische <i>E. coli</i>
CAN	Kanada	<i>EHEC-hlyA</i>	für EHEC-Hämolysin codierendes Gen
CDC	Centers for Disease Control and Prevention (USA)	EibG	<i>E. coli</i> Immunglobulin-bindendes Protein G
cfu	colony forming unit	EIEC	Enteroinvasive <i>E. coli</i>
CH	Schweiz	EPEC	Enteropathogene <i>E. coli</i>
CNF	Cytotoxic Necrotising Faktor	Esp	<i>E. coli</i> secreted protein
D	Deutschland	ETEC	Enterotoxin bildende <i>E. coli</i>

etp	EHEC type II secretion pathway	kb	Kilo-Basenpaare
EU	Europäische Union	kDa	Kilodalton
ExPEC	extraintestinal pathogene <i>E. coli</i>	kg	Kilogramm
F	Frankreich	KI	Konfidenzintervall
FIN	Finnland	L	Liter
g	Gramm	LB	Luria Bertani
GB	Großbritannien	LD ₅₀	mittlere letale Dosis
Gb ₃	Globotriaosylceramid	LE-Agarose	Low Electroendosmosis-Agarose
Gb ₄	Globotetraosylceramid	LEE	Locus of Enterocyte Effacement
Gersten-GPS	Ganzpflanzensilage aus Gerste	LFGB	Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch
H-	nicht beweglich	LKV	Landeskontrollverband
h	Stunden	LMBG	Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetz
H-Antigen	Geißel-Antigen (von „Hauch“)	Lpf	Long polar fimbriae
HC	Hämorrhagische Colitis	LT	Hitze-labiles Toxin
HCl	Salzsäure	luxI	AHL-synthetisierendes Enzym
HeLa-Zellen	humane Cervixkarzinom-Epithelzellen	luxR	AHL-Rezeptor
HEp-2-Zellen	humane Zellen eines epidermoiden Karzinomes des Larynx	M	Mol
Hnt	Hauch-Antigen nicht typisierbar	mA	Milliampere
HUS	Hämolytisch-Urämisches Syndrom	MDa	Megadalton
I	Italien	MDBK-Zellen	Madin Darby Bovine Kidney-Zellen
J	Japan	µL	Mikroliter
k.A.	keine Angabe	min	Minuten
katP	Plasmid-codierte Katalase-Peroxidase	mJ	Milijoule
		mL	Milliliter
		mM	millimolar
		n	Anzahl

N	Norwegen	rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
NaCl	Natriumchlorid	RT	Raumtemperatur
NaOH	Natriumhydroxid	RTX	repeats in toxin
NBT	Nitroblau- Tetrazoliumchlorid	S	Schweden
ng	Nanogramm	s	Sekunde
NL	Niederlande	Saa	STEC Autoagglutination Adhäsion
nle	non-LEE-encoded (nicht-LEE-codiert)	SAS [®]	Statistical Analysis System
nm	Nanometer	Screening-PCR	PCR mit den Primern MK1/2
NMEC	Neugeborenen-Meningitis verursachende <i>E. coli</i>	sdiA	luxR-Rezeptor Homolog, Rezeptor für AHL
NTEC	Nekrototoxische <i>E. coli</i>	SDS	Sodiumdodecylsulfat
nt	nicht typisierbar	SEPEC	Sepsisverursachende <i>E. coli</i>
O-Antigen	Oberflächen-Antigen	SerP	Serin-Protease
ORF	Open Reading Frame	SF	Sorbitol fermentierend
OR	Odds Ratio	sfp	sorbitol-fermenting EHEC O157 fimbrae, plasmid- codiert
PBS-Lösung	Phosphat Buffered Saline- Lösung	SLT	Shiga-like-Toxin, entspricht dem Shiga-Toxin
PCR	Polymerase Chain Reaction	SMAC-Agar	Sorbitol-MacConkey-Agar
pH	potentia Hydrogenii	SNP	Single Nukleotide Polymorphism
PL	Polen	SSC-Lösung	Standard Saline Citrate- Lösung
pO157	Plasmid von O157, trägt <i>EHEC-hly_A</i>	ST	Hitze-stabiles Toxin
Qse	Quorum sensing <i>E. coli</i> Regulator	STEC	Shiga-Toxin bildende <i>E. coli</i>
RC	Republik China	stx	codierendes Gen für Stx
Rd	Rind	Stx	Shiga-Toxin
RecA	Induktor von DNA- Reparaturprozessen	TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
RKI	Robert Koch-Institut	TccP	TIR cytoskeleton coupling Protein
ROK	Republik Korea		
rpm	Umdrehungen pro Minute		

TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer	%	Prozent
TIR	Translocated Intimin Receptor	=	gleich
TMR	Totalmischration	+	positiv, plus
Tris	Trishydroxymethyl-aminomethan	-	negativ, minus
t-RNA	transfer-Ribonukleinsäure	>	größer als
TTP	Thrombotisch-Thrombozytopenische Purpura	≥	größer oder gleich
tw.	teilweise	<	kleiner als
UPEC	uropathogene <i>E. coli</i>	≤	kleiner oder gleich
USA	Vereinigte Staaten von Amerika	⊙	Durchschnitt/Mittel
UV	Ultraviolett	®	geschütztes Warenzeichen
V	Volt	™	geschütztes Warenzeichen (engl.: trademark)
Verozellen	Nierenepithelzellen von <i>Cercopithecus aethio</i>	§	Paragraph
vs.	versus, gegen	°C	Grad Celsius
VT	Verotoxin, entspricht dem Shiga-Toxin		
		n.s.	p>0,10, nicht signifikant
		*	p≤0,10, Tendenz
		**	p<0,05, signifikant
		***	p<0,01, hoch signifikant
		****	p<0,001, höchst signifikant

1 Einleitung

Erkrankungen des Menschen durch Shiga-Toxin bildende *Escherichia coli* (STEC) gehören zwar nicht zu den häufigsten zoonotischen Krankheiten, besitzen aber durch lebensbedrohende Komplikationen in Verbindung mit einer niedrigen Infektionsdosis große Bedeutung. Sie führen beim Menschen zu verschiedenen Krankheitsbildern, beginnend bei wässrigem Durchfall bis hin zu hämorrhagischen Colitiden. Besonders bei Kleinkindern tritt nach Infektionen mit STEC das schwerwiegende Krankheitsbild des Hämorrhagisch-Urämischen Syndroms (HUS) auf, bei älteren Patienten gelegentlich die ebenso lebensbedrohende Thrombotisch-Thrombozytopenische Purpura (TTP). Wesentlicher Virulenzfaktor der STEC ist das namensgebende Shiga-Toxin, wobei sich bei humanpathogenen Isolaten häufig der Adhäsionsfaktor Intimin, sowie ein spezifisches Hämolysin zusätzlich nachweisen lassen.

Als Reservoir für STEC gelten Wiederkäuer und hier in besonderem Maße Rinder. In ihrem Kot sind diese Erreger regelmäßig nachweisbar. Die Tiere selbst zeigen jedoch keine Krankheitssymptome, wodurch die Erkennung ausscheidender Tiere erschwert wird. Eine Identifikation von mit der STEC-Ausscheidung zusammenhängenden Faktoren eröffnet die Möglichkeit zur Verminderung der STEC-Prävalenz in rinderhaltenden Betrieben.

Verschiedene Faktoren, wie die Fütterung, die Haltung, das Herdenmanagement und verschiedene Umweltfaktoren wurden bereits untersucht und zum Teil als Risikofaktoren identifiziert (Cobbald et al., 2004; Ellis-Iversen et al., 2007; Garber et al., 1999; Gunn et al., 2007; Ogden et al., 2004; Rugbjerg et al., 2003). Weiterhin setzt sich die Erkenntnis durch, dass Tier-individuelle Faktoren eine Rolle bei der STEC-Ausscheidung spielen. Relevant sind hier das Alter der Tiere (Stanford et al., 2005a), aber auch Leistungsmerkmale, wie die Milchleistung und der Fett- und Eiweißgehalt der Milch (Kuhnert et al., 2005; Schouten et al., 2005). Viele Milchmerkmale, beispielsweise der Milhharnstoff-, Fett- und Eiweißgehalt, sowie die somatische Zellzahl geben ebenfalls Hinweise auf die Stoffwechselsituation und den Gesundheitsstatus der Kuh und können damit auf STEC-Ausscheider hinweisen (Kuhnert et al., 2005). Infolge der individuellen Differenzen der Tiere bestehen deutliche Unterschiede der Ausscheidungsintensität und -dauer (Matthews et al., 2006b), deren detaillierte Ursache noch zu ergründen ist.

In der vorliegenden Arbeit wird eine über den Zeitraum von zwölf Monaten angelegte Longitudinalstudie vorgestellt, die es durch die Auswahl fester Proben-tiere auf sechs verschiedenen Milchvieh-haltenden Betrieben ermöglicht, individuelle Ausscheidungsmuster ebenso zu erkennen wie Aussagen über die Herde zu treffen. Zusätzlich erfolgt eine Analyse Tier-individueller Laktationsmerkmale, der Körperkondition und des Gesundheitszustandes in Hinblick auf die STEC-Ausscheidung. Zur Bewertung des humanpathogenen Potentials der auf diesen Betrieben vorhandenen STEC erfolgt zusätzlich die Charakterisierung der STEC-Isolate von ausscheidenden Tieren.

2 Literaturübersicht

2.1 *Escherichia coli*

2.1.1 Taxonomie

Durch Theodor Escherich im Jahre 1885 erstmals aus Säuglingsstuhl isoliert, gehört *Escherichia (E.) coli* phylogenetisch zur großen Gruppe der *Enterobacteriaceae*. *Escherichia coli* ist ein Gram-negatives, stäbchenförmiges, meist durch peritriche Begeißelung bewegliches Bakterium mit einem fakultativ anaeroben Stoffwechsel. Eine Kapselbildung ist bei vielen Stämmen vorhanden. In der biochemischen Charakterisierung reagiert *E. coli* Oxidase-negativ und Katalase-positiv und ist in der Regel fähig, Glukose, Laktose, Mannose, Sorbitol, Rhamnose, Melibiose und Arabinose zu fermentieren. Vorhanden sind meist auch die Enzyme β -Galactosidase, Lysin- und Ornithin-Decarboxylase, Tryptophanase (Indol-Test) und Gelatinase. Die optimale Wachstumstemperatur liegt bei 37°C, so dass *E. coli* den mesophilen Bakterien zuzuordnen ist (Holt et al., 1994).

Natürliches Habitat von *E. coli* ist der Dickdarm und der hintere Teil des Dünndarms des Menschen und anderer warmblütiger Tiere. Die Darmflora wird dominiert durch *Bacteroides*-, *Eubacterium*-, *Bifidobacterium*- und *Fusobacterium*-Arten (Moore und Holdeman, 1974). *Escherichia coli* stellt mit einem Anteil von bis zu einem Prozent der Biomasse ein Bakterium der Begleitflora dar (Moore und Holdeman, 1974). Die natürlicherweise im Darm vorkommenden Varianten sind apathogener oder fakultativ pathogener Natur.

Aufgrund seines in Kultur relativ anspruchslosen Wachstums und zahlreichen Informationen über seine Eigenschaften – *E. coli* ist einer der best untersuchtesten Modellorganismen der Welt (Farmer et al., 1985) – bietet das Bakterium sich vielfach für eine Verwendung in der Molekularbiologie und Biotechnologie an. Zu nennende Beispiele sind unter anderem die Anwendung zur Biosynthese verschiedener Stoffe, wie Insulin, aber auch als Rezipient für in der Gentechnik verwendete Vektoren.

Escherichia coli weisen eine starke Heterogenität in ihrem Geno- und Phänotyp auf, dies wird durch ihre Empfänglichkeit für den horizontalen Genaustausch erklärt (Köhler et al., 2001). Eine früher obligatorisch vorgenommene Art der Klassifizierung der verschiedenen *E. coli* ist die Einteilung nach dem modifizierten Kauffmann-White-Schema. Hier erfolgt eine Gruppierung aufgrund der mit verschiedenen Antisera nachzuweisenden Oberflächen (O)- und Geißel (H)-Antigenen in verschiedene Serovaren (Ørskov und Ørskov, 1984). Mit dieser Typisierung wurde der Versuch unternommen, pathogene und apathogene Serovare zu definieren. Die Verteilung der

Virulenzfaktoren ist innerhalb der einzelnen Serovare jedoch häufig verschieden und eine zuverlässige Differenzierung allein über die Serovare ist nicht gewährleistet.

Aus diesem Grund erfolgt die Einteilung inzwischen häufig in Abhängigkeit von den im Genom des Bakteriums enthaltenen Virulenzfaktoren, dem so genannten Virulenzprofil, in Form von Pathovaren.

Während apathogene und fakultativ pathogene Varianten nur beim Vorkommen von prädisponierenden Faktoren eine Krankheits-verursachende Rolle spielen, sind obligat pathogene *E. coli* aufgrund ihres Virulenzprofils zur Infektion eines Wirtes befähigt und führen regelmäßig zu gastroenteralen und extraintestinalen Erkrankungen (Hahn et al., 1999).

2.2 *E. coli*-Pathovare

Eine erste Einteilung der obligat pathogenen Varianten erfolgt anhand der Lokalisation ihres krankheitsverursachenden Potentials im Wirtsorganismus. Man unterscheidet die darmpathogenen Varianten von denen, deren Habitat außerhalb des Darmes liegt.

Zu den für Menschen **extraintestinal pathogenen *E. coli*** (ExPEC) gehören die uropathogenen *E. coli* (UPEC), die durch ihre Virulenzfaktoren in Form von Adhäsinen und dem Hämolyisin *hly_{Urf}* zu einer Infektion des Harnapparates fähig sind, die humane Neugeborenen-Meningitis verursachenden *E. coli* (NMEC), sowie die Sepsis verursachende Pathovare (SEPEC) (Redford und Welch, 2002). Bis zu 80% der Harnwegs- und Blaseninfektionen beim Menschen sind auf uropathogene *E. coli* zurückzuführen, verkomplizierend können Pyelonephritiden daraus resultieren (Rolle und Mayr, 2007). Die NMEC sind bei Neugeborenen die typischen Erreger der bakteriellen Meningitis und Sepsis, wobei bis zu 40% der Erkrankungen tödlich enden (Russo und Johnson, 2003). Bei der Septikämie adulter Menschen spielen Sepsis verursachende *E. coli* (SEPEC) ebenfalls eine Rolle, so werden etwa 30% der durch Gram-negative Keime hervorgerufenen Septikämien durch SEPEC hervorgerufen (Hahn et al., 1999).

Eine Rolle als Erreger von extraintestinalen Erkrankungen bei Tieren spielen die aviär pathogenen *E. coli* (APEC), die bei jungen Hühnern und Puten Coliseptikämien verursachen. Bedeutung hat weiterhin die bei Lämmern und Kälbern relevante Coliseptikämie, die durch SEPEC-ähnliche Stämme hervorgerufen wird. Eine Besonderheit ist die porcine Ödemkrankheit, deren Erreger ein Subtyp der Shiga-Toxin bildenden *Escherichia coli* (STEC) ist, die grundsätzlich zu den darmpathogenen Pathovaren zu rechnen sind. Exprimierte Virulenzfaktoren dieser porcinen Stämme sind F18ab-Fimbrien und das Shiga-Toxin_{2e}, ein Neurotoxin, das zur Ödembildung führt. Andere extraintestinale *E. coli* verursachen beim Tier Mastitiden, Pyometren, Harnwegs- und Wundinfektionen (Rolle und Mayr, 2007).

Die **darmpathogenen *E. coli*** verursachen aufgrund ihrer unterschiedlichen Virulenzprofile Erkrankungen verschiedener Symptomatik im Magen-Darmtrakt des Menschen; ein Teil der Pathovaren ist auch tierpathogen.

Einige Virulenzfaktoren dienen der Einteilung in die Pathovar-Gruppen, diese sind in der **Tabelle 1** fett dargestellt, andere Virulenzfaktoren sind lediglich fakultativ vorhanden und erhöhen die Virulenz.

Tabelle 1: Einteilung darmpathogener *E. coli*-Pathovaren

Pathovar	Virulenzfaktoren	Erkrankungen beim	
		Menschen	Tier
Shiga-Toxin bildende <i>E. coli</i> (STEC)	Shiga-Toxin , Adhäsine, EHEC-Hämolysin,	Diarrhöe, HC, HUS, TTP	Diarrhöe
Enteropathogene <i>E. coli</i> (EPEC)	Adhäsine (LEE ¹ , EAF-Plasmid ²)	Säuglingsdiarrhöe	Jungtierdiarrhöe
Enterotoxin bildende <i>E. coli</i> (ETEC)	Enterotoxine (LT ³ und/ oder ST ⁴), Adhäsine	Reisediarrhöe, Cholera-ähnlicher Durchfall	Neonatale Kälberdiarrhöe, Coliruhr des Ferkels
Enteroaggregative <i>E. coli</i> (EAggEC)	Adhäsine (AAF ⁵), Zytotoxine (EAST-1 ⁶ , <i>hly_{ut}</i> -like Hämolysin)	chronisch persistierende Diarrhöe	evtl. Ferkeldiarrhöe
Enteroinvasive <i>E. coli</i> (EIEC)	Invasin , Enterotoxine	Shigellenruhr-ähnliche Erkrankung	k.A.
Diffus adhärenente <i>E. coli</i> (DAEC)	Adhäsine (AIDA-1) ⁷ , fimbriale und non-fimbriale Adhäsion)	wässrige Diarrhöe	k.A.
Nekrotoxische <i>E. coli</i> (NTEC)	CNF ⁸ , Hämolysin, Adhäsine	extraintestinale Infektion	Kälberdiarrhöe, -septikämie

¹ Locus of Enterocyte Effacement

² EPEC Adherence Factor-Plasmid

³ Hitze-labiles Toxin

⁴ Hitze-stabiles Toxin

⁵ Aggregative Adherence Fimbriae

⁶ EAggEC Heat Stable Enterotoxin 1

⁷ Adhesin Involved in Diffuse Adherence-1

⁸ Cytotoxic Necrotising Faktor

k.A.: keine Angaben

fett dargestellt: zur Pathovareinteilung dienende Virulenzfaktoren

Enteropathogene *E. coli* (EPEC) bilden eine wichtige Untergruppe der darmpathogenen Pathovaren, sie sind der häufigste bakterielle Erreger von Säuglings- und Jungtierdurchfällen. Per definitionem gelten durch einen Beschluss des „Second International Symposium of EPEC“ (Trabulsi und Kaper, 1996) solche Stämme als EPEC, welche die typischen Attaching und Effacing (A/E)-Läsionen in der Darmschleimhaut verursachen und kein Shiga-Toxin produzieren. Diese zweite Einschränkung ist essentiell, da auch Stämme der Shiga-Toxin bildenden *Escherichia coli* (STEC) A/E-Läsionen verursachen können, diese jedoch nach Definition der STEC den Shiga-Toxin bildenden *E. coli* zugeordnet werden müssen. Eine weitere Unterteilung erfolgt aufgrund der Präsenz eines zusätzlichen Virulenzfaktors, des EPEC Adherence Factor (EAF)-Plasmids, das für das bundle-forming-pili (bfp) und andere Pathogenitätsfaktoren der EPEC codiert. Als „typische EPEC“ oder auch „Class 1“ werden in diesem Sinne EPEC bezeichnet, die EAF positiv sind, als „untypische EPEC“ oder „Class 2“ solche, die kein EAF-Plasmid aufweisen (Kaper, 1996). Die Infektion erfolgt initial über eine lokale Adhäsion mittels der im EAF-Plasmid codierten bfp. Daraufhin kommt es zu einer Reihe von Signaltransduktionen zur intestinalen Epithelzelle. Das für die Signalübertragung verantwortliche Gen liegt chromosomal codiert auf der „Pathogenitätsinsel“ LEE (Locus of Enterocyte Effacement) und verschlüsselt Proteine eines Typ III-Sekretionssystem und weitere sezernierte Proteine, es enthält auch das *eae* (*E. coli* Attaching und Effacing)-Gen. Im Laufe der Kolonisation erfolgt eine festere Anlagerung über den durch das *eae*-Gen codierten Adhäsionsfaktor Intimin. Dieses führt zur Ausbildung der A/E-Läsionen, die durch Anheftung und cytoskeletalen Umbau verursacht werden. Toxine werden nicht exprimiert (Nataro und Kaper, 1998).

EPEC sind in Industrieländern nur noch selten mit Krankheit assoziiert. Lediglich Kinder unter zwei Jahren gelten als empfänglich für den typischen Erreger des Säuglingsdurchfalls. Im Jahr 2008 wurden 64% der *E. coli*-bedingten Enteritiden, bei denen ein Pathovar mitgeteilt wurde, durch EPEC verursacht (Robert Koch-Institut, 2009). Ein großes Problem stellen EPEC in Entwicklungsländern dar: Teilweise ist die Inzidenz EPEC-verursachten Durchfalls bei Säuglingen höher als die der *Rotaviridae*-bedingten Durchfälle (Robins-Browne et al., 1980). Tierrelevant zeigen sich EPEC ebenfalls. In der Jungtieraufzucht von Kaninchen verursachen diese Pathovaren erhebliche Verluste (Rolle und Mayr, 2007), weiterhin treten sie als Erreger von Jungtierdurchfällen bei Kälbern, Lämmern, Ferkeln und Hundewelpen auf (Janke et al., 1989; Moon et al., 1983).

Enterotoxin bildende *E. coli* (ETEC) verursachen beim Menschen einen in der Regel selbstlimitierenden, wässrigen Durchfall. Zur Differenzierung von anderen Pathovaren dienen zwei Plasmid-codierte Virulenzfaktoren, das hitzelabile Toxin LT und/oder das hitzestabile Toxin ST, sie sind obligatorisch bei ETEC vorhanden (Levine, 1987). Das Toxin LT ist strukturell und funktionell eng mit dem Cholera-Enterotoxin (CT) von *Vibrio cholerae* verwandt. Die Aminosäuresequenz ist zu 80% ähnlich (Nataro und Kaper,

1998). Es existieren zwei Serogruppen von LT, benannt in LT-I und LT-II, die keine immunologische Kreuzreaktion aufweisen. Während LT-I häufig bei humanpathogenen ETEC-Stämmen nachzuweisen ist, wird LT-II nahezu ausschließlich bei ETEC-Stämmen gefunden, die keine Pathogenität aufweisen. Auch beim hitzestabilen Toxin ST existieren zwei Subgruppen. STa wird von ETEC und mehreren anderen gramnegativen Bakterien produziert, STb ist hingegen eindeutig den ETEC zuzuordnen. Interessanterweise weisen STa und das bei den enteroaggregativen *E. coli* beschriebene EAST-1 50% Homologie in der Aminosäuresequenz auf (Nataro und Kaper, 1998). Regelmäßig von humanen ETEC-Stämmen isoliert wird besonders das Toxin STa. STb tritt eher bei porcinen ETEC-Stämmen auf. LT und ST haben einen ähnlichen Wirkmechanismus: Sie führen zu einer Aktivierung der Adenylatzyklase, bzw. der Guanylatzyklase. Dies hat schlussendlich über eine Phosphorelierung von Chloridkanälen der apikalen Zellmembran eine sekretorischen Diarrhöe zur Folge (Nataro und Kaper, 1998). Eine wichtige Rolle bei der Infektion durch ETEC spielen weiterhin zahlreiche Adhäsionsfaktoren, die in einer Vielzahl von Formen als starre Fimbrien, fibrilläre, flexible Zellausläufer oder als bfp ausgeprägt sein können. Diese Kolonisationsfaktoren unterscheiden sich nach Art des Wirtes, so weisen humanpathogene ETEC-Stämme im Vergleich zu tierpathogenen ETEC einen anderen, typischen Fimbrientyp auf. Daraus ist zu folgern, dass kein Zoonosepotential besteht.

Plasmide codieren für die verschiedenen Toxine, aber auch für die Gene der Kolonisationsfaktoren (Nataro und Kaper, 1998). Wie bereits erwähnt verursachen ETEC beim Menschen eine wässrige Diarrhöe, die meist ohne Fieber und Erbrechen einhergeht. Der Durchfall setzt plötzlich ein, ist aber in der Regel selbstlimitierend. Risikopatienten stellen vor allem Säuglinge und Reisende dar, die immunologisch naiv mit ETEC in Kontakt kommen. Etwa 20% bis 40% der sogenannten „Reisedurchfälle“ werden durch ETEC verursacht, das Vorkommen beschränkt sich aber auf die tropischen und subtropischen Breitengrade (Nataro und Kaper, 1998). In gemäßigten Temperaturzonen und höher industrialisierten Ländern stellen ETEC-Durchfälle eine Rarität dar (Nataro und Kaper, 1998). Von den 2008 in Deutschland diagnostizierten Enteritiden durch darmpathogenen *E. coli* wurden lediglich 4% von ETEC verursacht; Erkrankte waren in fast allen Fällen Kinder unter 10 Jahren (Robert Koch-Institut, 2009). Infektionen von ETEC bei Tieren kommen vor allem bei Kälbern in Form des neonatalen Kälberdurchfalls und beim Ferkel als Coliruhr vor. Gekennzeichnet sind diese Erkrankungen durch starken wässrigen Durchfall mit erheblichem Flüssigkeits- und Elektrolytverlust, der regelmäßig zu Kümmerern oder auch zum Tode führt (Nagy und Fekete, 1999).

Nataro et al. (1985) zeigten, dass einige *E. coli*-Stämme, die aufgrund fehlender Toxinproduktion nicht als ETEC bezeichnet werden können, trotzdem ähnlich wie EPEC an HEp-2-Zellen adhärirten, ihre Adhäsion wurde jedoch anders vermittelt. Dies führte 1987 zur Erstbeschreibung einer neuen Variante von darmpathogenen *E. coli*, den **enteroaggregativen *E. coli* (EAggEC)** (Nataro et al., 1987). Diese Untergruppe zeigt eine Aggregative Adhärenz (AA) und ist durch das Vorkommen einer lokalen Autoagglutination charakterisiert. Enteroaggregative *Escherichia coli* verursachen eine Sekretion von Mucus durch die Darmepithelzellen. In der Folge kommt es zur Ausbildung eines in großen Mengen Keime enthaltenen Biofilms auf der Mucosa-Oberfläche. Experimentelle Studien mit EAggEC deuten auch auf eine Beteiligung von Zytotoxinen an der Pathogenese der Erkrankung hin (Nataro und Kaper, 1998). Von Bedeutung scheint das dem ST-Toxin der ETEC verwandte EAggEC Heat Stabile Enterotoxin 1 (EAST-1) zu sein. In Arbeiten der Forschergruppe Zamboni et al. (2004) wurde ein Zusammenhang zwischen dem Vorkommen von EAST-1 und dem Auftreten von Durchfall nachgewiesen. Zum Teil erfolgt die Bildung eines dem hly_{uti} der UPEC ähnelnden Hämolyzins. Weitere exprimierte Adhäsionsfaktoren können die Aggregative Adherence Fimbriae I und II (AAF-I bzw. AAF-II) sein, sie werden jedoch nur bei einem geringen Anteil der EAggEC ausgebildet (Nataro und Kaper, 1998).

Humane Krankheitsbilder sind zum einen das „Chronic Diarrhea Syndrome“, aber auch sporadische wässrige Durchfälle mit Schleimbeimengungen. Erkrankungsfälle treten vornehmlich bei Kindern und in Entwicklungsländern auf, die Bedeutung von EAggEC in den Industrienationen nimmt aber zu. Der Anteil der *E. coli*-Enteritiden durch EAggEC stieg seit 2001 von 0,3% auf 2% im Jahr 2008 (Robert Koch-Institut, 2002b; Robert Koch-Institut, 2009). Über die Rolle von EAggEC bei Durchfallerkrankungen von Tieren ist bisher noch wenig bekannt. Studien zufolge scheinen sie zumindest für immunologisch naive Ferkel pathogen zu sein (Tzipori et al., 1992).

Eine humane Infektion mit **enteroinvasiven *E. coli* (EIEC)** führt zu einem Shigellose-ähnlichen Krankheitsgeschehen. Gekennzeichnet ist die Erkrankung durch wässrige Durchfälle, die im weiteren Verlauf auch schleimig-blutig werden können. Eine Tierpathogenität scheint nicht vorhanden zu sein (Rolle und Mayr, 2007). Von EIEC gebildete Virulenzmerkmale ähneln denen der eng verwandten Spezies *Shigella*. Die für die Pathogenität verantwortlichen Virulenzfaktoren sind vor allem ein Invasin, das auf dem Plasmid plnV liegt und die Penetration des Bakteriums in die Darmepithelzelle ermöglicht. Zusätzlich wird die Beteiligung eines Enterotoxins diskutiert (Nataro und Kaper, 1998). Von den 5.290 dem RKI unter Angabe des Pathovars gemeldeten durch *E. coli* verursachten Enteritiden wurden im Jahr 2008 weniger als 1% den EIEC zugeordnet (Robert Koch-Institut, 2009).

Diffus adhärenzte *E. coli* (DAEC) wurden 1987 gemeinsam mit den EAggEC als neue Untergruppe der darmpathogenen *E. coli* beschrieben (Nataro et al., 1987). Auch sie ähneln den EPEC-Stämmen, bisher ergaben Untersuchungen keine Toxinproduktion. Im Unterschied zu den EAggEC adhäreren DAEC diffus an HEP-2-Zellen und zeigen keine Autoagglutination. Die Anhaftung erfolgt teilweise über Fimbrien, aber auch über AIDA-1 (Adhesin Involved in Diffuse Adherence-1), ein non-fimbriales Adhäsionsmolekül (Benz und Schmidt, 1992). Über eine eventuelle Tierpathogenität gibt es bisher keine Angaben (Rolle und Mayr, 2007). Der Nachweis von DAEC im Kot scheint mit dem Auftreten einer wässrigen Diarrhöe assoziiert zu sein (Poirineau et al., 1995). Kinder im Schulalter leiden häufiger an Diarrhöe durch diesen Erreger als Kleinkinder, wobei die Ursache dieses Sachverhaltes noch nicht gefunden wurde (Levine et al., 1993).

Nekrotische *E. coli* (NTEC) sind im eigentlichen Sinne nicht eindeutig den darmpathogenen *E. coli*-Stämmen zuzuordnen. Neben Enteritiden verursachen sie wesentlich häufiger Infektionen des Harnapparates und Septikämien. Zur Klasseneinteilung verwendeter Virulenzfaktor ist ein Zytotoxin, das als Cytotoxic Necrotising Faktor (CNF) bezeichnet wird. Die Namensgebung beruht auf dem nekrotisierenden Effekt des Toxins auf Kaninchenhaut. Es existieren zwei Subtypen der NTEC, die unterschiedliche Virulenzfaktoren exprimieren. NTEC-1 sezernieren CNF 1, NTEC-2 CNF 2, wobei CNF 1 eine stärkere zytotoxische Wirkung aufweist (De Rycke et al., 1999). Zusätzlich werden bei NTEC-1 Stämmen noch ein α -Hämolyysin und ein P-fimbriärer Adhäsionsfaktor ausgeprägt, während CNF 2 im Zusammenhang mit einem F17-verwandten fimbriären Adhäsion, genannt F17-b, und anderen non fimbriären Kolonisationsfaktoren steht. Bedeutung als Krankheitserreger haben vor allem NTEC-1-Stämme, sie sind beim Menschen uro- und darmpathogen. Tierpathogene Relevanz weisen diese Stämme bei Schweinen und Kälbern auf. Infektionen führen vor allem bei Jungtieren zu Durchfällen. Beim Schwein wurde von pulmonalen Infektionen, beim Rind auch von Septikämien berichtet (De Rycke et al., 1999). NTEC-2 ist ein häufig in den Faeces symptomloser Wiederkäuer nachzuweisender Keim, kann jedoch gelegentlich auch Jungtierseptikämien verursachen (De Rycke et al., 1999).

2.3 Shiga-Toxin bildende *E. coli* (STEC)

Diese Pathovar nimmt unter den darmpathogenen *E. coli* eine besondere Rolle ein: Es wird von einigen Autoren sogar als die zurzeit für den Menschen wichtigste *E. coli*-Pathovar bezeichnet (Karmali, 1989; Robert Koch-Institut, 1996a). Diese Bedeutung resultiert im Wesentlichen aus der Schwere der durch STEC hervorgerufenen humanen Krankheitsbilder in Kombination mit einer niedrigen Infektionsdosis von weniger als 50 Keimen (Tilden et al., 1996). Eine häufig unterschätzte Rolle spielen in vielen Regionen auch Durchfallerkrankungen durch STEC (Pai et al., 1988). Dieser Humanrelevanz hat auch der Gesetzgeber Rechnung getragen: Seit 1998 besteht

durch §3 des Bundes-Seuchengesetz, 2001 abgelöst von §6 und §7 des Infektionsschutzgesetz, eine Meldepflicht für humane Ausscheider und Erkrankte. Zur Differenzierung der Erkrankungen werden bei der Meldung „*Escherichia coli*, enterohämorrhagische Stämme“ separat von „*Escherichia coli*, darmpathogene Stämmen“ erfasst (Anonymus, 1998). Im Jahr 2008 wurden 835 STEC-Infektionen (neben dem Hämolytisch-Urämischen Syndrom (HUS)) beim Menschen übermittelt, zusätzlich traten 59 enteropathische HUS-Fälle auf, die ebenfalls seit dem 1. September 2003 gesondert übermittelt werden. Darmpathogene Stämme von *E. coli* treten mit größerer Häufigkeit auf, hier sind im Jahr 2008 7.004 Fälle gemeldet worden (Robert Koch-Institut, 2009). Weiterhin wurde 2003 eine Zoonosen-Überwachungsrichtlinie (Richtlinie 2003/99/EG) verabschiedet, in der die Überwachung und Kontrolle von Infektionen mit verschiedenen Zoonoseerregern, darunter auch STEC, neu geregelt wird und die in Deutschland im Jahr 2004 durchgeführt wurde (Anonymus, 2004). Dies soll dazu führen, dass eine verbesserte epidemiologische Untersuchung von Krankheitsausbrüchen ermöglicht wird. Die folgenden Betrachtungen und Untersuchungen in dieser Arbeit beziehen sich auf STEC.

2.3.1 Definition

STEC sind definiert als *E. coli*-Stämme, die die Fähigkeit besitzen, ein Shiga-Toxin zu bilden (Nataro und Kaper, 1998). Dies beinhaltet auch Stämme, deren Genom *stx* enthält und die damit die Fähigkeit zur Stx-Produktion besitzen. Shiga-Toxin wird *in vivo* und *in vitro* nicht immer aktiv sezerniert (Melton-Celsa und O'Brien, 1998; Nataro und Kaper, 1998; Robert Koch-Institut, 1999c). Das Shiga-Toxin ist der wichtigste Virulenzfaktor der STEC, das Vorkommen von weiteren zusätzlichen Virulenzfaktoren, wie Intimin und EHEC-Hämolysin, kann die Pathogenität der STEC jedoch erhöhen. Welche der zusätzlichen Virulenzfaktoren vorhanden sein müssen, um eine Erkrankung beim Menschen hervorzurufen, ist nicht restlos geklärt.

2.3.2 Historie

STEC sind evolutionär junge Keime, sie werden erst seit wenigen Jahrzehnten vermehrt nachgewiesen. Die Entwicklung der STEC erfolgte vermutlich aus apathogenen *E. coli*-Stämmen durch horizontalen Gentransfer.

Im Jahre 1977 beschrieben Konowalchuk et al. (1977) die Reaktion von Vero-Zellen auf ein vom LT-Toxin der ETEC differentes Toxin, welches von einigen *E. coli*-Stämmen exprimiert wird. Vero-Zellen sind Nierenepithelzellen von afrikanischen grünen Meerkatzenaffen (*Cercopithecus aethio*), die regelmäßig in Zellkulturen Verwendung finden. Dieses Toxin wurde daraufhin aufgrund seiner Pathogenität für Vero-Zellen als Verotoxin bezeichnet. Im Unterschied zu LT, welches zu einem Anschwellen und zur Ausbildung von filamentösen Fortsätzen bei Vero-Zellen führt, hat das Verotoxin ein Zusammenschrumpfen der Zellen zur Folge. Eine Einwirkung von Verotoxin (VT) über bis zu acht Tage führt zu einer völligen Auflösung der Zellrasens, während sich die Zellen nach Inkubation mit LT wieder erholen und nach drei Tagen wieder ein normales Bild aufweisen (Konowalchuk et al., 1977).

In einer Arbeitsgruppe von O'Brien et al. (1982) wurden zeitgleich *E. coli*-Stämme identifiziert, die ein Toxin produzieren, das dem Shiga-Toxin 1 von *Shigella dysenteriae* strukturell, biochemisch und vor allem immunologisch gleicht. Aufgrund der Ähnlichkeit zum Shiga-Toxin 1 wurde das Toxin von *E. coli* als Shiga-Like-Toxin (SLT) bezeichnet (O'Brien et al., 1982). Zufälligerweise befand sich unter den untersuchten Isolaten auch ein *E. coli*-Stamm, für den Konowalchuk et al. (1977) in ihrer Studie eine Verotoxin-Bildung nachgewiesen hatten. Weitere Analysen zur Charakterisierung des SLT ergaben, dass es sich bei Verotoxin, Shiga-Like-Toxin und dem Shiga-Toxin von *Shigella* um das gleiche Toxin handelt (O'Brien und LaVeck, 1983). Als Karmali et al. (1983) die Shiga-Toxin bildenden *E. coli* dann noch in Zusammenhang mit sporadischen HUS-Fällen brachten, war die humanpathogene Bedeutung der STEC bewiesen.

O'Brien et al. (1982) hatten ihre These für die immunologische Übereinstimmung aufgrund der Neutralisation von Shiga-Toxin₁ (Stx₁) von STEC durch spezifische Antikörper gegen Shiga-Toxin 1 von *Shigella dysenteriae* getroffen. Schon 1985 wurde jedoch nachgewiesen, dass das Antiserum nur an einen bestimmten Shiga-Toxin (Stx)-Typ bindet, andere Stx-Typen damit aber nicht reagieren (Scotland et al., 1985). Diese Hinweise ließen auf eine Heterogenität der Stx-Typen schließen (Karmali et al., 1986; Scotland et al., 1985). Das nicht mit Stx₁-Antikörpern neutralisierbare Shiga-Toxin₂ (Stx₂) konnte aber mit einem spezifischen monoklonalen Antikörper für Stx₂ gebunden werden, so dass von zwei zwar verwandten, aber dennoch unterschiedlichen Stx-Typen ausgegangen werden muss (Scotland et al., 1985).

2.3.3 Nomenklatur

In den Jahren nach der Erstbeschreibung existierte keine einheitliche Nomenklatur des Toxins, die Bezeichnungen Shiga-Like-Toxin (SLT) und Verotoxin (VT), bzw. Shiga-Like-Toxin-bildende *E. coli* (SLTEC) und Verotoxin-bildende *E. coli* (VTEC) wurden simultan verwendet. Zur Vereinheitlichung schlug Calderwood (1996) vor, SLT und VT von *E. coli* und das Shiga-Toxin 1 von *Shigella dysenteriae* zu einer Toxinfamilie zusammenzufassen und als Shiga-Toxin, abgekürzt Stx, zu bezeichnen, das codierende Gen sollte in *stx* benannt werden. Diese Vereinigung begründete er in der Homologie der DNA-Sequenz der Toxine, ihres strukturellen Aufbaus, ihrer identischen Enzymaktivität mit dem gleichen Rezeptor und ihrer gemeinsamen biologischen Eigenschaften (Calderwood et al., 1996). Der Begriff Shiga-Toxin wurde bereits 1898 für das Toxin 1 von *Shigella dysenteriae* durch seinen Entdecker, den japanischen Mikrobiologen Kiyoshi Shiga, geprägt (O'Loughlin und Robins-Browne, 2001). Trotz einiger Unstimmigkeiten innerhalb der Forschergemeinde – so widersprachen Karmali et al. (1996) dieser Umbenennung – wird in der hier vorliegenden Arbeit der Empfehlung von Calderwood et al. (1996) gefolgt und die Bezeichnung Shiga-Toxin bildende *Escherichia coli* (STEC) verwendet.

Unter dem Oberbegriff der „Enterohämorrhagischen *E. coli*“ (EHEC) fasste Levine (1987) alle *E. coli*-Stämme zusammen, die beim Menschen hämorrhagische Colitis und das hämolytisch-urämische Syndrom verursachen, Stx produzieren, A/E-Läsionen verursachen und ein ca. 60MDa Plasmid aufweisen. Als Prototyp der humanpathogenen *E. coli*, und damit auch als Urtyp der EHEC, galt lange Zeit die Serovare O157:H7 (Karmali, 1989). Im Laufe der Jahre wurden jedoch auch andere Serovare, darunter O157:H-, O26:H11, O111:H-, O103:H2 und O145:H28 von erkrankten Menschen isoliert, die hinsichtlich hervorgerufener Klinik, ihrer Epidemiologie und ihrer pathogenen Eigenschaften mit der Serovare O157:H7 vergleichbar sind. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt werden immer wieder neue Serovare als humanpathogen erkannt, so dass sich die Beschränkung der EHEC auf die Serovare O157:H7 als unzureichend erwiesen hat. In Deutschland betrachtet das Robert Koch-Institut inzwischen jeden STEC zumindest als potentiell humanpathogen und somit als potentiellen EHEC. Die Charakterisierung des Erregers erfolgt nun über das Vorhandensein von verschiedenen Virulenzfaktoren und nicht mehr über seine Serovare (Robert Koch-Institut, 1999c). Diese Definition hat auch Eingang in die rechtlichen Grundlagen der Erregerbekämpfung gefunden: so wird im Infektionsschutzgesetz nur der Begriff „EHEC“, stellvertretend für alle STEC, erwähnt. Bülte et al. (2000; 2001) vertreten hingegen die Ansicht, dass die Unterstellung eines humanpathogenen Potentials bei allen STEC nicht gerechtfertigt erscheint. Zur Verursachung von humanen Krankheitsbildern benötigen STEC ihrer Argumentation folgend zumindest noch den Adhäsionsfaktor Intimin. Die Bezeichnung „EHEC“ sollte in diesem Sinne humanen klinischen Isolaten vorbehalten sein.

2.4 Eigenschaften und Virulenzfaktoren der STEC

Shiga-Toxin bildende *Escherichia coli* sind in Hinblick auf ihre Koloniemorphologie, ihr Wachstum in Kultur und ihren biochemischen Reaktionen in der Regel nicht von apathogenen Varianten von *E. coli* zu unterscheiden. Gelegentlich treten Stoffwechseldefiziente STEC auf, die beispielweise nicht in der Lage sind, Sorbitol zu fermentieren und keine β -Glucuronidase besitzen. Ein „prominentes“ Beispiel dafür ist die Serovare O157:H7, welche regelmäßig zu humanen Erkrankungen führt und aufgrund dieser Unregelmäßigkeiten im Stoffwechsel relativ leicht zu identifizieren ist. Auf diese Besonderheit wird in Kapitel 2.5.2 weiter eingegangen. In folgendem Abschnitt werden die Eigenschaften beschrieben, die STEC zur Auslösung verschiedener Erkrankungen befähigen.

2.4.1 Virulenzeigenschaften

Für eine erfolgreiche Kolonisierung des Magen-Darm-Traktes müssen die STEC zunächst den ersten Abwehrmechanismus des Körpers, das azide Milieu des Magens, passieren. **Säureresistenz** ist jedoch eine der allgemeinen Eigenschaften von *E. coli* und wurde auch für O157:H7 und andere Serovare nachgewiesen (Large et al., 2005; Murinda et al., 2004). Es existiert jedoch eine deutliche Variation hinsichtlich der Säureresistenz. So kann die Serovare O157:H7 sogar in Apfel-Cidre und gesäuerter Salami überleben und aufgrund ihrer Säureresistenz in sehr niedrigen Dosen zu humanen Infektionen führen (Bell et al., 1994; Tilden et al., 1996). Andere Serovare, beispielsweise O111:H8 und O26:H11, waren bei In-vitro-Versuchen wesentlich weniger säureresistent (Bergholz und Whittam, 2007). Bei Inokulation gleicher Keimzahlen von Non-O157:H7- und O157:H7-Serovaren wurde nach einer Inkubation in Magen-ähnlichem Milieu eine doppelt so große Reduktion der Keimzahlen bei Non-O157:H7-Serovaren im Vergleich zu O157:H7-Serovaren nachgewiesen (Bergholz und Whittam, 2007). *Escherichia coli* O157:H7 scheint bei steigender Azidität schneller in eine stationäre Wachstumsphase überzugehen und weist daher eine wesentlich höhere Säureresistenz auf. Eine Inkubation bei einem pH-Wert von 2,5 für den Zeitraum von zwei Stunden überdauerten jedoch die meisten Pathovaren von *E. coli*, während dies für *Salmonella spp.* beispielsweise bereits problematisch ist. Daraus resultieren auch die Unterschiede in der minimalen infektiösen Dosis (Gorden und Small, 1993). Nach Erreichen des Magen-Darm-Traktes ist für eine Infektion des Wirtes die **Anhaftung des Erregers an die Epithelzellen** der Darmwand notwendig. Besitzt das Isolat keine Pathogenitätsinsel „LEE“, bzw. das *eae*-Gen, so kann es trotzdem Erreger von HC und HUS beim Menschen sein (Toma et al., 2004). Über die Adhäsion von *eae*-negativen Stämmen ist jedoch bisher noch relativ wenig bekannt. Die Bedeutungen verschiedener Adhäsine, wie des STEC Autoagglutination Adhäsins (*saa*) (Paton et al., 2001), der Long polar fimbriae (*Lpf*) (Doughty et al., 2002) und des *E. coli* Immunglobulin-bindende Proteins G (*EibG*) (Lu et al., 2006) werden zurzeit diskutiert. Dytoc et al. (1994) wiesen durch *eae*-negative Isolate *in vivo* und *in vitro*

hervorgerufenen lokalen Mirovilli-Verlust nach, der zytoskeletale Umbau, der bei Ausbildung der A/E-Läsionen erfolgt, bleibt aber aus. Der Großteil der humanpathogenen Erreger verfügt hingegen über das *eae*-Gen. Die Anhaftung erfolgt, wie schon in Kapitel 2.2 für die Pathovare EPEC beschrieben, unter Bildung der charakteristischen **Attaching und Effacing (AE)-Läsionen** und zytoskeletalem Umbau (Finlay et al., 1996; Spears et al., 2006). Die Pathogenitätsinsel „LEE“ codiert die bakteriellen Proteine, die zur Ausbildung der A/E-Läsionen notwendig sind. LEE besteht aus den fünf polycistronischen Operons LEE1 bis LEE5. LEE1 bis LEE3 codieren für einen Typ III-Sekretions-Apparat, LEE4 hingegen für ein System zur Proteintranslokation (Barba et al., 2005). Ein Adhäsionsfaktor, bestehend aus dem Outer Membrane Protein Intimin, abgekürzt Eae (*E. coli* Attaching und Effacing Protein) und seinem Rezeptor TIR (Translocated Intimin Receptor) ist durch LEE5 codiert. Der Sekretionsapparat dient dem Transport der sezernierten Proteine aus dem Zytoplasma der Bakterienzelle in eine Zelle des Wirtsorganismus. Bei den sezernierten Proteinen handelt es sich um TIR, ein Mitochondrien-assoziiertes Protein und um die verschiedenen *E. coli* secreted proteins (Esp) F, G, H und Z. Zusätzlich transportiert der Sekretionsapparat weitere nicht LEE-codierte Proteine (Barba et al., 2005). Das Protein TIR wird in die Zellmembran des Wirtsorganismus integriert und dient dort als Rezeptor für Intimin, das auf der Oberfläche des Bakteriums exprimiert wird. Die Bildung der A/E-Läsion und die Umformung des Aktins wird bei STEC durch TIR, ein weiteres Effektorprotein, das TIR cytoskeleton coupling Protein (TccP), welches ebenfalls in die Wirtszelle transloziert wird, und andere sezernierte Proteine veranlasst. Dies induziert den Ablauf einer Signalkaskade, welche zu einer Veränderung des Aufbaus und des Stoffwechsels der intestinalen Epithelzelle führt. Es sind inzwischen mindestens 17 Typen von Intimin ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$, $\beta 2$, $\gamma 1$, $\gamma 2/\theta$, δ/k , ϵ , ζ , η , $\eta 2$, ι , λ , μ , ν , ξ und \omicron) beschrieben, die unter STEC und EPEC weit verbreitet sind (Garrido et al., 2006). Die Unterschiede der Intimintypen bestehen vor allem in der Sequenz des C-terminalen Endes und dadurch bedingter unterschiedlicher Bindung an TIR (Blanco et al., 2004a; Krause et al., 2005), sowie in ihrer Antigenität und ihrer Reaktion in der PCR (Kaper, 1998). EPEC weisen im allgemeinen α -Intimine auf, während humanpathogene STEC eher mit den Intimintypen γ und ϵ assoziiert sind, Intimin β wird von STEC und EPEC exprimiert (Blanco et al., 2005). Besonders bei hochpathogenen Stämmen von der O-Gruppe O157, O111 und O145 kommt der Intimintyp $\gamma 1$ regelmäßig vor, so dass bei der Besiedelung des Darmes und der Invasivität des Erregers der Intimintyp eine bedeutende Rolle zu spielen scheint (Blanco et al., 2005; Caprioli et al., 2005; Rivas et al., 2006). Während der Bildung der A/E-Läsion im Darm kommt es zu einem strukturellen Umbau in der intestinalen Epithelzelle, bestehend aus einer Abrasion des Mikrovilli-Bürstensaums, Formation von Zellausläufern und eine Ansammlung von zytoskeletalen Proteinen in der Nähe des sich eng an die Wirtszelle anhaftenden Bakteriums (Nataro und Kaper, 1998). Die Art des ausgeprägten Intimins scheint relevant für den Gewebetropismus des *E. coli*-Stammes zu sein. β -Intimin-exprimierende EPEC sind in der Lage, den gesamten

Dünndarm zu besiedeln, während die Kolonisation von γ -Intimin tragenden STEC hingegen auf die Region der Follikel-assoziierten Epithelien im Bereich der Peyer'schen Platten begrenzt ist (Fitzhenry et al., 2002). Trotz des Invasionsvermögens von STEC-Stämmen ist das Vorkommen von Septikämien und anderen generalisierten Erkrankungen selten. Systemische Effekte werden in der Regel durch die Wirkung des Shiga-Toxins im Blutkreislauf hervorgerufen (Gyles, 2007). Dass der Besitz des Intimins bei STEC gleichwohl eine Bedeutung hat, zeigten Studien von Paton et al. (1997): Bei Stämmen, die mit humanen Krankheitsausbrüchen assoziiert waren, wurde eine wesentlich höhere Adhäsivität nachgewiesen als bei nicht humanpathogenen Stämmen.

Als zusätzlicher, die Pathogenität bestimmender Faktor kann ein ca. **60MDa Plasmid** vorhanden sein. Wie in der Definition von EHEC in Kapitel 2.3.3 bereits erwähnt, ist dieses Plasmid für die Humanpathogenität des Isolates durchaus von Bedeutung (Levine, 1987). Das Plasmid, üblicherweise als pO157 bezeichnet, wurde zuerst bei der Serovare O157:H7 beschrieben, bei dem es in fast allen Fällen vorhanden ist (Levine, 1987). Dessen ungeachtet ist pO157 auch bei anderen Serovaren weit verbreitet und codiert unter anderem ein als Enterohämolysin, oder auch EHEC-Hämolysin bezeichnetes Hämolysin (Schmidt et al., 1995). Das **EHEC-Hämolysin** ist ein Poren-bildendes Zytolysin und gehört zu einer Toxin-Familie, die aufgrund ihrer hochkonservierten repetitiven Domäne allgemein als RTX (Repeats in Toxin)-Toxine bezeichnet werden (Schmidt et al., 1996b). Andere Toxine dieser Familie sind beispielsweise das Hämolysin der uropathogenen *E. coli* und das Toxin von *Pasteurella hämolytica* (Bauer und Welch, 1996). Das EHEC-Hämolysin codierende Gen *EHEC-hlyA* zeigt mit dem *hlyA* der UPEC sogar eine Homologie von ca. 60%. Im Gegensatz zum UPEC-Hämolysin wird das EHEC-Hämolysin jedoch nicht in das Nährmedium oder die Umgebung sezerniert, was auf einen defekten Sekretionsapparat zurückzuführen ist (Schmidt et al., 1995). Neben dem EHEC-Hämolysin codiert pO157 weitere Virulenzfaktoren, unter anderem eine Katalase-Peroxidase, Serin-Proteasen, verschiedene weitere Toxine und Adhäsionsfaktoren (Nataro und Kaper, 1998). Zur Bedeutung des EHEC-Hämolysins ist bisher nur wenig bekannt. Theorien zufolge könnte eine die Stx-Toxinwirkung vorbereitende Rolle vorhanden sein (Schmidt et al., 1996a). So wurde für das α -Hämolysin der uropathogenen *E. coli* eine Stimulation der Produktion von β -Interleukin im Zielorganismus nachgewiesen, wobei für das EHEC-Hämolysin eine ähnliche Wirkung angenommen wird (Schmidt et al., 1996a). Interleukin- β seinerseits erhöht die Toxizität von Stx durch eine vermehrte Expression des Stx-Rezeptors Globotriaosylceramid (Gb₃) (Kaye et al., 1993). Durch diese synergistische Wirkung könnte es in besonderem Ausmaß zu Störungen der Zellfunktionen kommen (Suttrop et al., 1990). Diese These wird durch den Sachverhalt bestätigt, dass bei klinischen HUS-Fällen regelmäßig *EHEC-hlyA*-positive STEC-Stämme nachgewiesen werden, bzw. ein Großteil der HUS-Patienten seropositiv für dieses immunogene Zytolysin ist (Schmidt et al., 1995). In Deutschland tragen ca. 90% der von Patienten isolierten STEC das

Plasmid pO157 (Beutin et al., 1995). Zusätzlich unterstützt das bei der Lyse der Erythrozyten freiwerdende Häm und Hämoglobin über eine verbesserte Eisenversorgung das Wachstum der STEC (Nataro und Kaper, 1998). Aldick et al. (2007) formulierten die von den eben erwähnten epidemiologischen Daten unterstützte Hypothese, dass das EHEC-Hämolysin ursächlich an der Zellschädigung der renalen Endothelzellen und der Ausbildung eines Hämolytisch-Urämischen Syndroms beteiligt ist. Die Forschergruppe analysierte die Virulenzeigenschaften von mehreren *stx*-negativen Isolaten, die von HUS-Patienten gewonnen worden waren. Alle Isolate waren *EHEC-hlyA*-positiv und zeigten in In-vitro-Versuchen eine zytotoxische Wirkung auf humane microvaskuläre Endothelzellen.

Zum Teil können noch weitere, putative Virulenzfaktoren bei STEC nachgewiesen werden, unter anderem eine Plasmid-codierte Katalase-Peroxidase (KatP), die zur Minderung des oxidativen Stress dient. Weiterhin der ebenfalls Plasmid-codierte Autotransporter Serin-Protease (SerP), welcher über seine Protease-Aktivität in der Lage ist, verschiedene Enzyme zu inaktivieren. STEC mit diesen Virulenzfaktoren kommen regelmäßig in Lebensmitteln tierischer Herkunft vor (Nataro und Kaper, 1998). Das über einen Prophagen codierte Nle (Non-LEE-encoded) A, auch EspI genannt, ist sogar mit Humanpathogenität assoziiert und unter O157:H7 und non-O157:H7 STEC weit verbreitet (La Ragione et al., 2009). Bekannt ist eine durch NleA hervorgerufene Inhibition des Sekretionsmechanismus des Golgi-Apparates, die Bedeutung dieses Virulenzfaktors bei der Kolonisation des Magen-Darm-Traktes ist jedoch bisher unklar (La Ragione et al., 2009). Ein weiteres Nle-Protein, EspJ, ist für die Adhäsion im Wirt nicht notwendig, sondern scheint stattdessen die Phagozytose von Makrophagen zu hemmen (Marches et al., 2008). Darüber hinaus werden „EHEC Type II Secretion Pathway“ (etp) als Transportproteine nachgewiesen (Nataro und Kaper, 1998). Das bereits erwähnte, dem Toxin B von *Clostridium difficile* ähnelnde *saa* und der Virulenzfaktor EAST-1 der EAggEC wurden ebenfalls in einigen Isolaten gefunden (Nataro und Kaper, 1998).

2.4.2 Tenazität

STEC werden von Rindern in hohem Maße über den Kot ausgeschieden (siehe Kapitel 2.6.2). Dieser Eintrag in die Umwelt stellt eine bedeutende Erregerquelle dar. Eine lange Überlebenszeit von STEC in **Rindermist** und **Rindergülle** spielt für die Aufrechterhaltung des Infektionszyklus im Betrieb und auch für die Kontamination von Futter- und Lebensmitteln sowie des Tränkewassers eine bedeutende Rolle.

In Kot auf der Weide und der darunter liegenden Erde überdauern *E. coli* O157:H7 in gemäßigten Breitengraden (Irland) bis zu 99 Tage (Bolton et al., 1999). Bis 50 Tage nach der Kontamination ist eine Anzucht direkt aus dem im Gras liegenden Kot ohne zwischengelagerte Rekonstitutionsschritte möglich (Bolton et al., 1999). In einem Fall wird sogar von einem Kind berichtet, welches sich eine Infektion von *E. coli* O157:H7 durch Kontakt mit Gartenerde zuzog, die 60 Tage zuvor mit Rindergülle gedüngt worden war (Mukherjee et al., 2006). Durch kontaminierten Boden und auf der Weide liegenden Schafkot von zuvor dort grasenden Schafen infizierten sich 20 Teilnehmer eines Pfadfinderlagers mit *E. coli* O157:H7 (Ogden et al., 2002). Als Infektionsweg wurde die Aufnahme des Erregers über mit Bodenbestandteilen und Pfützenwasser verunreinigte Hände identifiziert. In sich anschließenden Studien wurden die Keime über einen Zeitraum von 105 Tagen in vollständig erhaltener Virulenz aus dem lehmhaltigen Boden isoliert (Ogden et al., 2002).

Ein Nachweis aus Gülle gelang bei *E. coli* O157:H7 nach bis zu 70 Tagen Ablagerung (Wang et al., 1996). Eine effektive Dekontaminationsmaßnahme für pathogene Keime stellt in diesem Fall die Zugabe von Löschkalk dar: Durch die pH-Wert-Erhöhung auf einen pH-Wert von 12,0 für mindestens 2 h werden *E. coli* zuverlässig abgetötet (Bujoczek et al., 2001).

Das Kompostieren von Rinderkot in Form eines Misthaufens stellt eine weitere Maßnahme zur Reduktion der Belastung mit *E. coli* O157:H7 dar. Nach mehr als 14 Tagen Lagerung wurden auch mittels Anreicherungsverfahren keine Erreger mehr aus dem Kompost isoliert (Shepherd et al., 2007). Problematisch stellt sich jedoch die Oberfläche des Misthaufens dar, da hier der Keim aufgrund mangelnder Erhitzung und nicht ausreichender Konkurrenzflora-Entwicklung über einen Zeitraum von vier Monaten nachgewiesen wurde (Shepherd et al., 2007). Zur effektiven Reduktion der STEC ist also ein regelmäßiges Wenden des Misthaufens unbedingt erforderlich (Shepherd et al., 2007). Relevant für das Überleben von O157:H7-Serovaren im Dung scheinen weiterhin der pH und der Fasergehalt der Kotes zu sein, wobei sich niedrigere pH-Werte und geringere Fasergehalte begünstigend auswirkten (Franz et al., 2005).

Über die Persistenz von Non-O157:H7-Serovaren existieren nur wenige Studien. Die japanische Forschergruppe um Fukushima (1999) beschäftigte sich mit den O-Gruppen O26, O111 und O157 aus Rinderkot. Die Erreger wurde bei Lagertemperaturen von 5°C, 15°C und 25°C bis zu 56 Tage lang nachgewiesen. In

einer weiteren Studie wurde die Tenazität von Non-O157:H7-Serovaren in Misthaufen analysiert (Goncalves und Morin, 2007). Auch hier ergaben sich Unterschiede in der Überlebenszeit des Erregers in gewendeten und ungewendeten Misthaufen. Die einfache Ablagerung des Mistes führte innerhalb von 90 d (maximale Temperatur 35°C), 16 d (56°C) oder 9 d (65°C) zu einer Elimination der STEC im Kern des Misthaufens, während der Erreger in regelmäßig gewendeten Misthaufen auch bei niedrigen Temperaturen nach 42 d nicht mehr nachzuweisen war. Zudem wurden *stx*-negative *E. coli* im Kompost über einen Zeitraum von 120 Tagen wiederholt nachgewiesen, wohingegen die *stx*₂-Gene von Non-O157:H7 STEC bereits nach 30 Tagen nicht mehr isoliert wurden (Goncalves und Morin, 2007). Dies unterstreicht die Bedeutung der Konkurrenzflora bei der Reduktion von STEC-Stämmen, diese scheinen der Kompostierung gegenüber sensibler zu sein als apathogene *E. coli*.

Kontaminationen von **Tränkebecken** mit Rinderkot sind weit verbreitet. Enthalten diese STEC, so besitzt die Tränke bei unzureichender Reinigung ein bedeutendes Potential als Langzeitreservoir. Die Serovare O157:H7 wurde aus dem Sediment von Tränkebecken bei Außentemperaturen über einen Zeitraum von bis zu sechs Monaten isoliert und behielt dabei seine Infektiosität (LeJeune et al., 2001a). Eine Kontamination von Tränkebecken mit O157:H7 lag in 1,3% der untersuchten Proben vor (LeJeune et al., 2001b; Sargeant et al., 2000). Es wird zum Teil auch von Kontaminationsraten von bis zu 12% berichtet (Van Donkersgoed et al., 2001). Ein relativ zuverlässiger Indikator für die Verunreinigung mit STEC O157:H7 und Keimen allgemein ist der Grad der Trübung des Wassers: ein Trübheitsgrad von 4 auf einer Skala von 1 (klares Wasser) bis 10 (komplett getrübe, schwarze Flüssigkeit) war in 54,5% der Proben mit einem Keimgehalt von über 58 cfu/mL assoziiert (Smith et al., 2008).

Über die Relevanz von Futtermitteln als Überträger von STEC finden sich in der Literatur unterschiedliche Angaben. In den USA wurden in einigen Studien je nach Labormethodik in etwa 10% der aus Futtertrögen entnommenen Futterproben *E. coli* O157:H7 nachgewiesen (Dodd et al., 2003). Andere Studien ergaben, dass Futtermittel keine STEC O157:H7 enthalten (Hancock et al., 1998b). Qualitativ hochwertige **Silage** stellt durch die Absenkung des pH-Werts auf etwa 4,0 kein Reservoir für STEC dar. Das relativ säurefeste Serovare O157:H7 war nach 8 d in einer mit dieser Serovare beimpften Maissilage nicht mehr nachweisbar (Avery et al., 2005), so dass davon ausgegangen werden kann, dass diese Fermentation auch zur Elimination anderer STEC-Serovare ausreicht. Ähnliche Ergebnisse erzielten auch andere Forschergruppen, die in analysierter Silage keine O157:H7-Isolate nachwiesen (Faith et al., 1996; Heuvelink et al., 1998b; Hutchison et al., 2006). Überprüfungen schlecht fermentierter Silage ergaben jedoch in Stellen mit aerobem Verderb neben Schimmelpilzbefall auch eine Vermehrung von O157:H7 um vier Log-Stufen von 10³ auf 10⁷ cfu/g (Fenlon und Wilson, 2000). Die Kontamination mit STEC erfolgt in der

Regel über die mit Rinderkot benetzten Reifen der Zugfahrzeuge beim notwendigen Verdichten der Silage (Fenlon und Wilson, 2000).

Kommerziell erhältliche **Fertigfuttermittel** sind ebenfalls als problematisch einzustufen, obwohl in Studien keine oder nur geringgradige Verunreinigungen mit O157:H7 gefunden wurden (Hancock et al., 2001; Hutchison et al., 2006). Nach Animpfung von Mischfuttermitteln mit O157:H7 und anschließender Lagerung bei den natürlicherweise herrschenden Umgebungstemperatur für 24h wurde eine Vermehrung des Erregers um zwei bis fünf Log-Stufen festgestellt (Lynn et al., 1998). Dieses Ergebnis unterstreicht die Relevanz von Fertigfuttermitteln als Erregerreservoir (Lynn et al., 1998). Die zur Herstellung pelletierter Fertigfuttermittel verwendete Kombination aus Temperatur und Zeit reicht nicht aus, um stärker kontaminiertes Futter von O157:H7 zu befreien. Eine Erhitzung der Pellets auf 70°C für 120 s reduziert die Belastung mit STEC O147:H7 lediglich um 2,2 Log-Stufen (Hutchison et al., 2007).

Auch **Weidegras** stellt eine Infektionsquelle für Rinder dar. Britische Wissenschaftler wiesen in 6,3% der untersuchten Grasproben *stx*-Gene nach, wobei eine sichtbare Kotkontamination der Proben nicht vorhanden war. Nachgewiesene Serovare waren in diesem Fall O2, O22 und Isolate mit nicht typisierbarem O-Antigen (Ont) (Hutchison et al., 2006).

Die Bedeutung der Umgebung als STEC-Reservoir wird häufig unterschätzt, wobei die Substrate auf Betriebsebene äußerst vielfältig sind. In dieser Arbeit wurde der Schwerpunkt jedoch auf die Tierebene gelegt, ohne die Umwelt als Erregerreservoir näher zu untersuchen.

2.4.3 Vielfalt der an STEC-Infektionen beteiligten Serovaren

2.4.3.1 STEC-Serovare beim Menschen

Der Erreger, der bei der erstbeschriebenen humanen STEC-Infektion durch Riley et al. (1983) isoliert wurde, gehörte der Serovare O157:H7 an. O157:H7 ist weltweit mit einer Vielzahl an menschlichen Krankheitsfällen assoziiert und wird häufig als der typische humanpathogene STEC angenommen. Obwohl bis zum heutigen Tag über 200 STEC-Serovare bei erkrankten Menschen isoliert wurden (MicroBioNet, 2008; World Health Organisation, 1998), verursachen doch nur einige Serovare den Hauptteil aller Erkrankungen beim Menschen. So wurden in Dänemark 81 von 312 dokumentierten STEC-Ausbrüche durch O157:H7 ausgelöst (Nielsen et al., 2006). Insgesamt wurden nur acht der vielen möglichen Serogruppen als Erreger in 68% (212) der Erkrankungsfälle nachgewiesen (Nielsen et al., 2006). Zu diesen gehäuft humanpathogenen O-Gruppen zählen O157, O103, O146, O26, O117, O145, O128 und O111 in der Reihenfolge der abnehmenden Häufigkeit des Nachweises (Nielsen et al., 2006). Das gehäufte Auftreten bestimmter Serovare scheint landesspezifisch zu sein, während andere hingegen weltweit nachgewiesen werden. Zu diesen weltweit verbreiteten O-Gruppen gehören neben O157 unter anderen auch O26, O103, O111

und O145 (Gyles, 2007). In einer Studie in den USA, die retrospektiv durch Non-O157:H7-STECC bedingte humane Krankheitsfälle aus dem Zeitraum 1998 bis 2002 analysierte, wurde gehäuft die O-Serogruppe O26 (22%) isoliert. Etwas weniger häufig traten Erkrankungen durch O111 (16%), O103 (12%), O121 (8%), O45 (7%), und O145 (5%) auf (Brooks et al., 2005).

In Deutschland und anderen europäischen Ländern sind die Erreger unkomplizierter STECC-Infektionen vor allem Non-O157:H7-STECC (Beutin et al., 1998). Die Serovare O157:H7 verursachte im Jahre 2004 etwa ein Fünftel der Infektionen; die Serovare O26 und O103 wurden etwas weniger häufig nachgewiesen (Robert Koch-Institut, 2005a). Im Verlauf der letzten Jahre verlor die Serovare O157:H7 zumindest für enteropathische STECC-Infektionen weiter an Bedeutung, 2008 verursachte es lediglich 15% der gemeldeten humanen EHEC-Erkrankungen in Deutschland (Robert Koch-Institut, 2009). In den Jahren 2006 bis 2008 betrug der kumulierte Anteil der Infektionen mit den Serovaren O26 und O103 über 30% (**Abbildung 1**) (Robert Koch-Institut, 2007; 2008b; 2009). Regelmäßig mit humanen Erkrankungsfällen assoziierte Non-O157:H7-STECC-Serovare sind O26:H11/H-, O103:H2, O145:H28/H-, O111:H8/H- und O91:H14/H21/H- (Bielaszewska, 2009). Gelegentlich können auch andere Serovare bei humanen Patienten nachgewiesen werden, dazu gehören neben der Gruppe Orah, deren Serovare aufgrund einer Selbstagglutination nicht weiter bestimmbar ist, vor allem O55, O113, O128, O146, O78, aber auch andere seltenere Serovare (Robert Koch-Institut, 2004a; 2005a; 2006c; 2007; 2008b).

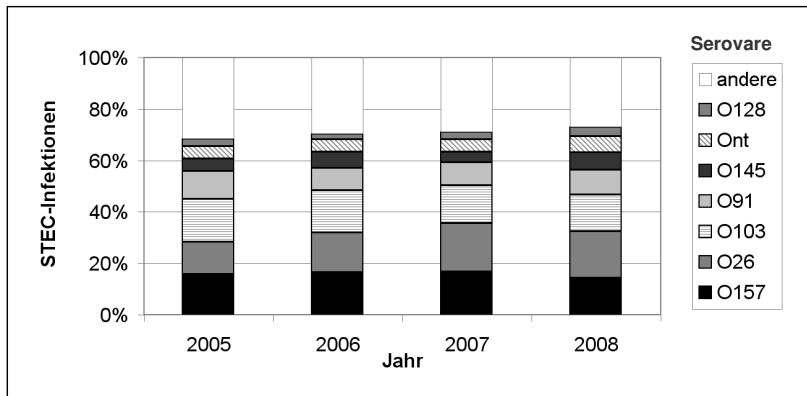


Abbildung 1: Anteile humanpathogener O-Gruppen an STECC-Infektionen bei Menschen in Deutschland (nach Angaben des Robert Koch-Institutes (2005a; 2006c; 2007; 2008b; 2009))

Beim Nachweis von STEC bei an HUS-erkrankten Patienten wird hingegen größtenteils die Serovare O157:H7 isoliert. Ihr Anteil an HUS-Fällen in Deutschland lag seit Jahren im Bereich von 75% der verursachten HUS-Fälle (Robert Koch-Institut, 2004a; 2005a; 2006c; 2007; 2008b), inzwischen sind jedoch lediglich 52% der mit Serovare gemeldeten HUS-Erkrankungen durch *E. coli* O157:H7 bedingt (Robert Koch-Institut, 2009). Zwei weitere Serovare, O26 und O145, wurden in den letzten Jahren ebenfalls wiederholt bei HUS-Patienten nachgewiesen (**Abbildung 2**). Grundsätzlich sind vermutlich viele Serovare in der Lage, HUS auszulösen. Sporadisch treten immer wieder Fälle mit bisher selten nachgewiesenen Serovaren auf: Im Jahr 2006 wurden beispielsweise bei einigen Patienten in Deutschland die Serovare O2 und O158 nachgewiesen (Robert Koch-Institut, 2007). Im Jahre 2007 hingegen traten einige HUS-Fälle bedingt durch die Serovare O20 und Orauh auf (Robert Koch-Institut, 2008b). Auch im Jahr 2008 traten einige Fälle an HUS, verursacht durch ungewöhnliche STEC-Serovare, wie O22, O103 und O113 auf (Robert Koch-Institut, 2009).

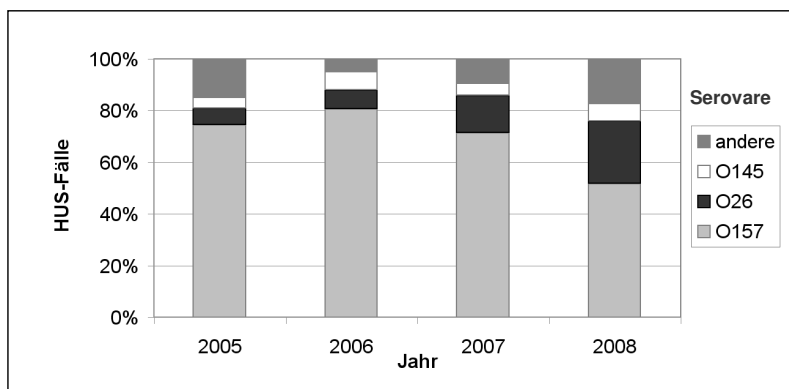


Abbildung 2: Anteile bisher isolierter STEC-Serovare bei am Hämolytisch-Urämischen Syndrom erkrankten Menschen (nach Angaben des Robert Koch-Institutes (2005a; 2006c; 2007; 2008b; 2009))

Die Vielfalt der pathogenen Serovare wird aus der Auflistung von MicroBioNet (2008) ersichtlich. Diese von Bettelheim et al. verfasste, regelmäßig aktualisierte Übersicht beinhaltet eine Vielzahl von aus HUS-Fällen isolierte Serovare und umfasst 115 Serovaren (**Tabelle 2**). Diese Auflistung verdeutlicht, dass die Zugehörigkeit zu einer bestimmten Serovare für die Virulenz eher unbedeutend ist und die Infektiosität und Invasivität des Erregers von der individuellen Ausstattung mit Virulenzfaktoren abhängt. Dadurch treten auch immer wieder Erkrankungsfälle auf, die auf Serovare zurückzuführen sind, denen bisher noch kein humanpathogenes Potential zugeschrieben wurde.

Tabelle 2: Übersicht über weltweit mit HUS beim Menschen assoziierte STEC-Serovare, sortiert nach O-Gruppe (MicroBioNet, 2008)

O1:H-,H7	O69:H-	O125:H-
O2:H29	O70:H35	O126:H27
O2:H6,H7	O75:H5	O128:H-,H2,H7
O4:H,H5	O77:H-	O134:H25
O5:H-	O79:H7	O137:H41
O6:H-,H2,H4	O83:H1	O145:H-,H25,H28
O8:H2,H19,H21	O84:H-	O146:H8
O9:H-	O86:H-	O153:H2,H25
O11:H2	O91:H-,H10,H21	O163:H19
O14:H-	O92:H33,H?	O165:H-,H25
O18:H?	O98:H-	O168:H-
O20:H19	O100:H25	O172:H-,H2
O22:H5,H8	O101:H-	O174:H-,H2,H21
O23:H-	O103:H-,H2,	O?:H-,H11
O25:H2	O103:H18,H21,H?	O105ac:H18
O26:H-,H11,H?	O104:H-,H2,H21	O111ac:H-
O45:H2	O105:H18	O112ac:H- :H2
O46:H31	O111:H-,H2,H7,H8,H?	O128ab:H2,H45
O48:H21	O113:H21	OR:H-,H4,H9,H11,H16,H25,H49
O50:H7	O118:H-,H2,H12,H16,H30,H?	OX174:H21
O55:H-,H6,H7,H10,H?	O119:H2,H5,H6	OX177:H-
O68:H4	O121:H10,H19	OX3:H-,H2,H21

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Serogruppen-Verteilung nicht nur geographische Unterschiede aufweist, sondern dass auch Differenzen in Abhängigkeit des Schweregrades der Erkrankung zu beobachten sind. Bei Erkrankungen mit extraintestinalen Komplikationen wie beispielsweise HUS überwiegt die Serovare O157:H7, wobei die Dominanz weniger auf das Oberflächenantigen zurückzuführen ist als auf die bei dieser Serogruppe weit verbreiteten Virulenzfaktoren *eae* und *stx*₂. STEC, die diese beiden Virulenzfaktoren tragen, führen bei Infektion regelmäßig zu schweren Krankheitsverläufen. Von HUS-Patienten isolierte O157:H7 sind zu 92% *eae*- und *stx*₂-positiv, während dies bei Non-O157:H7 nur für 13% der Isolate gilt (Werber et al., 2003). Bei STEC-bedingten Enteritiden wurden stattdessen in 39,8% der Fälle Stx₁-bildende Stämme nachgewiesen, wohingegen nur 2,9% der von HUS-Patienten gewonnenen Isolate *stx*₁-positiv waren (Bockemühl et al., 1998). Die Arbeit einer dänischen Forschergruppe unterstützt die Aussage von einer Serovare-unabhängigen, aber Virulenzfaktor-dependenden Invasivität: Das Vorhandensein von *eae* und *stx*₂ stellt einen Risikofaktor für die Ausbildung vom HUS dar, nicht jedoch das Vorliegen eines bestimmten Serovares (Ethelberg et al., 2004).

2.4.3.2 STEC-Serovare bei Rindern

Bis heute wurden im Gastrointestinaltrakt von Rindern unterschiedlichste Serovare mit großer serologischer Bandbreite nachgewiesen. Wie in **Tabelle 3** dargestellt, wurden bisher 125 O-Serogruppen und 340 STEC-Serovare von Rindern isoliert, wobei nur 18 O-Serogruppen (O2, O5, O8, O20, O22, O26, O45, O82, O91, O103, O113, O116, O118, O153, O156, O157, O171, O172, O174) und 14 Serovare (O20:H19; O22:H8; O26:H11; O45:H-; O82:H8; O103:H-; O113:H-, H21; O116H21; O153:H25; O157:H7; O171:H2; O172:H21; O174:H-, H2, H21) regelmäßig nachgewiesen werden (Blanco et al., 2002). Während in Europa besonders O113:H21 dominiert, werden in Amerika und Australien vorwiegend O26:H11 und in Japan O45:H8 und O145:H- aus bovinen Kotproben identifiziert (Blanco et al., 2002). Von 340 bisher bei Rindern isolierten STEC-Serovaren wurden 138 (40,5%) bereits beim Menschen isoliert, darunter waren 49 mit HUS assoziiert (Blanco et al., 2002).

Tabelle 3: Übersicht über bisher aus Rinder-Kotproben isolierte STEC-Serovare, sortiert nach O-Gruppe (MicroBioNet, 2008)

O1:H18, H20	O69: H11, H-	O126: H8, H20, H21, H27, H-
O2: H5, H7, H25, H27, H29, H39, H45, H49, H-	O70:H8, H11, H-	O127:H21, H-
O3:H-	O73:H?	O128: H31, H35, H-
O4:H4, H7, H11, H16, H25, H-	O74:H19, H28, H29, H42, H52, H-	O130: H11, H38, H43
O5:H6, H11, H27, H-	O75: H8, H19	O131:H2
O6:H3, H8, H10, H34, H49, H-	O76: H19, H21, H25	O132:H2, H18, H-
O7: H4, H6, H40	O77: H18, H41	O133
O8: H2, H8, H9, H16, H19, H25, H35, H-	O79:H19, H-	O136:H1, H12, H16, H19, H-
O9:H4, H-	O80:H31, H-	O138:H48
O10:H21, H-	O81:H28, H31	O139:H8, H19, H51
O11:H8, H-	O82:H2, H8, H40, H-	O140:H21, H32
O15:H4, H7, H11, H16, H19, H27, H-	O84: H2, H8, H28, H-	O141: H2, H7, H8, H-
O16:H2, H21	O85: H-	O145: H8, H16, H25, H28, H-
O17: H18, H21, H41	O86:H26, H28	O146:H1, H8, H21, H32, H-
O18:H11	O87:H8, H16, H31, H-	O147:H11, H29
O19	O88:H8, H21, H25, H-	O148:H8
O20: H7, H16, H19	O90:H24, H-	O149:H1
O21:H21	O91:H7, H10, H14, H19, H21, H49	O150: H-
O22: H1, H2, H8, H16, H21, H40, H-	O92:H-	O152:H-
O23:H15, H-	O96:H19, H-	O153:H7, H9, H11, H12, H19, H21, H25, H31, H32, H-
O25:H5	O98:H25, H-	O156:H7, H8, H19, H21, H25, H46, H-
O26: H11, H21, H-	O101:H4	O157: H7, H8, H-
O28:H9, H21, H40, H-	O102:H21	O159:H28
O29:H34	O103: H2, H16, H21, H39, H42, H-	O160
O32:H7, H16, H-	O104:H11, H21	O162: H4, H7, H21, H28
O35:H21	O105: H18	O163:H2, H19, H21, H-
O38:H16, H21, H39	O106:H42, H-	O165: H21, H25, H-
O39:H7, H8, H21, H40, H48, H49, H-	O109:H16, H-	O166: H28, H-
O40: H8, H21, H-	O110:H2	O167:H21
O41: H2, H14, H51	O111: H2, H8, H11, H-	O168:H8
O42:H25	O112: H2, H19	O169:H19
O43: H2	O113: H2, H4, H7, H19,	O170:H8
O44:H25, H28, H-	O114: H21, H-	O171: H2, H25
O45: H2, H8, H-	O115:H8, H18	O172:H21, H-
O46: H2, H38, H-	O116:H10, H21, H28, H-	O174 (OX3): H2, H7, H16, H21,
O49:H12, H-	O117: H4, H7, H28, H-	H39, H43, H49, H-
O53:H2	O118: H16, H30, H-	O175 (OX7): H16
O55:H17	O119:H8, H25, H-	OX177: H-
O60:H19	O120:H2, H18, H42, H-	OX178:H19
O63:H19	O121:H7, H-	OX6:H2
O64:H34, H-	O123:H11, H16	OX8:H-
O64:H34, H-	O125:H19	"O"K84:H19

fett dargestellt: ebenfalls beim Menschen nachgewiesene Serovaren

2.4.4 Shiga-Toxin

Wie bereits erwähnt, sind STEC als *E. coli* definiert, die in der Lage sind, mindestens eines der Shiga-Toxine zu bilden. Die wesentliche Bedeutung des Shiga-Toxins für die Pathogenität von STEC-Stämmen ergibt sich aus verschiedenen Faktoren.

Zum Einen sind von allen *E. coli*-Stämmen nur STEC in der Lage, HUS zu induzieren. EPEC-Stämme, die in grundlegenden Eigenschaften mit STEC übereinstimmen, jedoch kein *stx*-Gen aufweisen, lösen kein HUS aus. Auch bei *Shigella spp.* ist zu beobachten, dass nur *Shigella dysenteriae* Typ 1 die Eigenschaft besitzt, Shiga-Toxin zu bilden und auch nur diese *Shigella*-Subspezies mit dem Auftreten von HUS assoziiert ist (Melton-Celsa und O'Brien, 1998). Des Weiteren entspricht die hohe Toxizität von Stx für humane Nierenendothelzellen *in vitro* sehr gut der *in vivo* auftretenden vaskulären Nierenschädigung beim Hämolytisch-Urämischen Syndrom des Menschen (Louise und Obrig, 1995). Auch im Maus-Modell geht eine Infektion mit STEC mit einer Nekrose der Nierentubuli einher (Wadolkowski et al., 1990). Wird das Stx durch passende Antikörper neutralisiert, so induziert es zumindest im Maus-Modell keine Schädigung der Nierenzellen (Wadolkowski et al., 1990). Im Kaninchen-Modell kommt es bei Infektion mit einem Kaninchen-spezifischen EPEC-Stamm, der zuvor mithilfe eines *stx*-codierenden Bakteriophagen verändert wurde, zu einer schwereren Enteritis als ohne Bakteriophagen-Transduktion (Sjogren et al., 1994). Die entstehenden Läsionen ähneln denen, welche bei der hämorrhagischen Colitis des Menschen nachgewiesen werden (Sjogren et al., 1994).

2.4.4.1 Struktur und Wirkungsweise von Shiga-Toxinen

Shiga-Toxine bilden eine Toxin-Familie, deren Mitglieder genetische, strukturelle und funktionale Merkmale miteinander teilen. Ein Toxin-Molekül besteht aus mehreren Untereinheiten: einer A-Untereinheit, deren 28 kDa großer A₁-Teil über den 4 kDa kleinen A₂-Teil mit fünf B-Untereinheiten kombiniert ist. Während das insgesamt etwa 38,5 kDa große B-Pentamer die Bindung des Toxins an den Rezeptor vermittelt, verfügt die insgesamt 32 kDa große, biologisch aktive A-Untereinheit über eine N-Glykosidase-Aktivität. Dieses Enzym bewirkt die Toxizität des Stx: Es kommt zu einer Entfernung eines entscheidenden Purinrestes in der 28S rRNA des 60S-Ribosoms, und damit zu einer Hemmung der Proteinsynthese und zum Zelltod (Endo et al., 1988).

Direkt nach seiner Synthese wird das Shiga-Toxin über ein Signalsequenz-vermitteltes Typ II-Sekretionssystem in den periplasmatischen Raum transportiert. Während Stx₁ meist dort verbleibt, werden Stx₂ und seine Varianten häufiger in das Kulturmedium oder die Umgebung abgegeben (Mainil, 1999).

Die genetische Codierung erfolgt über das Operon *stxAB* mit zwei offenen Leserahmen, Open Reading Frames (ORF), für die A- und die B-Untereinheit, die gemeinsam transkribiert werden. Dieses Operon liegt auf einem Toxin-konvertierenden lambdoiden Bakteriophagen (Smith et al., 1983). Eine Ausnahme stellt das Stx_{2e} dar, welches ähnlich dem Shiga-Toxin 1 von *Shigella dysenteriae* chromosomal codiert ist.

STEC besitzen häufig nur ein Operon für einen Shiga-Toxin-Typ. Zum Teil sind aber auch mehrere Operons für verschiedene Shiga-Toxin-Typen vorhanden. Das Operon für *stx*₁ ist dem *stx*-Operon von *Shigella dysenteriae* sehr ähnlich, während das *stx*₂-Operon nur zu 57% bzw. 60% übereinstimmende Nukleotidsequenzen der Operons im Bereich der Stx A- bzw. der Stx B-Untereinheit aufweist, was sich auch in der Struktur des Toxins widerspiegelt. Trotz dieser Differenzen in der B-Untereinheit haben Stx₁ und Stx₂ die gleiche Rezeptorspezifität: Sie binden an den Glykolipidrezeptor Globotriaosylceramid (Gb₃). Eine Ausnahme bildet auch hier das Stx_{2e}, welches bei der Ödemkrankheit des Schweines relevant ist, da dieses bevorzugt an einen Globotetraosylceramid (Gb₄)-Rezeptor bindet (Degrandis et al., 1989). Es ist jedoch auch in der Lage, den Gb₃-Rezeptor zu aktivieren (Keusch et al., 1995). Die Stx-Internalisation in die Wirtszelle erfolgt mittels einer Rezeptor-vermittelten Endocytose über mit Clathrin-umhüllte Vesikel, gefolgt von einem Transport zum Golgi-Apparat und zum Endoplasmatischen Retikulum. Die A-Untereinheit wird im Folgenden in das Zytoplasma verlagert und inaktiviert durch Bindung an die 60S-Untereinheit der Ribosomen die Proteinsynthese: Stx blockiert die Bindung der Aminoacyl-t-RNA an die 60S-Untereinheit und verhindert damit die Elongation der Peptidkette (O'Loughlin und Robins-Browne, 2001). Einen ähnlichen Effekt wie auf eukaryontische Zellen weist Stx auch auf Bakterienzellen auf, so dass es also ebenfalls der Wachstumshemmung der Konkurrenzflora dient (O'Loughlin und Robins-Browne, 2001). Stx weist zusätzlich einen synergistischen Effekt mit dem Virulenzfaktors Intimin auf, da Stx die Expression eines Intimin-Rezeptors induziert (Robinson et al., 2006).

Konowalchuk und Speirs (1979) beschrieben die zytotoxische Wirkung von Stx auf Vero-Zellen. Diese Wirkung ist jedoch für verschiedene andere Zellen weniger ausgeprägt vorhanden (Blanco et al., 1983; Kashiwazaki et al., 1981; Konowalchuk und Speirs, 1979). Stx₁ und Stx₂ zeigten auch für HeLa-Zellen – humane Epithelzellen eines Cervixkarzinoms, benannt nach ihrer Spenderin Henrietta Lacks – eine ausgeprägte Toxizität. Stx_{2e} ist für diese Zellen 10.000-fach weniger toxisch als für Vero-Zellen, diese Tatsache ist mit der hauptsächlich exprimierten Rezeptorvariante assoziiert (Mainil, 1999). Auf der Oberfläche von Vero-Zellen werden Gb₃- und Gb₄-Rezeptoren gleichmäßig exprimiert, HeLa-Zellen hingegen tragen hauptsächlich Gb₃-Rezeptoren. Konträr dazu weisen MDBK (Madin Darby Bovine Kidney)-Zellen nahezu ausschließlich Gb₄-Rezeptoren auf und sind damit favorisierte Zielzellen für Stx_{2e} (Mainil, 1999).

Angriffspunkte von Stx beim Menschen *in vivo* sind vor allem die vermehrt Gb₃-Rezeptoren tragenden Endothelzellen in der Niere, im Gehirn und in den Schleimhäuten des Magen-Darm-Traktes. Daraus resultieren die typischen Krankheitsbilder beim humanen Erkrankungsfall.

Die enterotoxische Wirkung von Stx zeigt sich in der Tatsache, dass es in ligierten Darmsegmenten von Kaninchen zu einer Flüssigkeitsakkumulation führt. In dieser Hinsicht ähnelt die Wirkung des Stx derjenigen der Hitze-stabilen und Hitze-labilen

Toxine der ETEC-Stämme. Die Enterotoxigenität scheint aber abhängig vom Stx-Typ zu sein. Stx_{2e} weist beispielsweise einen sehr geringen Effekt auf Darmzellen auf. Der genaue Wirkmechanismus für den enterotoxischen Effekt ist nicht bekannt (Mainil, 1999). Eine mögliche Erklärung ist die Absorptionsverminderung infolge einer Mikrovilliabrasion. Die Mikrovilli-Enterocyten werden wesentlich stärker vom Stx beeinflusst als die Kryptenzellen, da sie deutlich mehr Gb₃-Rezeptoren aufweisen. Eine andere Erklärung des enterotoxischen Effektes ist die Absorptionshemmung von Natriumchlorid ohne Veränderung der Ionen-Sekretion oder eine Schädigung nahe liegender Kapillaren, die einen Flüssigkeitsverlust in das Darmlumen zur Folge hätte. Aufgrund der geringen bisherigen Kenntnisse in diesem Bereich ist auch die Beteiligung eines zusätzlichen Enterotoxins, wie beispielsweise eines EAST-1-ähnlichen Toxins denkbar (Mainil, 1999).

Neurotoxische Effekte des Stx wurden wiederholt bei Kaninchen und Mäusen beobachtet. Diese Tiere zeigten bei parenteraler STEC-Infektion eine aufsteigende Paralyse mit letalem Ausgang (Mainil, 1999). Auch bei der Ödemkrankheit des Schweines wird bei Ferkeln eine neurotoxische Wirkung von Stx_{2e} beobachtet, die Neurotoxizität scheint also eine Eigenschaft aller Stx-Typen zu sein (Mainil, 1999).

2.4.4.2 Shiga-Toxin-Typen

Von den zwei unterschiedlichen Shiga-Toxingruppen gleichen die zu Stx₁ gehörenden Toxine strukturell den Shiga-Toxin 1 von *Shigella dysenteriae* und bilden eine sehr homogene Gruppe. Stx₂ weist hingegen nur 55% Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz mit Shiga-Toxin 1 von *Shigella* und Stx₁ von *E. coli* auf, zusätzlich besteht die Stx₂-Gruppe aus verschiedenen sehr heterogenen Untergruppen. Trotz aller sequenzieller Unterschiede ist die Enzymaktivität von Stx₁ und Stx₂ in Zell-freien System und an Vero-Zellen nicht zu unterscheiden, allerdings differiert ihre Toxizität im Mausmodell (Tesh et al., 1993) und für Vero-Zellen (**Tabelle 4**). In einem Fütterungsversuch an Streptomycin-behandelten CD-1-Mäusen mit Stx₁- und Stx₂-positiven STEC-Isolaten wurde die Wirkung von Stx₂ als ursächlich für renale Tubulus-Läsionen mit letalen Ausgang festgestellt (Wadolowski et al., 1990). Diese Unterschiede in der Toxizität sind auch beim Menschen offensichtlich: So ist bei der Inkubation von humanen Nierenendothelzellen Stx₂ 1.000-fach toxischer als Stx₁ (Louise und Obrig, 1995). Dieser Sachverhalt spiegelt sich ebenfalls beim Nachweis der bei HUS-Patienten isolierten STEC wider, wo vermehrt Stx₂-positive Erreger nachgewiesen werden (Ostroff et al., 1989; Scotland et al., 1987). Die Ursache dieser Toxizitätsunterschiede ist bisher nicht bekannt, es wird allerdings eine niedrigere Bindungsaffinität von Stx₂ zum Gb₃-Rezeptor angenommen. Aus dieser niedrigeren Spezifität folgt eine größere Anzahl an Zellen, die gebunden werden können (Tesh et al., 1993). Weiterhin scheint stx₂ vermehrt transkribiert und damit höhere Toxin-Konzentrationen erreicht zu werden (Paton und Paton, 1998). Im Rahmen einer anderen Theorie wird die Bedeutung der zwischen den verschiedenen Stx₂-Subtypen vorkommenden Aminosäuresequenzunterschiede im A₂-Teil der A-Untereinheit

diskutiert (Melton-Celsa und O'Brien, 1998). Diese Differenzen könnten zu einer anderen Interaktion des B-Pentamer mit dem Rezeptor und damit zu einer veränderten Toxizität führen.

Tabelle 4: Vergleich von Stx₁- und Stx₂-Varianten (nach Melton-Celsa et al. (1998), modifiziert; Schmidt et al. (2000) Leung et al.(2003))

Stx-Typ	Aminosäurenähnlichkeit zu Stx ₂ (%)		Spezifische Aktivität für Vero-Zellen/mg Protein	LD ₅₀ für Mäuse bei intraperitonäaler Injektion (ng)	Aktivierbarkeit durch intestinalen Mukus
	A-Untereinheit	B-Untereinheit			
1	55	57	1 x10 ⁹	400	N
2	100	100	(0,75-5) x10 ⁹	0,5-2	N
2c	100	97 ^a	-	-	N
2d	99	97 ^a	5 x10 ⁷	1-5, aktiviert 0,5	J
2e	93	84	2 x10 ⁹	200	N
2f	-	-	-	-	N
2g	96	94	-	-	N

^a die B-Untereinheiten von Stx_{2c} und Stx_{2d} sind identisch
ng: Nanogramm J: ja N: nein

LD₅₀: mittlere letale Dosis
-: keine Angabe

2.4.4.2.1 Shiga-Toxin₁-Varianten

Die Mitglieder der Stx₁-Familie weisen eine sehr große Homologie auf. Bekannte Varianten differieren nur in wenigen Aminosäuren und ohne Auswirkungen auf die Bindungsspezifität, Toxizität und Antigenität (Paton et al., 1995; 1993). Antisera gegen Stx₁ sind in der Lage, das Stx₁ der STEC ebenso zu neutralisieren wie das Shiga-Toxin 1 von *Shigella* (Strockbine et al., 1985). Lediglich zwei Stx₁-Varianten, Stx_{1c} und Stx_{1d}, weisen größere Aminosäuresequenzdifferenzen auf. Bei Stx_{1c} sind neun Aminosäuren der A-Untereinheit und drei Aminosäuren der B-Untereinheit verändert sind, das entspricht einer Aminosäuresequenzhomologie von 97%. Stx_{1d} weist eine Homologie von 93% auf, es differieren 20 beziehungsweise sieben Aminosäuren im Vergleich zu Stx₁ (Bürk et al., 2003).

2.4.4.2.2 Shiga-Toxin₂-Varianten

Im Gegensatz zu Stx₁ weist die Stx₂-Familie große Unterschiede sowohl in der Antigenität als auch in den Aminosäuresequenzen auf. Bisher wurden sieben Varianten von Stx₂ beschrieben: Stx₂, Stx_{2c}, Stx_{2d}, Stx_{2d activatable}, Stx_{2e}, Stx_{2f} und Stx_{2g}. Die Unterschiede zwischen den verschiedenen Stx₂ liegen vor allem in Sequenzunterschieden im Bereich der B-Untereinheit. Daraus resultiert eine Veränderung der Rezeptor-Affinität und -Spezifität. Das Stx_{2e} beispielsweise unterscheidet sich in 16% der Aminosäuresequenz der B-Untereinheit von Stx₂ (Weinstein et al., 1988). Als Folge bindet Stx_{2e} statt an Gb₃ an Gb₄ als funktionellen Rezeptor (Degrandis et al., 1989).

Weitere Unterschiede bestehen in der Zytotoxizität der verschiedenen Stx₂-Typen für Zellkulturen, sowie in der Aktivierbarkeit durch intestinalen Mukus, wie sie beispielsweise bei Stx_{2d activatable} erfolgt (Melton-Celsa et al., 1996). Die Aktivierung von Stx_{2d activatable} wird mittels einer im Mukus enthaltenen Elastase durch enzymatische Kürzung der A₂-Untereinheit initiiert. Im SDS-Gel bewegt sich das aktivierte Stx_{2d activatable} wesentlich schneller als das unaktivierte, da es um zwei Aminosäuren kürzer ist (Kokai-Kun et al., 2000; Melton-Celsa et al., 2002; Melton-Celsa und O'Brien, 1998). Die Aktivierung verändert die Toxizität durch veränderte Rezeptoraffinität und effizienteren intrazellulären Transport. Hingegen lässt sich diese Aktivierung bei Stx_{2g} nicht nachweisen, obgleich die C-terminale Region der A₂-Untereinheit identisch zu der von Stx_{2d} ist.

Stx_{2c} und nicht aktiviertes Stx_{2d} sind im Vergleich für Vero-Zellen wesentlich weniger toxisch als Stx₂ und aktiviertes Stx_{2d}. Diese Unterschiede in der Toxizität sind im Grunde auf die Differenz nur einer Aminosäure in der B-Untereinheit zurück zu führen (Lindgren et al., 1994).

2.4.4.3 Einflüsse auf die Shiga-Toxinbildung

Die Bildung von Shiga-Toxinen unterliegt einer Reihe von unterschiedlichen Einflüssen. Die Produktion von Stx₁ wird über die Transkription reguliert und durch hohe Eisenkonzentrationen und niedrige Temperaturen supprimiert (Mainil, 1999), während die Regulation der Produktion von Stx₂ über andere Mechanismen erfolgt und von zwei relevanten Einflüssen abhängt. Zum Einen kann über eine Phagenvermehrung eine Vervielfältigung der Toxingene erreicht werden, zum Anderen erfolgt die Regulation der Toxinproduktion über einen Phagen-codierten Faktor, welcher einen verstärkenden Einfluss auf die Stx₂-Sekretion ausübt (Mühldorfer et al., 1996). Eine Induktion der Phagen ist mit einer Steigerung der Toxinproduktion gleichzusetzen. Diese ist beispielsweise durch Mitomycin, Trimethoprim, Furazolidon und Quionolon-Antibiotika aber auch durch UV-Bestrahlung, die Einwirkung von Mutagenen oder eine Umgebung mit mangelnder Nährstoffversorgung zu erreichen (Acheson und Donohuerolle, 1989; Al-Jumaili et al., 1992; Kimmitt et al., 2000; Köhler et al., 2000). *recA* ist ein Induktor von DNA-Reparaturprozessen, der so genannten SOS-Antwort. Bei Induktion von *recA*

erfolgt ebenfalls eine *recA*-dependente Phageninduktion (Fuchs et al., 1999). Köhler et al. (2000) äußerten die Hypothese, dass alle DNA-schädigenden Substanzen über diesen Weg potentiell Phagen-induzierend wirken. Zwei ehemals als leistungssteigernde Zusatzfuttermittel verwendete Antibiotika, Carbadox und Olaquinox, zeigten diese über DNA-Schädigung vermittelte Phageninduktion (Köhler et al., 2000). Diese Wirkung von Mitomycin und der ungiftigeren Variante Carbadox wird in einigen Laborverfahren zum Nachweis von Shiga-Toxinen genutzt.

Auch andere Antibiotika haben in subinhibitorischen Mengen einen Phagen-modifizierenden Effekt für *E. coli* O157:H7. Je nach Wirkstoff traten Toxinmengen oberhalb oder unterhalb des Kontrollansatzes auf (Karch et al., 1985). *Escherichia coli*, die in Anwesenheit von Ciprofloxacin, Lincomycin oder Gentamycin inkubiert wurden, wiesen niedrige Toxinproduktionen auf (Karch et al., 1985). Diese Verminderung der Toxinbildung ist durch eine Blockierung der Proteinbiosynthese durch die oben genannten Antibiotika zu erklären. Im Gegensatz dazu verstärkte das Vorhandensein von Sulfametoxazol, Trimethoprim oder Cotrimoxazol bei der Inkubation die Produktion von Stx. Als verantwortlich für diese Steigerung sahen Karch et al. (1985) jedoch nicht eine Phageninduktion, sondern Veränderungen in der Zusammensetzung der Außenmembran der Bakterienzelle, die in einer erhöhten Zellpermeabilität für Stx und damit einer erhöhten Freisetzung des Toxins resultieren. Ähnliche Mechanismen mit Steigerung der Toxinbildung und -ausschleusung wurden auch für das Antibiotikum Polymyxin B beschrieben: Durch die Abnahme der Toxinmenge in der Bakterienzelle folgt im Anschluss über einen Feed-Back-Kontrollmechanismus eine verstärkte Toxinproduktion (Karmali et al., 1985). In einer anderen Studie wurde gezeigt, dass Cycloheximid die Sensibilität von Vero-Zellen gegen Stx erhöht, wohingegen Puromycin das Gegenteil bewirkt (Petric et al., 1987).

Aufgrund der Shiga-Toxin-Produktion stimulierenden Wirkung von Antibiotika und einer vermuteten Verlängerung der STEC-Ausscheidungsdauer ist die Gabe dieser Medikamente bei Infektionen mit STEC nicht induziert (Robert Koch-Institut, 2008a) und führt einigen Studien zufolge zu einem erhöhten Risiko, ein Hämolytisch-Urämisches Syndrom zu entwickeln (Carter et al., 1987; Pavia et al., 1990; Wong et al., 2000).

Neben Antibiotika und Chemikalien hat auch die Temperatur einen gewissen Einfluss auf die Toxinbildung von Stx₂: Niedrige Temperaturen vermindern die Produktion zu einem geringen Grad (Mühldorfer et al., 1996).

2.5 STEC beim Menschen

Shiga-Toxin bildende *E. coli* gehören zu den human relevanten Erregern von Lebensmittel- bedingten Infektionen. Ihre Bedeutung liegt nicht unbedingt in der großen Anzahl der Erkrankungsfälle. Wie aus **Abbildung 3** ersichtlich, sind STEC mit 835 Erkrankungsfällen im Jahr 2008 und 839 Patienten im Jahr 2007 im Gegensatz zu *Campylobacter spp.* und *Salmonella spp.* relativ seltene Erreger bei Lebensmittel-assozierten Erkrankungen (Robert Koch-Institut, 2009). Ihre Relevanz liegt in der Kombination einer niedrigen Infektionsdosis mit den möglichen schweren Komplikationen der Infektion, vor allem bei Kleinkindern.

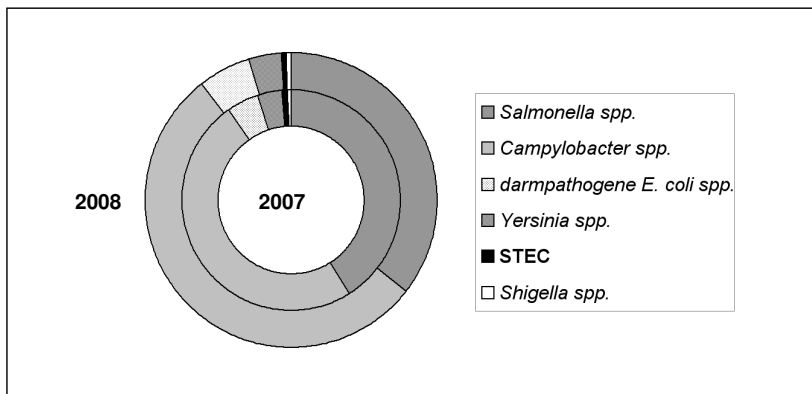


Abbildung 3: Übersicht über die Anteile Lebensmittel-assoziierter Infektionen durch Zoonose-Erreger beim Menschen in den Jahren 2007 und 2008 in Deutschland (nach Angaben des Robert Koch-Institutes (2008b; 2009))

2.5.1 Humane STEC-Infektion

Die erste Beschreibung einer humanen Infektion durch *E. coli* O157:H7 erfolgte 1983 durch Riley et al. (1983). In den USA waren nach dem Verzehr von Hamburgern aus Fast Food-Restaurants insgesamt 47 Personen an hämorrhagischer Colitis erkrankt. Bis zu diesem Zeitpunkt war O157:H7 nur selten als Krankheitserreger in Erscheinung getreten. In einer retrograden Untersuchung fanden die amerikanischen Centers for Disease Control and Prevention (CDC) in insgesamt 3.000 zwischen 1973 und 1983 eingesandten *E. coli*-Isolaten nur einen O157:H7-Stamm (Riley et al., 1983). Auch in Großbritannien konnte aus 15.000 serotypisierten *E. coli*-Isolaten aus den Jahren 1982 bis 1990 nur ein O157:H7 gefunden werden (Griffin und Tauxe, 1991). Dies deutet darauf hin, dass die neu entdeckte, humanpathogene Bedeutung der STEC nicht unterdiagnostiziert wurde, sondern STEC tatsächlich einen neu aufgetretenen Krankheitserreger darstellen. Wie bereits erwähnt, beschrieben Karmali et al. (1983) im gleichen Jahr erstmals die Beteiligung von STEC-Stämmen am Hämolytisch-Urämischen Syndrom.

Das klinische Erscheinungsbild einer jeden Infektionskrankheit ist von der Virulenz des Erregers, der Empfänglichkeit des Patienten und der aufgenommenen bzw. notwendigen Infektionsdosis abhängig (Rolle und Mayr, 2007). Stx_2 ist beispielsweise wesentlich häufiger mit der Entwicklung eines HUS assoziiert als Stx_1 . Intimin hingegen wird regelmäßig von Stämmen isoliert, die für Hämorrhagische Colitis verantwortlich sind (Brooks et al., 2005). Eine besondere Bedeutung wird ebenfalls der Toxinvariante zugeschrieben: stx_2 - und stx_{2c} -positive STEC sind wesentlich häufiger mit HUS assoziiert als die anderen Toxinvarianten (Orth et al., 2007).

Bei adulten Menschen verläuft eine STEC-Infektion häufig als Gastroenteritis, die aufgrund ihres relativ milden Verlaufs oft nicht als STEC-bedingte Enteritis diagnostiziert wird. In dieser Altersgruppe sind auch viele symptomlose Infektionen mit Ausscheidung des Keims beschrieben worden. In einer Untersuchung von Mitarbeitern fleischverarbeitender Betriebe wurden 3,5% als STEC-Ausscheider identifiziert (Stephan et al., 2000). Silvestro et al. (2004) wiesen bei 1,1% der untersuchten landwirtschaftlich tätigen Personen STEC der Serovare O157:H7 nach. Hier liegt die Vermutung nahe, dass diese Personen im jungen Alter durch häufigeren Kontakt zu weniger virulenten Stämmen eine Immunität aufbauen. Zu schwerwiegenderen Krankheitsbildern mit nachfolgenden Komplikationen kommt es vor allem bei Säuglingen, Kleinkindern und älteren, sowie immungeschwächten Menschen (Robert Koch-Institut und Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin, 2001).

STEC-Infektionen führen zunächst zu akuten entzündlichen Vorgängen in der Dickdarmschleimhaut. Eine wässrige Diarrhöe setzt nach einer Inkubationszeit von ein bis drei Tagen, maximal bis zu acht Tagen ein. Begleiterscheinungen sind häufig Übelkeit, Erbrechen und Bauchschmerz, wobei Fieber nur selten ausgeprägt ist

(Nataro und Kaper, 1998). In 10 bis 20% der Fälle entwickelt sich die Gastroenteritis weiter zu einer hämorrhagischen Colitis (HC), die durch blutigen Stuhl und starke Leibschmerzen gekennzeichnet ist (Riley et al., 1983; Robert Koch-Institut, 2008a).

Als schwerwiegende extraintestinale Komplikationen treten bei 5 bis 10% der STEC-Infektionen das hämolytisch-urämische Syndrom (HUS) oder die Thrombotisch-Thrombozytopenische Purpura (TTP) auf (Robert Koch-Institut, 2008a). Das Hämolytisch-Urämische Syndrom wurde 1955 erstmalig von der Schweizer Forschergruppe um Gasser beschrieben (Gasser et al., 1955). Das Hämolytisch-Urämische Syndrom ist gekennzeichnet durch eine Trias von Symptomen: akutes Nierenversagen, Thrombozytopenie und mikroangiopathische hämolytische Anämie. Beim Auftreten von allen drei klinischen Symptomen spricht man von einem „kompletten HUS“. Sind nur ein oder zwei der typischen Krankheitsanzeichen ausgeprägt, handelt es sich um ein „inkomplettes HUS“. Etwa 90% der Fälle sind enteropathischen Ursprungs, das bedeutet, der extraintestinalen Infestation geht eine intestinale Episode mit HC voraus (Gerber et al., 2002). Hauptursache von HUS sind STEC-Infektionen: Bei 68% bis 83% aller Fälle ist eine Assoziation nachweisbar (Banatvala et al., 2001; Gerber et al., 2002; Gianviti et al., 2003). Das Hämolytisch-Urämische Syndrom tritt vor allem bei Kleinkindern bis zu fünf Jahren auf.

Die Ursache für die besondere Sensibilität von Kleinkindern ist bisher nicht hinreichend bekannt. Der Zusammenhang des Vorkommens von Gb₃-Rezeptoren im Gewebe und der Empfänglichkeit von Zellen für Stx ist seit einigen Jahren bekannt (Obrig et al., 1993). Die Vermutung, dass die Nierenzellen von Kleinkindern vermehrt Gb₃-Rezeptoren exprimieren und diese Altersgruppe aus diesem Grund besondere Sensibilität gegenüber Stx aufweist, lag aus diesem Grund nahe. Diese Hypothese konnte jedoch bisher nicht bestätigt werden (Boyd und Lingwood, 1989; Ergonul et al., 2003). Bis heute besteht Unklarheit über die Ursache der vermehrten HUS-Fälle bei Kleinkindern. Weitere diskutierte Hypothesen sind eine selektive glomeruläre Bindung von Stx in Nieren von Kleinkindern: Eine Studie von Lingwood et al. (1994) ergab Hinweise, dass die Expression von Gb₃-Rezeptoren in den Glomeruli der Niere nur bei Kindern vorhanden ist und während des Wachstums verloren geht. Dies wurde jedoch zumindest für Stx₁ widerlegt. Im Rahmen immunologischer Färbungen wurde für das an Gb₃-Rezeptoren gebundene Stx₁ eine homologe Verteilung der Gb₃-Rezeptoren bei juvenilen und adulten Menschen nachgewiesen (Ergonul et al., 2003), so dass alternative Theorien formuliert werden müssen. Arbeitshypothesen sind nun mögliche vorhandene Unterschiede in der Fettsäuren-Zusammensetzung des Gb₃-Rezeptors von Adulten und Juvenilen. Die Bedeutung der Fettsäuren-Zusammensetzung für die Toxinwirkung von Stx wurde bereits nachgewiesen (Lingwood, 1993). Eine weitere Möglichkeit wäre eine altersabhängige Zytotoxizität für Stx₂. Für Stx₁ scheint diese Theorie aufgrund eben genannter Studie unwahrscheinlich. Die im Gegensatz zu Stx₁ deutlich stärkere Zytotoxizität von Stx₂ für humane Nierenzellen wurde bereits in Kapitel 2.4.4.2 erwähnt. In Übereinstimmung mit diesem Sachverhalt wird bei von

HUS-Patienten isolierten *E. coli* O157:H7 überwiegend Stx₂- oder Stx₁- und Stx₂-Produktion nachgewiesen. Eine Infektion mit der STEC-Serovare O118:H2, die nur stx₁-positiv war, führte beispielsweise bei 126 Patienten lediglich zu Durchfallerkrankungen (Ruggenti et al., 2001).

Zusammenfassend ist festzustellen, dass nach heutigem Wissenstand eine altersabhängige Zytotoxizität für Nierenendothelzellen unwahrscheinlich ist und die nachgewiesenen geringen altersdependenten Differenzen in der Expression von Gb₃-Rezeptoren in den tubulären und glomerulären Nierenzellen nicht das Vorherrschen von HUS bei Kleinkindern erklären.

Die klinischen Symptome eines HUS treten in der Regel fünf Tage nach Beginn des Durchfalls auf. Die Toxine gelangen auf lymphogenem und hämatogenem Weg in die Kapillaren von Niere, Pankreas und Gehirn und rufen dort Endothelschäden hervor, die zu Gefäßverschlüssen und Gewebsnekrosen und somit zu lokalen Funktionsverlusten führen (Karmali et al., 1983; Wiss und Klare, 1987). In der Niere rufen diese Schädigungen das akute Nierenversagen hervor, bei dem es bei bis zu 60% der Patienten zu einer zumindest temporären Dialysepflicht kommt (Gerber et al., 2002). Begleitend können Anurie, Hypertonie und neurologische Symptome auftreten. In 5% der Fälle hat die STEC-Infektion einen letalen Ausgang (Banatvala et al., 2001; Gerber et al., 2002).

Die Thrombotisch-Thrombozytopenische Purpura tritt hauptsächlich bei Patienten auf, die älter als 30 Jahre sind. Dieses Krankheitsbild wurde bereits 1924 erstmalig beschrieben (Moschcowitz, 2003) und gehört ähnlich wie HUS zu den thrombotischen Mikroangiopathien, unterscheidet sich aber vom HUS durch zusätzliche Symptome und ein regelmäßiges Fehlen von prodromalen intestinalen Episoden (Banatvala et al., 2001). Das TTP ist durch eine Pentade von Symptomen charakterisiert: Es treten Fieber, thrombozytopenische Purpura, mikroangiopathische hämolytische Anämie, neurologische Symptome und Nierenversagen auf (Amorosi und Ullmann, 1966).

2.5.2 Vorkommen und Epidemiologie von humanen STEC-Infektionen

Bei dem ersten dokumentierten Ausbruch einer STEC-Infektion wurde der Verzehr unzureichend erhitzter Hamburger aus einem Fast-Food-Restaurant als ursächlich ermittelt (Riley et al., 1983). In einer weiteren Studie wurden auch die Serovare O26, O113 und O111 von verschiedenen Patienten, die an STEC-bedingter Diarrhöe, HC, HUS oder TTP litten, isoliert (Karmali et al., 1985). Dieser Nachweis ließ den Schluss zu, dass auch andere STEC neben O157:H7 die typischen Erkrankungen auslösen können. In den USA werden weiterhin, besonders bei Gruppenerkrankungen, vor allem *E. coli* O157:H7 nachgewiesen. Andere Serovare sind dort eher für sporadische Erkrankungsfälle verantwortlich (**Tabelle 5**). Bei einer Analyse der von 1983 bis 2002 in den USA vorkommenden STEC-Infektionen, die durch Non-O157:H7-Serovare hervorgerufen wurden, wurden vor allem die O-Serogruppe O26 (22% der Isolate), aber auch O111 (12%), O121 (8%) und O45 (5%) nachgewiesen (Brooks et al., 2005).

Auffällig war bei diesen Isolaten die Ausstattung mit Virulenzfaktoren: 61% der Isolate besaßen lediglich Stx₁ und nur 22% bzw. 17% wiesen Stx₂ bzw. Stx₁ und Stx₂ auf. Intimin und Hämolyisin_{EHEC} waren in 84% bzw. 86% der Isolate vorhanden (Brooks et al., 2005).

Die Bedeutung von unzureichend erhitztem bzw. rohem Fleisch als Vektor für STEC wird noch deutlicher, wenn die hohe Inzidenz von STEC-bedingten Erkrankungen in Anbetracht der kulturell unterschiedlichen Verzehrsgewohnheiten in Argentinien betrachtet wird. Im Vergleich zur Inzidenz in Deutschland (0,2-1,9/100 000 bei Kindern von 0 bis 15 Jahren) ist die Inzidenz in Argentinien mit 22/100 000 bei Kindern jünger als fünf Jahre wesentlich erhöht (Lopez et al., 1998). Zusätzlich sind 30 bis 38% der blutigen Durchfälle dort mit STEC-Infektionen in Zusammenhang zu bringen (Lopez et al., 1998). Interessant wird dieser Sachverhalt, wenn er vor den Hintergrund eines beginnenden Fleischverzehr im Alter von etwa drei Monaten gestellt wird. Bei etwa 20% der gesunden Kinder in Argentinien konnten Antikörper gegen Stx nachgewiesen werden, was auf zurückliegende Infektionen hindeutet. Die Serovare O157:H7 spielt in Südamerika eine eher unbedeutende Rolle. Dort werden vornehmlich andere, meist ausschließlich stx₁-positive Serovare isoliert (Lopez et al., 1998).

In Australien wurde von einem Ausbruch berichtet, bei dem 1995 über 100 Menschen nach dem Verzehr einer Mettwurst an einer STEC-Infektion erkrankten (Paton et al., 1996). Bei dem überwiegenden Teil der Patienten und aus den untersuchten Mettwürsten wurde die Serovare O111:H- isoliert. Zusätzlich wurden andere Serovare, unter anderem auch O157:H-, in den gewonnenen Proben nachgewiesen (Paton et al., 1996). Eine niedrige Dosis von einer *E. coli*-Zelle auf 10g Mettwurst war ausreichend um eine Infektion hervorzurufen (Paton et al., 1996). Die Bedeutung dieser geringen Infektionsdosis wird deutlich, wenn die Übertragung des Keimes von Mensch zu Mensch betrachtet wird (Reida et al., 1994; Spika et al., 1986). Die minimale infektiöse Dosis liegt bei etwa 10 bis 100 Keimen (Bockemühl und Karch, 1996). In einer amerikanischen Studie wurden minimale Infektionsdosen von weniger als 50 Keimen nachgewiesen (Tilden et al., 1996).

Bemerkenswert sind die Infektionsquellen vieler STEC-Erkrankungsfälle in Japan. Zwischen 1990 und 1996 wurden dort regelmäßig Sprossen und andere pflanzliche Lebensmittel als Träger von STEC identifiziert (World Health Organisation, 1996). Beschrieben ist beispielsweise ein Ausbruch mit 42 STEC-Infektionen in einem Kindergarten: 14 der Kinder erkrankten am Hämolytisch-Urämischen Syndrom. Ursache war die Aufnahme von mit dem Serovare O157:H7 verunreinigtem Wasser aus einem Brunnen (Akashi et al., 1994).

Tabelle 5: Infektionen des Menschen durch Shiga-Toxin bildende *Escherichia coli*, chronologisch sortiert

Land	Jahr	D/H/C	HUS/TTP	Serovare	Vektor	Referenz
USA	1982	25	0	O157:H7	Hamburger	Riley et al., 1983
Canada	1986	73	12	O157:H7	Sandwich, Person-zu-Person	Carter et al., 1987
USA	1988	63	0	O157:H7	Hackfleisch ^v , Person-zu-Person	Pavia et al., 1990
USA	1988	63	0	O157:H7	blutiges Roastbeef, Salat	Rodrigue et al., 1995
Deutschland	1988	322	0	O101:NT	Mayonnaise	Bülte, 1997
USA	1989	243	2	O157:H7	Trinkwasser ^v	Swerdlow et al., 1992
USA	1990	4	1	O111:H-	Person-zu-Person	Banatvala et al., 1996
Japan	1990	21	14	O157:H7	Brunnenwasser	Akashi et al., 1994
Deutschland	1990	2	1	O22:H8	unpasteurisierte Milch	Bockemühl et al., 1990
Deutschland	1992	50	3	O157:H7	Person-zu-Person, sekundär kontaminierte Lebensmittel	Reida et al., 1994
GB	1993	7	1	O157:H7	Beef-Burger	Willshaw et al., 1994
GB	1993	.	.	O157:H7	Hunde, Rinder	Syngé et al., 1993
GB	1994	.	10	O157:H7	pasteurisierte Milch	Upton und Coia, 1994
Australien	1995	> 100	26	O111:H8	Mettwurst	Centers for Disease Control and Prevention, 1999; Paton et al., 1996

Tabelle 5 (Fortsetzung): Infektionen des Menschen durch Shiga-Toxin bildende *Escherichia coli*, chronologisch sortiert

Land	Jahr	D/HC	HUS/TTP	Serovare	Vektor	Referenz
Deutschland	1995/1996	.	45	O157:H-	Teewurst, Mortadella^v	Robert Koch-Institut, 1996b
Japan	1995/1996	>9000	101	O157:H7 O157:H-	Daikon-Kresse	World Health Organisation, 1996
USA	1996	14	4	O157:H7	Apfel-Cidre	Hilborn et al., 2000
USA	1996	45	12	O157:H7	unpasteurisierter Apfelsaft	Alpers et al., 1996
Deutschland	1996	1	1	O157:H?	Kontakt mit Rindern, Person-zu-Person	Gallien et al., 1997
GB	1997	1	0	O157:H7	Pferd mit Diarrhöe	Chalmers et al., 1997
Deutschland	1997	1	1	O157:H7	Vorzugsmilch^v	Robert Koch-Institut, 1997a
Deutschland	1997	83	46	O157:H-	?	Robert Koch-Institut, 1997b
GB	1999	29	1	O157:H-	Rohmilchkäse aus Ziegenmilch	N.N., 1999
USA	1999	55	2	O111:H8	Salat, Person-zu-Person	Brooks et al., 2004
Deutschland	2001	15	0	O26:H?	Fertiggericht aus Rindfleisch	Robert Koch-Institut, 2001
USA	2002	9	3	O157:H7	Hackfleisch	Vogt und Dippold, 2005
Deutschland	2002	3	7	O157:H-	?	Robert Koch-Institut, 2002a
Deutschland	2003	.	22	O157:H-	unpasteurisierter Apfelsaft	Robert Koch-Institut, 2003a

Tabelle 5 (Fortsetzung 2): Infektionen des Menschen durch Shiga-Toxin bildende *Escherichia coli*, chronologisch sortiert

Land	Jahr	D/HC	HUS/TTP	Serovare	Vektor	Referenz
Slowakei	2004	2	3	O157:H?	unpasteurisierte Milch	Liptakova et al., 2004
Frankreich	2005	13	13	O157:H7	tiefgefrorene Hamburger Pattis	French multi-agency outbreak investigation team, 2005
USA	2006	199	31	O157:H7	Spinat	Centers for Disease Control and Prevention, 2006
Norwegen	2006	7	10	O103:H25	fermentierte Rohwurst aus Schafffleisch	Schimmer et al., 2008
Deutschland	2006	.	12	O157:H-	?	Robert Koch-Institut, 2006b
Belgien	2007	7	5	O145/O26	Eiscreme (pasteurisierte Milch)	De Schrijver et al., 2008
Dänemark	2007	20	.	O26:H11	Rinderwurst	Eitelberg et al., 2007
USA	2007	71	8	O157:H7	Tiefkühlpizza	Centers for Disease Control and Prevention, 2007c
USA	2008	45	2	O157:H7	Hackfleisch	Centers for Disease Control and Prevention, 2008
Deutschland	2008	21	2	?	unpasteurisierte Milch	Robert Koch-Institut, 2009

fett hervorgehoben: Fälle in Deutschland ^y: vermullter Vektor : keine Angaben ? : unbekannt D: Diarrhöe HC: Hämorrhagische Colitis/HUS:
Hämolytisch-urämisches Syndrom TTP: Thrombotisch-Thrombozytopenische Purpura GB: Großbritannien USA: Vereinigte Staaten von Amerika

In Deutschland liegen die bundesweiten Inzidenzraten von STEC-bedingten Enteritiden seit mehreren Jahren konstant bei Werten um 1,4 /100.000 Einwohner (Robert Koch-Institut, 2004a; 2005a; 2006c; 2007). In den Jahren 2007 und 2008 erkrankten sogar nur 1,0 /100.000 Einwohner an STEC bedingten Enteritiden, während die Inzidenzraten von HUS seit vielen Jahren unter 0,1 /100.000 Einwohner betragen (Robert Koch-Institut, 2004a; 2005a; 2006c; 2007; 2008b; 2009)

Sowohl beim Vorkommen von STEC-Infektionen als auch bei den HUS-Fällen sind seit mehreren Jahren deutliche regionale Unterschiede zu verzeichnen. Höhere Inzidenzraten werden regelmäßig aus Bayern, Niedersachsen und Nordrhein-Westfalen gemeldet: Vor allem im Allgäu, Weser-Ems-Gebiet und im Bezirk Arnberg in Nordrhein-Westfalen traten Inzidenzen von über 1,8 Erkrankungen /100.000 Einwohner auf (Robert Koch-Institut, 2009). Bei einer durchschnittlichen Inzidenz von 1,0 im Jahre 2008 erkrankten in Sachsen 2,6 /100.000 Einwohner, in Berlin 1,7 /100.000 Einwohner, in Niedersachsen 1,6 /100.000 Einwohner und Schleswig-Holstein 1,4 /100.000 Einwohner (Robert Koch-Institut, 2009). Die relativ niedrigen Inzidenzen im Bundesdurchschnitt sind auf die mit weniger als 0,5 /100.000 Einwohner sehr niedrigen Erkrankungsraten in Thüringen, Hessen und Bremen zurückzuführen (Robert Koch-Institut, 2009).

Im Jahr 2002 wurde von mehreren Gruppenerkrankungen mit dem Sorbitol-fermentierenden (SF) O157:H- berichtet (Robert Koch-Institut, 2003b). Schwerpunkte dieser Häufungen waren Norddeutschland und Bayern, so dass es zu Inzidenzraten von 2,4 (Bremen), 2,3 (Niedersachsen) und 2,1 (Bayern) kam (Robert Koch-Institut, 2003b). Der Bundesdurchschnitt lag in diesem Jahr bei 1,5 Fällen / 100.000 Einwohner (Robert Koch-Institut, 2003b).

Eine höhere Spezifität des Meldesystems resultiert meist in wesentlich höheren Inzidenzen. So wurde das Vorkommen von STEC-Infektionen in einer Labor-Sentinel-Studie auf 13 Fälle /100.000 Einwohner geschätzt (Prager et al., 1998). Diese Zahlen beinhalten neben den eigentlichen Erkrankungsfällen auch symptomlose Ausscheider, die häufiger im Rahmen kleiner, familiärer Ausbrüche ermittelt werden. Innerhalb dieser Studie wurde bestimmt, dass ein durchschnittlicher Anteil von 3,2% der sporadischen Durchfallerkrankungen von STEC verursacht wird (Prager et al., 1998). Im Jahre 1998 wurden jedoch nur 644 Fälle von STEC-Erkrankungen freiwillig gemeldet, was lediglich einem Anteil von einem Prozent an den Fällen der „Enteritis infectiosa“ in diesem Jahr entspricht (Robert Koch-Institut, 1999c). Die Meldepflicht für STEC-assoziierte Erkrankungen als solche wurde erst ab 1998 in das Bundes-Seuchengesetz integriert (Anonymus, 1998). Das Robert Koch-Institut vermutet generell auf jeden gemeldeten Fall noch einmal doppelt so viele nicht gemeldete oder nicht diagnostizierte Fälle, so dass entsprechend des geschätzten 3%igen Anteils von STEC an der „Enteritis infectiosa“ im Jahre 1998 mit Fallzahlen in der Größenordnung von etwa 2000 Patienten zu rechnen wäre (Robert Koch-Institut, 1999c).

In den letzten Jahren gemeldete Erkrankungsraten liegen jedoch, wie aus **Abbildung 4** ersichtlich, bei 800-1.200 Fällen/Jahr in Deutschland. Diese bis heute andauernde Unterschätzung liegt nach Aussage des Robert Koch-Institutes an der Komplexität der Diagnostik und der durchschnittlichen Ausstattung der Labore, die es nicht ermöglicht, die Diagnostik bei Verdacht auf STEC-Infektion bis hin zur Isolierung und Serotypisierung des STEC zu verfolgen. Einer der Gründe, aus denen es bis heute nicht möglich ist, präzise zutreffende Aussagen über die Serovarenverteilung in Deutschland zu treffen, ist der seit 2002 unter 50%-liegende Anteil der übermittelten Serovaren von identifizierten Krankheitsfällen (Robert Koch-Institut, 2003b; 2004a; 2005a; 2006c; 2007; 2008b; 2009). Als Hilfestellung für Humanmediziner verfasste das Robert Koch-Institut 1998 eine Indikationsliste für die Untersuchung auf STEC-bedingte Gastroenteritiden und schlug weiterhin labordiagnostische Verfahren vor (Robert Koch-Institut, 1999c).

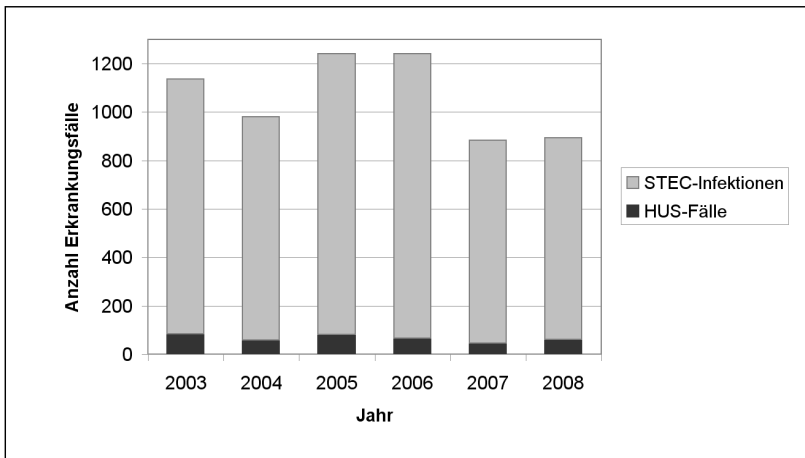


Abbildung 4: Entwicklung der Anzahl der STEC-Enteritis- und HUS-Fälle des Menschen von 2003 bis 2008 in Deutschland, nach Angaben des Robert Koch-Institutes (2003b; 2004a; 2005a; 2006c; 2007; 2008b; 2009)

Kleinkinder unter fünf Jahren stellen mit über 50% der STEC-Infektionen seit Jahren die am meisten betroffene Altersgruppe dar; bei schwereren Krankheitsverläufen ist diese Gruppe mit Anteilen von 61-75% noch stärker vertreten (Robert Koch-Institut, 2006a; 2007; 2008b).

Auch wenn *E. coli* O157:H7 seit längerer Zeit auch in Deutschland das bedeutendste Serovar bei HUS darstellt, werden bei HUS-Patienten regelmäßig Non-O157:H7-STECSerovaren ermittelt. In einer Analyse von Non-O157:H7-STECSerovaren aus

HUS-Patienten in Italien und Deutschland wurden die Serovare O22:H8, O26:H-, O91:H-, O128:H- und ein nicht typisierbarer *E. coli* nachgewiesen (Russmann et al., 1995). Diese Serovaren besaßen trotz der sich verkomplizierenden Erkrankung in der Regel nur Stx₁ (Russmann et al., 1995). Ähnliches gilt auch für Enteritis-assoziierte STEC-Serovare: Auch hier werden neben den früher als „klassisch“ bezeichneten Non-O157-O-Serogruppen O16 und O111 immer wieder neue Serovare isoliert, die zum Teil Serogruppen mit bisher noch unbekanntem humanpathogenen Potential angehören (Bockemühl et al., 1998). In den letzten Jahren von zunehmender Relevanz als Erreger von humanen, STEC-bedingten Erkrankungen waren jedoch die O-Serogruppen O26, O103, O145, O111 und O91 (Bielaszewska, 2009).

Diese ständige Ausweitung der Serovaren-Typen geht mit einer zunehmenden Gefährdung des Verbrauchers einher. Aufgrund der mit der Vielfalt der Serovare steigenden Komplexität der labordiagnostischen Nachweisverfahren stellt der optimale Nachweis aller Erreger besondere Anforderungen an die Labore.

Seit mehreren Jahren tritt ein Großteil der Erkrankungen (2006: 91%, 2007: 93%) in Form von Einzelfällen auf, während von Gruppenerkrankungen nur in 55 Fällen von STEC-Infektionen im Jahre 2007 berichtet wird. Hierbei handelt es sich jedoch meist um kleinere familiäre Häufungen, im Median waren zwei, maximal sechs Erkrankte beteiligt (Robert Koch-Institut, 2008b).

In Deutschland verursacht das Sorbitol-fermentierende STEC-Serovare O157:H- (SF O157:H-) seit einigen Jahren mehrfach große Ausbrüche. Die Diagnostik, die im Regelfall auf einer Detektion des Serovares O157:H7 aufgrund seiner Unfähigkeit Sorbitol zu fermentieren beruht, stößt hier an ihre Grenzen. *Escherichia coli* O157:H- sind in den meisten Fällen stx₂-positiv, nicht beweglich (H-) und fermentieren Sorbitol innerhalb von 24 Stunden Inkubationszeit. Von aus HUS Patienten isolierten STEC O157 bilden SF O157:H- einen Anteil von 13,3 bis 40,5%, bei Durchfall-Patienten liegt ihr Anteil bei 7,4 bis 25% (Karch und Bielaszewska, 2001). Sie besitzen ein mehrfach mutiertes, nicht mehr funktionelles H7-Antigen, ein funktionelles Intimin γ , sowie ein großes 90kb Plasmid, welches das *EHEC-hlyA* trägt, das aber nicht exprimiert wird. Die weiteren üblicherweise auf diesem pO157-Plasmid enthaltenen putativen Virulenzfaktoren *espP* und *katP* sind nicht vorhanden. Stattdessen besitzen SF O157:H- eine spezifische, plasmidkodierte Fimbriae *sfp* (sorbitol-fermenting EHEC O157 fimbriae, plasmid-encoded), die vermutlich mit Wirtszellrezeptoren interagiert (Brunner et al., 2001). Die meisten in Deutschland und Europa vorkommenden SF O157:H- weisen ein übereinstimmendes Muster in der Pulsfeldgelelektrophorese aus, was für eine enge klonale Verwandtschaft spricht.

Dieses Sorbitol-fermentierende Serovare wurde im Jahre 1988 bei einem Ausbruch von HUS in Bayern zum ersten Mal isoliert (Robert Koch-Institut, 1996b). In den Jahren 1995 bis 1996 trat ein zweiter Ausbruch mit SF O157:H- auf, wiederum in Süddeutschland (Ammon et al., 1999; Robert Koch-Institut, 1996b). Es erkrankten 28 Kinder an HUS, die Gesamtzahl der Infizierten konnte nur geschätzt werden

(Robert Koch-Institut, 2003a). Wenn jedoch von einem Anteil von 5 bis 10% der Erkrankten ausgegangen wird, die ein HUS entwickeln (Robert Koch-Institut, 2008a), so beträgt die Dunkelziffer etwa 300 bis 600 nicht erkannte STEC-Infektionen (Ammon et al., 1999). Ausbrüche in ähnlicher Größenordnung wie 1995/1996 wurden auch im Herbst 2002 und 2003 in Bayern gemeldet (Robert Koch-Institut, 2003a; 2003b). Im Jahre 2002 wurde vom ersten Ausbruch mit SF O157:H- außerhalb Bayerns berichtet: Im Frühjahr 2002 wurde der Erreger bei zehn erkrankten Kinder in Niedersachsen isoliert, wobei sechs Kinder am HUS und eines an TTP erkrankten (Robert Koch-Institut, 2003a) Die Serovare SF O157:H- scheint vor allem in Deutschland vertreten zu sein. Es wurden nur einige Funde im europäischen Ausland gemeldet, diese Serovare hat sich jedoch bisher noch nicht weltweit verbreitet (Karch und Bielaszewska, 2001). Dass SF O157:H- ein immer noch aktuelles Problem darstellen, beweist eine erneute Häufung von Erkrankungen im Frühjahr 2006 in Niedersachsen, Hamburg und Schleswig-Holstein (Robert Koch-Institut, 2006b).

In verschiedenen Studien wurde ein Nachweis von SF O157:H- bei den üblicherweise als Reservoir fungierenden Wiederkäuern versucht (Bielaszewska et al., 2000; Karch und Bielaszewska, 2001): Es wurde jedoch nur ein Isolat aus 1.300 Rinderkotproben gewonnen (Bielaszewska et al., 2000): Bei anderen Nutz- und Wildwiederkäuern wurde der Erreger nicht isoliert (Bielaszewska et al., 2000; Karch und Bielaszewska, 2001). Deshalb ist bisher noch unklar, ob die bisher bekannten STEC-Übertragungswege ebenfalls auf die Serovare O157:H- zutreffen. Bei den aufgetretenen Ausbrüchen wurden die Vektoren nicht vollständig aufgeklärt. Beim Ausbruch 1995/96 wurden Mortadella und Teewurst, welche rohes Rindfleisch enthielt, als Erregerquelle vermutet (Robert Koch-Institut, 1996b). Andere Erkrankungen mit diesem Serovare wurden jedoch durch direkten Tierkontakt verursacht (Bielaszewska et al., 2000; Orth et al., 2006; Robert Koch-Institut, 1999b). Aufgrund der geringen Nachweisrate in Lebensmittel und Tieren wird jedoch auch vermutet, dass die SF STEC-O157:H- an den menschlichen Darm adaptiert sind und der Mensch selbst als Reservoir dieser Erreger dient (Karch und Köhler, 1999). Zur Bestätigung dieser oder anderer Hypothesen sind unbedingt weitere Studien erforderlich, da das Datenmaterial bisher keine eindeutigen Schlüsse zulässt.

2.6 STEC beim Rind

Obwohl viele *E. coli*-Infektionen mit Durchfall bei Rindern assoziiert sind, ist die Bedeutung vom Pathovar STEC als Krankheitserreger bei Wiederkäuern noch unklar. Bisher wird das Krankheitspotential aller Serovare von STEC bei Tieren als wenig bedeutend eingestuft (Naylor et al., 2005a).

Die Besiedelung des Rinderdarmes mit STEC und das symptomlose Trägertum dieser Tiere spielt jedoch für die Aufrechterhaltung des Infektionszyklus eine immense Rolle.

2.6.1 Bovine STEC-Infektion

Bei dem Versuch einer epidemiologischen Einordnung des Gefahrenpotentials von STEC für Rinder wurden mehrfach Studien mit dem Ziel durchgeführt, Unterschiede in der Prävalenz durchfallkranker und gesunder Rinder aufzuzeigen. Ein Teil dieser Studien wies STEC bei erkrankten Kälbern häufiger nach (Burnens et al., 1995; Kang et al., 2004; Leomil et al., 2003; Wieler et al., 1992), andere Studien bestätigten dies nicht (Orden et al., 2003; Sanz et al., 1998). Infektionen mit STEC O157:H7 bei Kälbern verlaufen in vielen Fällen asymptomatisch (Brown et al., 1997; Sanderson et al., 1999; Woodward et al., 1999; Wray et al., 2000). Trotz dieser Differenzen steht jedoch fest, dass die Virulenzmerkmale der Isolate kranker Kälber sich von denen gesunder Tiere unterscheiden. STEC kranker Tiere waren zum Großteil *stx*₁- und *eae*-positiv, gehörten meist den O-Serogruppen O26, O111, O118 und Orah an und besaßen die Geißelantigene H11 oder H16, während die Isolate gesunder Kälber *stx*₂-positiv und *eae*-negativ waren und vielen verschiedenen Serovaren angehörten (Orden et al., 1998; Pohl et al., 1997; 1991). Es wurde weiterhin gezeigt, dass das Virulenzmuster von Isolaten kranker Kälber trotzdem bei gesunden Kälbern häufiger vorkommt als bei adulten Rindern (Sanz et al., 1998). Dies lässt vermuten, dass diese Virulenzfaktoren bei der Besiedelung des Darmes, auch ohne Auftreten einer Erkrankung, relevant sind (Sanz et al., 1998). Wieler et al. (2007) wiesen für unterschiedliche Altersabschnitte der Kälber Assoziationen von Virulenzfaktoren und Durchfällen nach:

Durchfallerkrankte Kälber schieden in ihrer ersten Lebenswoche signifikant häufiger *EHEC*_{HlyA}-positive STEC aus; ähnliches gilt bei der ersten und zehnten Lebenswoche für Intimin und in der vierten Lebenswoche für Shiga-Toxin.

Unabhängig von der unzureichenden Studienlage für STEC-bedingte Erkrankungen im Allgemeinen sind für *eae*-positive STEC viele Fälle von natürlichen und experimentellen Infektionen beschrieben, die bei Kälbern bis zu fünf Lebenswochen unter Auslösung der A/E-Läsionen blutig-schleimige Durchfälle verursachten (**Tabelle 6**). Dagegen existieren nur wenige Berichte von Durchfallerkrankungen bei Jungrindern (Pearson et al., 1999; Wada et al., 1994). Beachtenswert ist, dass in einigen Fällen dieser Durchfallerkrankungen kein Shiga-Toxin nachgewiesen wurde (Pearson et al., 1989), so dass die Rolle dieses Virulenzfaktors in der Pathogenese der Erkrankungen fraglich ist.

Tabelle 6: Beispiele von STEC-Infektionen bei Kälbern, verursacht durch Intimin-positive Isolate, chronologisch geordnet (nach Naylor et al. (2005a), modifiziert)

Serovare	Erwerb der Infektion		Alter des Wirtes	Durchfall	Stx-Typ	Referenz
	nat.	exp.				
O5:H-	X	X	18-21 Tage	blutig-schleimig	Stx+	Hall et al., 1985
O111:H-	X	X	5 Wochen	blutig-schleimig	Stx+	Schoonderwoerd et al., 1988
O26:H11		X	1-17 Tage	blutig-schleimig	Stx ₁	Wray et al., 1989
O80:H-	X		3 Wochen	gelblich-wässrig	Stx-	Pearson et al., 1989
O15	X		19 Monate	blutig-schleimig	.	Wada et al., 1994
O157:H7		X	Neugeborene	blutig-schleimig	Stx ₁ , Stx ₂	Dean-Nystrom et al., 1997
O26	X		8-12 Monate	blutig	Stx ₁ , Stx ₂	Pearson et al., 1999
O118:H16	X	X	2 Wochen	schleimig	Stx ₁	Stordeur et al., 2000
O26:H11	X		2 Wochen	blutig	Stx ₁	Gunning et al., 2001
O111:H-		X	4 und 11 Tage	tw. blutig	Stx ₁	Stevens et al., 2002
O16:H-		X	4 Tage	schleimig	Stx ₁	van Diemen et al., 2005

nat.: natürliche Infektion exp.: experimentelle Infektion Stx: Shiga-Toxin .: unbekannt

Einige O-Serogruppen, wie beispielsweise O26, O111 und O118, scheinen eine größere Virulenz für Rinder, vor allem für Kälber, aufzuweisen als anderen O-Serogruppen. Die O-Serogruppe O26 wurde beispielsweise mehrfach von erkrankten Rindern isoliert, etwa von einem 8-monatigen Jungrind mit blutigem Durchfall, aber auch von ähnlich erkrankten Kälbern (Gunning et al., 2001; Pearson et al., 1999). Andererseits ergab ein Infektionsversuch mit einem ehemals von Durchfall-erkrankten Kälbern isolierten O26:H- -Stamm keine bzw. lediglich eine leichte transiente Enteritis bei infizierten Kälbern (Dziva et al., 2004; Mainil et al., 1987). Die zumindest in Deutschland bei Kälbern am häufigsten ermittelte O-Serogruppe ist O118 (Wieler et al., 1996). Bei STEC-Infektionen von Kälbern zeigt sich vielfach eine Assoziation mit Durchfallerkrankungen; die Virulenz wurde in Infektionsversuchen (Stordeur et al., 2000) und durch Nachweis der Virulenzmuster bestätigt (Wieler et al., 1998). Bei einer Untersuchung von 42 O118-Isolaten trugen 97,6% der *E. coli* die genetische Information für *eae*, *hlyA-Ehec* und mindestens eine *stx*-Variante und somit ein Virulenzmuster, welches bei HUS-verursachenden STEC in 94% der Erkrankungsfälle nachzuweisen ist (Bockemühl und Karch, 1996). Eine Übertragung dieses humanpathogenen Serovares vom Rind auf den Menschen wurde bereits in einigen Fällen als Infektionsweg bei humanen Erkrankungen ermittelt (Beutin et al., 2000; Weber et al., 1997; Wieler et al., 2000).

Zusammenfassend ist das Potential von Non-O157:H7- und O157:H7-STECS als Krankheitserreger bei Kälbern aufgrund des epidemiologischen Datenmaterials wahrscheinlich. Präzisere Charakterisierungen des Ausmaßes der Gefahr, wie auch die Erklärung der Pathogenese, sind jedoch noch vorzunehmen.

STECS können bei adulten Rindern in einem geringen Anteil (2,8 bis 4,2%) von durch *E. coli*-hervorgerufenen Mastitiden bei Kühen isoliert werden (Ribeiro et al., 2006; Stephan und Kuhn, 1999). Ihre Ausstattung mit Virulenzmerkmalen entspricht jedoch nicht denen eines humanpathogenen STECS, so dass hier von keinem Gefährdungspotential für den Menschen auszugehen ist (Ribeiro et al., 2006; Stephan und Kuhn, 1999). Zusätzlich ist unklar, ob der Nachweis der STECS in der Milchprobe ein Zufallsbefund ist, aufgrund einer fäkalen Kontamination der Milchprobe erfolgte oder in Assoziation mit der Mastitis steht. Zwar konnten Zschöck et al. (1998) bei Ziegen eine sekretorische Kontamination der Milch nachweisen, der sekundären fäkalen Kontamination ist jedoch eine wesentlich größere Bedeutung beizumessen.

Für adulte Rinder gelten O157:H7-Serovare als apathogen, auch Non-O157:H7-Serovare scheinen keine bovinen Erkrankungen hervorzurufen (Pearson et al., 1999; Wada et al., 1994). Daher ist davon auszugehen, dass STEC für diese Tiere wenig Virulenz aufweisen. Extraintestinale Komplikationen, wie sie beim Menschen auftreten, sind bei Wiederkäuern nicht bekannt. Ein Mechanismus für die phänotypische Symptomlosigkeit von Rindern ist die Wirkung von Stx auf Immunzellen: Menge et al. (2003) beschrieben für Stx₁ modulierende Effekte auf bovine Lymphozyten, eine resultierende verminderte Immunantwort kann persistierende STEC-Infektionen bei Rindern verursachen. Im histologischen Bild ist jedoch sichtbar, dass auch Rinder auf eae-positive O157:H7-STECS mit Veränderungen der Darmschleimhaut in Form von A/E-Läsionen und einer verstärkten Immunabwehr durch neutrophile Granulozyten reagieren (Nart et al., 2008; Naylor et al., 2005b).

2.6.2 Vorkommen und Epidemiologie von bovinen STEC-Infektionen

Als Erregerreservoir der STEC gelten in erster Linie Nutz- und Wildwiederkäuer, die die STEC in der Regel symptomlos im hinteren Magen-Darm-Trakt tragen (Karmali, 1989; Robert Koch-Institut, 1999c; Wells et al., 1991). Nachweise von *E. coli* O157:H7 auf der Haut und der Maulhöhle sind vermutlich auf Kontamination mit Fäzes oder durch den Wiederkäu-Vorgang bedingt (Keen und Elder, 2002). Auffällig ist dabei jedoch der Sachverhalt, dass *E. coli* O157:H7 vor allem an den weniger mit Fäzes verschmutzten Körperteilen, wie Rücken und Nacken nachzuweisen war (Keen und Elder, 2002).

In Deutschland wurden in den Fäzes adulter Rindern differierende STEC-Prävalenzen von 9,4 bis zu 47,6% berichtet (Gallien, 1994; Richter et al., 1997) (**Tabelle 7**). In einzelnen Herden wurden sogar bis zu 81,5% der Rinder als stx-positiv ermittelt (Geue et al., 2002). Bis zu 70% dieser von Rindern isolierten STEC weisen die Virulenzmerkmale für humanpathogene STEC auf (Richter et al., 1997; Wieler et al., 1996). Die Serovare O157:H7 wurde in Deutschland hingegen weniger häufig untersucht, die Prävalenzen sind zudem mit Werten zwischen 0 und 2,8% wesentlich geringer (Bülte et al., 2002; Geue et al., 2002; Richter et al., 1997; Zschöck et al., 2000).

Tabelle 7: Übersicht über nachgewiesene STEC-Prävalenzen bei Rindern in Deutschland, chronologisch sortiert

Tiere	Anzahl Proben	Gesamtzahl pos. Proben (%)		Referenz
		O157: H7	Non-O157	
Milchkühe	82	.	10 (12,2)	Bülte et al., 1990
Mastrinder	212	.	20 (9,4)	"
Rinder	142	0	30 (21,1)	Beutin et al., 1993
kranke Kälber	119	.	7 (5,9)	Gallien, 1994
Schlachtrinder	204	0	97 (47,6)	Richter et al., 1997
Milchkühe	726	0	131 (18,0)	Zschöck et al., 2000
Rinder	533	15 (2,8)	82 (15,4)	Bülte et al., 2002
Mastrinder und Milchkühe	2.163	6 (0,3)	810 (37,4)	Geue et al., 2002
Milchkühe	147	.	50 (34,0)	Messelhäußer, 2005

.: nicht untersucht

(): prozentualer Anteil (%)

O157: H7: Serovare O157: H7

Non-O157: andere O-Serogruppen als O157

Im europäischen Ausland liegen die Prävalenzen von Non-O157:H7-STECS mit 2,5% bis 61,1% in ähnlichen Bereichen wie in Deutschland (Fremaux et al., 2006; Kuhnert et al., 2005; LeJeune et al., 2006; Orden et al., 2002; Pradel et al., 2000). Die Serovare O157:H7 scheint dort hingegen häufiger bei Rindern aufzutreten: Es wird von Prävalenzen von bis zu 17,0% berichtet (Bonardi et al., 2001; Chapman et al., 1997; Orden et al., 2002; Pradel et al., 2000). Eine detailliertere Auflistung der vorhandenen Studien zeigt **Tabelle 8**.

Tabelle 8: Übersicht über nachgewiesene STEC-Prävalenzen bei Rindern in Europa, nach Ländern alphabetisch sortiert

Land	Tiere	Anzahl Proben	Gesamtzahl pos. Proben (%)		Referenz
			O157: H7	Non-O157	
B ¹	adulte Rinder	1281	55 (4,3)	.	Tutenel et al., 2002
CH ²	Milchkühe	966	41 (4,6)	514 (57,6)	Kuhnert et al., 2005
DK ³	Kälber (2-6 Monate)	443	38 (8,6)	.	Moller-Nielsen et al., 2002
	Milchkühe	975	23 (2,4)	.	"
E ⁴	Kälber	142	0	8 (7,9)	Orden et al., 2002
	Färsen	120	0	23 (20,2)	"
	adulte Rinder	66	0	5 (2,5)	"
F ⁵	Schlachtrinder	471	1 (0,2)	162 (34,4)	Pradel et al., 2000
	Milchkühe	415	3 (2,0)	142 (35,0)	Fremaux et al., 2006
FIN ⁶	Mastbullen	688	110 (16,0)	.	Lahti et al., 2003
GB ⁷	Mastrinder	1.840	246 (13,4)	.	Chapman et al., 1997
	Milchkühe	1.661	268 (16,1)	.	"
	Mutterkühe	9.256	392 (4,2)	.	Synge et al., 2003
I ⁸	Schlachtrinder	100	17 (17,0)	.	Bonardi et al., 2001
	Kälber	945	39 (4,1)	.	Conedera et al., 2001
N ⁹	Rinder	1541	3 (0,2)	.	Johnsen et al., 2001
	Milchrinder	680	0	416 (61,1)	LeJeune et al., 2006
NL ¹⁰	adulte Rinder	540	57 (10,6)	.	Heuvelink et al., 1998b
	Milchkühe	830	49 (5,9)	.	Schouten et al., 2005
	Rinder	422	6 (1,4)	.	"
PL ¹¹	adulte Rinder	551	4 (0,7)	.	Tutenel et al., 2002
S ¹²	Rinder	3071	37 (1,2)	.	Albihn et al., 2003

¹B: Belgien ²CH: Schweiz ³DK: Dänemark ⁴E: Spanien ⁵F: Frankreich⁶FIN: Finnland ⁷GB: Großbritannien ⁸I: Italien ⁹N: Norwegen¹⁰NL: Niederlande ¹¹PL: Polen ¹²S: Schweden

(): prozentualer Anteil (%) .: nicht untersucht

O157: H7: Serovare O157: H7

Non-O157: andere O-Serogruppen als O157

Tabelle 9: Übersicht über nachgewiesene STEC-Prävalenzen bei Rindern außerhalb Europas, nach Ländern alphabetisch sortiert

Land	Tiere	Anzahl Proben	Gesamtzahl pos. Proben (%)		Referenz
			O157: H7	Non-O157	
BR ¹	Kälber	344	0	20 (5,6)	Leomil et al., 2003
	Wasserbüffel	100	0	37 (37,0)	Oliveira et al., 2007
EAU ²	Zebus	159	0	8 (7,9)	Kaddu-Mulindwa et al., 2001
J ³	Färsen	2.744	153 (5,3)	.	Ezawa et al., 2004
	Schlachtrinder	605	.	97 (16,0)	Fukushima und Seki, 2004
RC ⁴	Rinder	986	8 (0,01)	401 (40,7)	Leung et al., 2001
ROK ⁵	Kälber	254	7 (2,8)	.	Kang et al., 2004
USA ⁶	Rinder	11.881	210 (1,8)	.	Hancock et al., 1997c
	Kälber	115	.	19 (16,5)	Rahn et al., 1997
	Milchkühe	291	.	26 (8,9)	"
	Milchkühe (Farm)	205	7 (3,4)	.	Rice et al., 1997
	Milchkühe (Schlachthof)	103	4 (3,9)	.	"
	Mastrinder	3.162	719(22,7)	.	Smith et al., 2001
	Mastrinder	139	84 (60,4)	.	Keen und Elder, 2002
	Rinder	9.122	82 (0,9)	.	Renter et al., 2003
	Mastrinder	888	27 (3,1)	.	Riley et al., 2003
	Kälber	408	10 (2,5)	.	Dunn et al., 2004a
Fleischrinder	4790	636 (13)	.	LeJeune et al., 2004	
Milchrinder	750	5 (0,7)	108 (14,4)	LeJeune et al., 2006	

¹ BR: Brasilien² EAU: Uganda³ J: Japan⁴ RC: Republik China⁵ ROK: Republik Korea⁶ USA: Vereinigte Staaten von Amerika

.: nicht untersucht

(): prozentualer Anteil (%)

O157: H7: Serovare O157: H7

Non-O157: andere O-Serogruppen als O157

Aus **Tabelle 9** ist ersichtlich, dass die bovinen STEC-Prävalenzen weltweit auf einem ähnlichen Niveau wie in Europa liegen. Eine Ausnahme bilden die USA: Hier dominiert die Serovare O157:H7 nicht nur die humanen Erkrankungsfälle (**Tabelle 5**), sondern kann besonders häufig bei Rindern nachgewiesen werden. Bei Mastrindern sind beispielsweise Prävalenzen von bis zu 60,4% veröffentlicht worden (Keen und Elder, 2002). Andere Serovare kommen in den USA bei Rindern weniger häufig vor als in Europa. Diese Verteilung spiegelt sich auch in den Schwerpunkten der Studien wider: Während in den USA in der Regel die Serovare O157:H7 untersucht wird, stellen besonders in Deutschland, aber auch in vielen Ländern außerhalb der USA die Non-O157:H7-Serovare aufgrund ihrer Häufung als humanpathogene Krankheitserreger in den jeweiligen Ländern ein bevorzugtes Studienobjekt dar.

Bei wiederholten Beprobungen STEC-positiver Rinder fiel auf, dass erhebliche Schwankungen in der Ausscheidungsintensität nachzuweisen waren (Hancock et al., 1998a). Tiere, die einmal als STEC-Ausscheider identifiziert worden waren, wurden bei Beprobungen in Folge häufig nicht mehr als *stx*-positiv erkannt. Die Ausscheidung von STEC ist in der Regel transient und intermittierend (Garber et al., 1995; Hancock et al., 1997a; 1997b; 1997c; Mechie et al., 1997; Robinson et al., 2004). Bei einmaligen Beprobungen von Herden werden aufgrund der intermittierenden Ausscheidung keine oder nur einige Rinder als *stx*-positiv erkannt (Ezawa et al., 2004; Sargeant et al., 2000). Longitudinalstudien zeigten jedoch, dass STEC inklusive des Serovares O157:H7 in allen Herden, wenn zum Teil auch nur gelegentlich, nachzuweisen sind (Hancock et al., 1997a; 1997b), so dass zur Bestimmung von realen Herdenprävalenzen mehrfache Beprobungen notwendig sind.

Die Wahrscheinlichkeit einer Ausscheidung Shiga-Toxin bildender *E. coli* durch Rinder scheint mit verschiedenen Faktoren in Zusammenhang zu stehen. Eine Rolle spielen unter anderem Umweltfaktoren, wie die Jahreszeit, die Haltung und das Betriebsmanagement, aber auch individuelle Faktoren, wie das Alter und Geschlecht des Tieres und die Milchleistungsdaten bei Milchvieh (**Abbildung 5**).

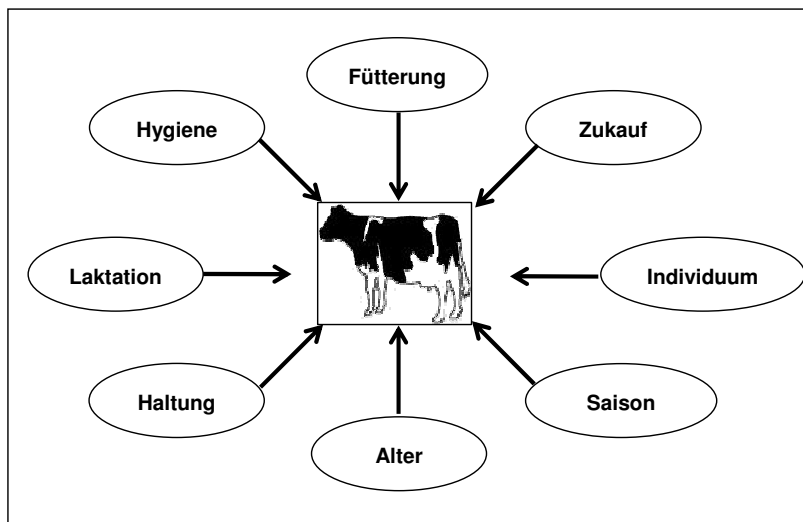


Abbildung 5: Überblick von mit STEC-Ausscheidung durch Rinder assoziierten Faktoren (unvollständig)

Ziel vieler Studien war die Abschätzung der **Saisonalität** der Ausscheidung. In den USA und Europa durchgeführte Longitudinalstudien für O157:H7 ergaben regelmäßig hohe Prävalenzen in den Sommermonaten (Conedera et al., 2001; Hancock et al., 1997a; Rugbjerg et al., 2003; Van Donkersgoed et al., 1999). Diese Häufungen weisen zusätzlich Übereinstimmungen mit den Erkrankungshäufigkeiten von Menschen auf. In anderen Studien konnte das Frühjahr (Dopfer et al., 2006; Hancock et al., 1994; Heuvelink et al., 1998b) oder der Winter (Ogden et al., 2004) als Jahreszeit mit erhöhten Prävalenzen bei Rindern erkannt werden (**Tabelle 10**). Für die Saisonalität von Non-O157:H7-Serovaren existieren nur wenige Studien: Thran et al. (2001) ermittelten bei Färsen die Ausscheidungsrate im Winter mit einer STEC-Prävalenz 15%. Im Frühling lag der Anteil der ausscheidenden Tiere bei lediglich 4%. In einer weiteren Studie wurden jedoch im Herbst mit 9,0% höhere Prävalenzen nachgewiesen als im Winter (5,0%) (Cobbold et al., 2004). Die Differenzen in den Studienergebnissen deuten darauf hin, dass hier ein Einfluss von anderen bekannten und unbekanntem Faktoren nicht ausgeschlossen werden kann.

Neuere Studien wiesen für *E. coli* O157:H7 eine Bedeutung der Tageslichtlänge und der Temperatur auf die STEC-Ausscheidung nach (Edrington et al., 2006). Mögliche Einflussfaktoren wären Schilddrüsen- und Epiphysenhormone, wie beispielsweise Trijodthyronin und Melatonin, die durch Stimulation des Immunsystems (Drazen et al., 2001; Nelson und Drazen, 2000) die Kolonisierung mit und Ausscheidung von STEC verringern könnten (Edrington et al., 2007; Edrington et al., 2008; Schultz et al., 2005).

Der jahreszeitliche Effekt könnte weiterhin durch die Durchführung der Studien in verschiedenen **Klimazonen** bzw. die **geographische Lage** modifiziert werden. Die Umgebungstemperatur der untersuchten Rinder ist ein bedeutender Faktor (Edrington et al., 2006): In den südlichen Staaten der USA wurde eine wesentlich höhere Prävalenz von STEC O157:H7 nachgewiesen als in den nördlich gelegenen Staaten (Hussein und Sakuma, 2005). Selbst das Jahr der Probenerhebung ist relevant; in über mehrere Jahre andauernden Longitudinalstudien differierten die Prävalenzzahlen von Jahr zu Jahr (Schouten et al., 2004).

Tabelle 10: Saisonal-bedingte STEC-Ausscheidungsunterschiede des Serovares O157:H7 bei Rindern, nach Ländern alphabetisch sortiert

Land	Tiere	höchste Prävalenzen/ Saison				Referenz
		Frühj.	Som.	Herb.	Wint.	
CAN ¹	Jungrinder Fleischrinder		X			Van Donkersgoed et al., 1999
DK ²	Kälber Jungrinder		X			Rugbjerg et al., 2003
D ³	Fleischrinder	X	X			Dopfer et al., 2006
GB ⁴	Milchkühe	(X)	X			Mechie et al., 1997
	Mutterkühe			X		Synge et al., 2003
	Fleischrinder				X	Ogden et al., 2004
NL ⁵	Milchkühe	X				Heuvelink et al., 1998b
	Milchkühe		X	X		Schouten et al., 2004
I ⁶	Schlachtvieh	(X)	X	X		Bonardi et al., 2001
	Kälber		X	X		Conedera et al., 2001
USA ⁷	Milchkühe Fleischrinder	X				Hancock et al., 1994
	Milchkühe		X	X		Hancock et al., 1997a
	Milchkühe		X	(X)		Stanford et al., 2005b

Frühj.: Frühjahr (März, April, Mai)

Som.: Sommer (Juni, Juli, August)

Herb.: Herbst (September, Oktober, November)

Win.: Winter (Dezember, Januar, Februar)

X: hohe Prävalenz über gesamte Jahreszeit

(X): hohe Prävalenz während eines Monats der Jahreszeit

¹CAN: Kanada ²DK: Dänemark ³D: Deutschland ⁴GB: Großbritannien

⁵NL: Niederlande ⁶I: Italien

⁷USA: Vereinigte Staaten von Amerika

Als weiterer Risikofaktor für die Ausscheidung ist das **Alter** anzusehen. Kälber zeigten in verschiedenen Studien für O157:H7 und Non-O157:H7-Serovare höhere Prävalenzen als adulte Rinder (Kuhnert et al., 2005; Rugbjerg et al., 2003). Diese Altersverteilung ist von dem Standpunkt aus interessant, dass Hackfleisch, welches eine der häufigsten Infektionsquellen für Menschen darstellt, in der Regel aus dem Fleisch von ausselektiertem Milchvieh hergestellt wird. Studien zufolge scheinen die Prävalenzen bei gemerzten Kühen jedoch höher zu sein als bei anderen Milchkühen, so dass darin ein Erklärungsansatz zu finden ist (Rice et al., 1997). Mit Prävalenzen von 8,6% bildeten Jungrinder im Alter von zwei bis sechs Monaten für die Serovare O157:H7 eine besonders gefährdete Risikogruppe (Moller-Nielsen et al., 2002). Jüngere Kälber (0,7%) und ältere Milchkühe (2,4%) wiesen deutlich niedrigere Prävalenzen auf (Moller-Nielsen et al., 2002). Bei Untersuchungen von Milchrindern zeigten Primipara ebenfalls höhere Prävalenzen als Pluripara (Fitzgerald et al., 2003; Gunn et al., 2007). Untersuchungen von Stanford et al. (2005a) quantifizierten dieses Ergebnis mit einem 2,6-fachen Ausscheidungsrisiko für Färsen im Gegensatz zu adulten Milchkühen.

Auch **innerhalb der Laktation** konnten Unterschiede im Ausscheidungsrisiko von STEC O157:H7 ermittelt werden. Kühe in der Trockensteperiode (in der Regel 8 Wochen ante partum bis zur Abkalbung) wurden im Gegensatz zu laktierenden Kühen in mehreren Studien (Fitzgerald et al., 2003; Kobayashi und El-Sawy, 2007) seltener als Ausscheider identifiziert. Die Ausscheidungswahrscheinlichkeit von STEC ist um die Kalbung im Vergleich zu Tieren in anderen Laktationsstadien erhöht, fällt jedoch innerhalb des ersten Laktationsmonats wieder ab (Mechie et al., 1997). Im Laufe der Laktation sinkt die Wahrscheinlichkeit des *stx*-positiven Nachweises wiederum, um dann, langsam ansteigend, zum siebten Laktationsmonat erneut einen Ausscheidungspeak zu erreichen (Chase-Topping et al., 2007; Mechie et al., 1997; Syngé et al., 2003). Zu den Risikofaktoren einer STEC-Ausscheidung zählen weiterhin Milchmerkmale wie eine hohe Milchleistung sowie hohe Laktose- und Harnstoffgehalte der Milch (Kuhnert et al., 2005; Schouten et al., 2005), wohingegen auf Herdenebene hohe somatische Zellzahlen in der Milch ebenso wie eine andauernde Persistenz der Laktation mit niedrigen STEC-Prävalenzen assoziiert sind (Kuhnert et al., 2005).

Die Bedeutung von **Krankheiten** im Zusammenhang mit Infektionen durch STEC für Einzeltiere ist bisher wenig untersucht worden. In einer US-amerikanischen Studie wurde jedoch bei Kühen mit „Downer Cow Syndrom“, darunter wird das Festliegen einer Milchkuh aufgrund einer Gebärparese verstanden, eine im Verhältnis zu gesunden Tieren erhöhte STEC-Prävalenz nachgewiesen (Byrne et al., 2003). Tiere mit metabolischen Erkrankungen weisen eine verminderte Immunkompetenz auf (Goff, 2006), so dass eine Infektion und Kolonisation durch STEC erleichtert wird. Die Ketose einer Milchkuh beispielsweise geht mit hohen Ketonkörperspiegeln im Blut einher. *In vitro* und zum Teil auch *in vivo* wurden für verschiedene Ketonkörper inhibierende Effekte auf die Lymphozytenproliferation, sowie auf die chemotaktischen und phagozytotischen Aktivitäten der neutrophilen Granulozyten nachgewiesen (Suriyasathaporn et al., 1999).

Von besonderer Bedeutung scheint das Herdenmanagement zu sein. Dazu gehören unter anderem die Herdengröße, die Stall- und Weidenhygiene, der Zu- und Verkauf von Tieren, die Haltungsform und die Fütterung.

Bei Milchvieh und Fleischrindern wurde von erhöhten Prävalenzen in größeren Herden berichtet: Garber et al. (1999) identifizierten für Milchviehherden **Gruppengrößen** über 100 Tieren als Risikofaktor. In weiteren Studien wurden ebenfalls vorwiegend größere Herden mit 134 bis 274 Tieren als positiv für O157:H7 erkannt (Faith et al., 1996). In Großbritannien wurde für Fleischrinder schon bei Gruppengrößen über 25 Tiere eine 3,8-fache Odds Ratio gegenüber kleineren Gruppen nachgewiesen (Ellis-Iversen et al., 2007). Ein Effekt der Herdengröße war ebenfalls bei Studien in den USA zu erkennen (Gunn et al., 2007).

Von Bedeutung sind weiterhin die **Hygiene** des Stalles, sowie der Zustand der Weiden, da die Überlebensdauer von STEC im Kot erheblich ist, so dass der direkten und der indirekten horizontalen Übertragung der Tiere einer Herde eine wichtige Bedeutung zugemessen wird (Cobbold und Desmarchelier, 2002; Heuvelink et al., 1998a). Im Stall stellen vor allem ungepflegte, nasse Tiefboxen einen Risikofaktor dar (Ellis-Iversen et al., 2007). Hygienischere Gummimatten-Liegeboxen wurden mit niedrigeren Prävalenzen assoziiert (Kuhnert et al., 2005). Aus der **Düngung von Weide- und Grünflächen** resultierten ebenfalls höhere Prävalenzen bei untersuchten Rindern. Dies war vor allem dann der Fall, wenn keine ausreichenden Zeitabstände zwischen dem Ausbringen der Gülle und dem Austreiben der Tiere bestand (Gunn et al., 2007; Mechie et al., 1997). In einer Studie stellten Mechie et al. (1997) die mit Abstand höchsten Prävalenzen (68,0% zu 4,3% im Durchschnitt) von *E. coli* O157:H7 bei Färsen fest, die auf eine drei Tage zuvor mit Gülle behandelte Grünfläche ausgebrochen waren. Bei Fleischrindern in US-amerikanischen Feedlots wurde eine Assoziation des **Bodenzustandes** und den STEC-Prävalenzen in den Tiergruppen festgestellt; bei nassen und matschigen Böden stieg das Risiko, STEC-Ausscheider zu finden (Smith et al., 2001; Stanford et al., 2005b). Durch Trockenhalten der Einstreu und ein Verzicht auf Umstellungsmaßnahmen wurde die Last am Serovare O157:H7

von einem Anteil an positiven Proben von 56% um 48% auf einen Anteil von 8% gesenkt werden (Ellis-Iversen et al., 2008). Obwohl eine verbesserte Hygiene im Allgemeinen verminderte Prävalenzen zur Folge hat, wird die Reinigung des Stalles mit Hochdruckreinigern als Risiko definiert (Garber et al., 1999). Vermutlich erfolgt durch die durch den hohen Druck entstehende Vernebelung des Wassers eine Verteilung der STEC im Stallbereich und demzufolge auch eine Kontamination von Futter und Tränkwasser (Garber et al., 1999). Trotz der Infektionsgefahr im Stall durch mangelnde Stall- und Tränkehygiene resultiert eine ausschließliche Stallhaltung bzw. ein reduzierter Auslauf der Milchkühe von bis zu drei Stunden pro Tag in niedrigeren STEC-Prävalenzen als bei einer kombinierten Stall-Weidenhaltung (Bülte, 2002; Kuhnert et al., 2005). Mehrere Studien wiesen nach **Umstellungen** vermutlich auf Stress zurückzuführende (Hughes und Sperandio, 2008; Reading et al., 2009), erheblich höhere Prävalenzen nach, wobei eine zu hohe Tierdichte im Sinne eines „Crowding-Effektes“ ähnlich wirkte (Garber et al., 1999; Gunn et al., 2007; Rugbjerg et al., 2003; Smith et al., 2001; Stanford et al., 2005a; Syngde et al., 2003). Kontrovers diskutiert wird die Bedeutung einer „geschlossenen Herde“, darunter versteht man einen Verzicht auf den **Zukauf von Tieren**. Während einige Studien bei Betrieben mit regelmäßigem Zukauf signifikant höhere Prävalenzen nachwiesen (Moller-Nielsen et al., 2002; Schouten et al., 2004), konnten LeJeune und seine Arbeitsgruppe (2004) zeigen, dass in einer Herde trotz massiven Zukaufs von Tieren ein spezifischer Klon des Serovares O157:H7 über den Zeitraum von sechs Monaten dominierte. Diese Feststellung gibt Hinweise darauf, dass der Umgebung als Quelle einer Infektion mehr Bedeutung zuzumessen ist als dem Zukauf von Tieren (Stanford et al., 2005a).

Die Haltung von Rindern auf Höfen mit weiteren Produktionsrichtungen scheint aus bisher unbekanntem Gründen ebenfalls ein Risikofaktor für hohe Prävalenzen zu sein. Besonders eine gleichzeitige Schweinehaltung ist relevant (Gunn et al., 2007; Schouten et al., 2004). Eine ökologische Bewirtschaftung hat jedoch im Vergleich zu einer konventionellen Betriebsführung keine Relevanz für die STEC-Ausscheidung (Kuhnert et al., 2005).

Vielfach Zielobjekt von Studien war die Beeinflussung der STEC-Ausscheidung durch die **Fütterung** des Rindes. In **Tabelle 11** sind einige Studien aufgeführt, deren Ergebnisse Rückschlüsse auf die Assoziationen von Futtermitteln und der STEC-Ausscheidung des Serovares O157:H7 zuließen. Für andere Serovare sind solche Studien bisher nur *in vitro* durchgeführt worden. Für *E. coli* O157:H7 lässt sich jedoch zusammenfassend feststellen, dass eine Getreide-reiche Fütterung zu einer vermehrten Ausscheidung von *E. coli* O157:H7 führt (Callaway et al., 2009). Rauhfutter-reich gefütterte Rinder scheiden *E. coli* O157:H7 regelmäßig prolongiert, aber in niedrigeren Konzentrationen aus (Van Baale et al., 2004).

Die zu Grunde liegenden Pathomechanismen dieser Reduktion oder Steigerung des Ausscheidungsrisikos für die verschiedenen Futtermittel sind nicht bekannt. Es scheint jedoch ein Zusammenhang mit der Futterzusammensetzung, und hier besonders der

Kohlenhydratverfügbarkeit zu existieren. Grundsätzlich wurde ein Effekt von unterschiedlichen Kohlenhydrat-Arten auf die Struktur der bovinen intestinalen *E. coli*-Flora festgestellt (McSweeney et al., 2004). Eine Getreide-reiche Fütterung führt beispielsweise zu erhöhten Kohlenhydratkonzentrationen im Darm, da die Pankreas-Aktivität des Rindes gering ist. Dem folgt eine Proliferation der dortigen Bakterienflora, die die Kohlenhydrate als Wachstumssubstrat nutzen (Diez-Gonzalez et al., 1998; Tkalcic et al., 2000), so dass eine (erneute) Ausscheidung möglich ist. Bei Rindern wurden bei einer in den USA für die Mast typischen Fütterung – 90% der Ration bestehen aus Mais und Sojabohnen – 100-fach höhere *E. coli*-Populationen nachgewiesen als bei Rindern, die vollständig mit hochwertigem Heu gefüttert wurden (Diez-Gonzalez et al., 1998). Zusätzlich besaßen die von den Getreide-betont gefütterten Tieren gewonnen Isolate eine wesentlich stärkere Säureresistenz, wodurch das humanpathogene Potential der Erreger deutlich erhöht wird (Diez-Gonzalez et al., 1998). Die aus einer Fütterung von Schlempe und Treber resultierende vermehrte Ausscheidung von *E. coli* O157:H7 (Dewell et al., 2005; Synge et al., 2003) könnte durch die Bereitstellung einiger Wachstumsfaktoren, wie beispielsweise von Vitaminen und organische Säuren, erklärt werden, die bei der Hefefermentation entstehen und sich begünstigend auf das Wachstum der STEC auswirken (Callaway et al., 2009).

Tabelle 11: Assoziation der Fütterung mit der Ausscheidung von der STEC-Serovare O157:H7, nach Ländern alphabetisch und nach Art der Beeinflussung sortiert

Land	Futtermittel	Tiere	Ausscheidungsrisiko	Referenz
CAN ¹	Gerste	Mastrinder	↑	Buchko et al., 2000a
CH ²	TMR	Milchkühe	↑	Kuhnert et al., 2005
DK ³	Getreide	Milchkühe	↑	Rugbjerg et al., 2003
	Melasse	„	↑	„
GB ⁴	Schlempe	Mutterkühe	↑	Synge et al., 2003
	Stroh	Mastrinder	↑	Ellis-Iversen et al., 2007
USA ⁵	Tiermehl	Milchkühe	↑	Herriott et al., 1998
	Maissilage	Färsen	↑	„
	Heu	Färsen	↑	Van Baale et al., 2004
	Biertreber	Rinder	↑	Dewell et al., 2005
DK ³	Gersten-GPS ⁷	Milchkühe	↓	Rugbjerg et al., 2003
NL ⁶	Mais	Milchkühe	↓	Schouten et al., 2004
USA ⁵	Baumwollsaat	Rinder	↓	Hancock et al., 1994

¹CAN: Kanada²CH: Schweiz³DK: Dänemark⁴GB: Großbritannien⁵USA: Vereinigte Staaten von Amerika⁶NL: Niederlande

TMR: Totalmischung

⁷Gersten-GPS: Ganzpflanzensilage aus Gerste

↑: erhöht

↓: erniedrigt

Die Bedeutung der Fütterung und des Alters im Zusammenhang mit der Besiedelung der Dickdarmmukosa durch O26:H11, O111:H- und O157:H7 wurde in einer Studie von Cobbold und Desmarchelier (2004) untersucht. Verglichen wurden dabei Kälber und adulte Rinder, sowie adulte Rinder mit Rohfutter- oder Getreide-reicher Ration. Es wurden keine Alters- und Fütterungs-bedingten Unterschiede in der Kolonisierung detektiert (Cobbold und Desmarchelier, 2004).

Relevanz für die Ausscheidung besitzen auch Futterwechsel. Bei mehrfacher Veränderung der Futtermittel im Heu (Rohfaser- und Getreidgehalt) wurden bedeutend mehr Schafe als Ausscheider identifiziert als bei konstanter Fütterung (Kudva et al., 1995; 1997). Allerdings führte ein Wechsel von Getreide-reicher Ration zu einer Rohfaser-reichen Ration mit 100% Heuanteil innerhalb von fünf Tagen zu einer 1.000-fachen Reduktion des fäkalen *E. coli*-Gehaltes (Diez-Gonzalez et al., 1998), so dass die Autoren dazu raten, Rinder ab dem fünften Tag vor der Schlachtung vorwiegend mit Heu zu füttern (Diez-Gonzalez et al., 1998).

Ähnliche Ergebnisse erzielten auch Keen et al. (1999) in einem Fütterungsversuch von natürlich mit *E. coli* O157:H7 infizierten Mastrindern: Bei einer Getreide-dominierten Ration schieden 53,0% der Tiere O157:H7 aus. Die Versuchstiere wurden dann in zwei Gruppen geteilt, wobei eine Gruppe weiterhin die bisherige Ration erhielt und die Prävalenz bei 52,0% stagnierte, während in der anderen Gruppe eine abrupte Futterumstellung auf Heu erfolgte. Daraufhin reduzierte sich die Prävalenz von *E. coli* O157:H7 im Kot auf 18,0% (Keen et al., 1999). Der Futterumstellung auf Rohfaserreiche Rationen einige Tage vor dem Schlachtermin sollte jedoch nicht zuviel Bedeutung zugemessen werden, da auch dadurch keine vollständige Elimination des Erregers erfolgt (Hussein et al., 2003).

Zudem wurde **Fasten** als weiterer, mit der Ausscheidung assoziierter Faktor identifiziert. Die während der physiologischen Verdauung des Rindes entstehenden Lakate und flüchtigen Fettsäuren weisen einen hemmenden Effekt auf die Proliferation von STEC auf (Cobbold und Desmarchelier, 2004). Bei hungernden Rindern, z. B. bei längeren Transporten zum Schlachthof, sinkt der Spiegel an flüchtigen Fettsäuren im Pansen und ermöglicht somit eine Vermehrung von *E. coli* (Buchko et al., 2000b), auch wenn in der Regel die Serovare O157:H7 im Pansen nicht nachzuweisen ist (Naylor et al., 2003). In einer Studie von Kudva et al. (1995) wurden Schafe vor und nach einer Fastenperiode untersucht. Durch den Futterentzug schieden zuvor scheinbar STEC O157:H7 negative Tiere den Erreger in ihrem Kot aus.

Die in einigen Studien ermittelte Verlängerung der Ausscheidung von STEC O157:H7 bei Heufütterung (Hovde et al., 1999) wurde in anderen Studien weder *in vitro* noch *in vivo* bestätigt (Cobbold und Desmarchelier, 2004; Magnuson et al., 2000). Die Arbeitsgruppe um Magnuson (2000) zeigte, dass die Ausscheidungsdauer von STEC bei Rindern mit der Epithelzellproliferation im Caecum und distalen Colon assoziiert ist; diese korrelierte in den Untersuchungen jedoch nicht mit dem Rohfaser- und Getreidgehalt der Ration.

Bei einer Analyse der Felddaten von Syngé et al. (2000; 2003) fielen die Prävalenzstrukturen in 952 Herden auf. Der Großteil der Herden war während des gesamten Probenzeitraumes im Kot für *E. coli* O157:H7 negativ. In anderen Herden traten zwischenzeitlich auch kurzandauernde Perioden mit ausscheidenden Tieren auf. Weiterhin wurden in nur 2% der Herden Prävalenzen von 90 bis 100% nachgewiesen. Diese augenfälligen Differenzen ließen Matthews et al. (2006a; 2006b) vermuten, dass in die Rinderpopulation Unterschiede in der Transmissionsdynamik auf Einzeltier- und Herdenebene ausgeprägt sein müssen. In einem biometrisch-statistischen Erklärungsansatz modellierten Matthews et al. (2006a; 2006b) die Ausscheidungs- und Innerherdentransmissionsdynamik anhand der realen Datensätze von Syngé et al. (2000; 2003). Im Vergleich verschiedener epidemiologischer Modelle mit den realen Prävalenzen zeigte sich, dass die beste Anpassung des Modells erreicht wurde, wenn ein geringer Anteil der Tiere (4%) eine 50-fach höhere fäkale Ausscheidungsrate von *E. coli* O157:H7 aufweist als die übrigen Tiere. Diese hoch-ausscheidenden Tiere wurden als „Super Shedder“ definiert (Matthews et al., 2006b). Zusätzlich relevant waren auch die Einbringung des Erregers in den Betrieb von außen, sowie Herden- bzw. Betriebs-bedingte Differenzen in der Übertragung des Erregers (Matthews et al., 2006b). Die „Super Shedder“ wiesen durch die hohen im Kot ausgeschiedenen Erregerzahlen eine bedeutende Infektiosität auf und wurden in weiteren Analysen als wichtige Überträger des Erregers identifiziert. Laut Matthews et al. (2006a) gehen etwa 80% der Übertragungen von *E. coli* O157:H7 auf 20% der am meisten infektiösen Tiere zurück. Weitere Studien zeigten, dass die Unterschiede in der Ausscheidungsichte von *E. coli* O157:H7 mit einer Kolonisierung der Mukosa, einer Lymphfollikel-reichen Region des rektotoanaln Übergangs, assoziiert sind; diese Besiedelung erfolgt in Form von Enterocyten-adhärenenten Mikrokolonien (Naylor et al., 2003). Wie Bonardi et al. (2007) entdeckten, weist *Escherichia coli* O157:H7 einen Tropsimus für Lymphgewebe auf. Bei einem Drittel der Schlachttiere, die *E. coli* O157:H7 ausschieden, wurde der Mikroorganismus ebenfalls aus den Tonsillen oder anderem Lymphgewebe isoliert (Bonardi et al., 2007). Erleichtert wird den STEC die Kolonisierung des bovinen Darms durch die immunmodulierende Wirkung von Stx₁, welches mit bovinen Lymphozyten interagiert (Menge et al., 2003). Aus einer erfolgreichen Kolonisierung durch STEC resultiert eine persistierende Ausscheidung über mindestens zwei Wochen – das entspricht vier aufeinanderfolgenden Probenahmen- mit hohen fäkalen Keimzahlen von über 1×10^4 cfu/g Kot (Cobbold et al., 2007; Low et al., 2005). Die Bedeutung der „Super Shedder“ für den Infektionszyklus in der Herde wird deutlich, wenn die Verteilung *E. coli* O157:H7-ausscheidender Tiere in den verschiedenen Abteilen des Betriebs betrachtet wird. In Rindergruppen, denen ebenfalls „Super Shedder“ angehörten, ließen sich deutlich höhere Prävalenzen nachweisen (Cobbold et al., 2007). Von *E. coli* O157:H7 nicht kolonisierte, lediglich transient infizierte Tiere schieden den Erreger in der Regel in einer niedrigeren Erregerdichte und lediglich für einige Tage aus, während für „Super Shedder“ Nachweise von bis zu mehreren Monaten beschrieben wurden (Chase-Topping et al.,

2007; Cobbold et al., 2007; Lim et al., 2007; Low et al., 2005). Eine Analyse der Ausscheidungschancen in Form von Odds Ratio ergab, dass Rinder, in deren Fäzes kein *E. coli* O157:H7 nachgewiesen wurde, eine fünffach höhere Chance hatten, nicht mit einem „Super Shedder“ zusammen eingestallt gewesen zu sein (Cobbold et al., 2007). Das in Herden mit „Super Sheddern“ mehr Übertragungen von *E. coli* O157:H7 vorkommen, liegt zum Einen daran, dass die empfänglichen Rinder durch die persistente Ausscheidung der „Super Shedder“ häufiger Kontakt zu dem Erreger haben, aber zum anderen auch daran, dass die Tiere mit höheren Keimzahlen in Kontakt kommen (Chase-Topping et al., 2008). Mit dieser höheren Infektionsdosis steigt ebenfalls die Wahrscheinlichkeit einer Infektion. Auch wenn eine genaue minimale Infektionsdosis für Rinder bisher nicht bekannt ist, wird sie in der Größenordnung von weniger als 300 cfu vermutet (Besser et al., 2001). Bekämpfungsmaßnahmen bei den „Super Sheddern“ in Form von Impfung, Medikamentenbehandlungen und Probiotika-Fütterung gehen mit einer Reduktion der Ausscheidung und damit auch mit einer Verringerung der Übertragungswahrscheinlichkeit und niedrigeren Herdenprävalenzen einher (Matthews et al., 2006a; Naylor et al., 2007; Potter et al., 2004) und bieten einen effektiven Ansatzpunkt für die Bekämpfung von *E. coli* O157:H7 in Rinderbeständen.

2.7 Übertragungswege für den Menschen

Für STEC-Infektionen wurden multiple Übertragungswege ermittelt. Einige von ihnen sind in **Tabelle 5** aufgezeigt. Beschrieben sind, wie auch aus **Abbildung 6** ersichtlich, sowohl primär als auch sekundär mit STEC kontaminierte Lebensmittel, aber auch direkte fäkal-orale Infektionswege.

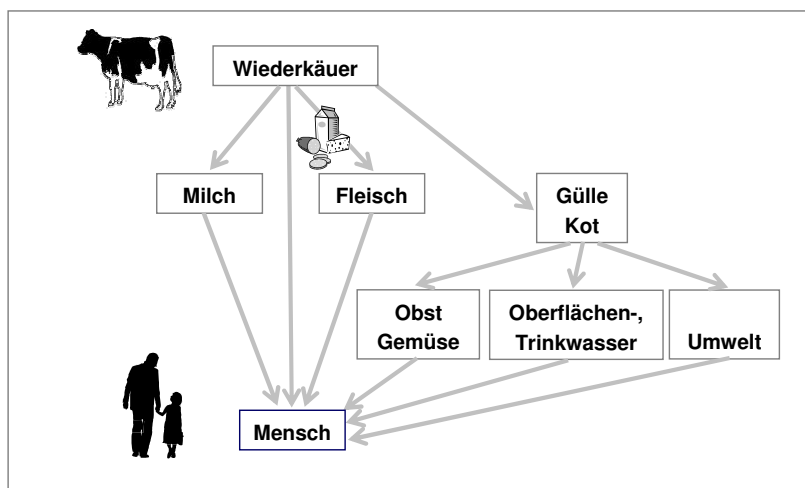


Abbildung 6: Übersicht über mögliche Infektionswege von bovinen STEC für den Menschen

Lebensmittel tierischer Herkunft, die roh oder nicht vollständig durcherhitzt verzehrt werden und von Wiederkäuern stammen, weisen das größte Risikopotential auf. Seit 1982 wurde regelmäßig von auf Hamburger oder Hackfleisch zurückzuführende Erkrankungsfälle berichtet (Centers for Disease Control and Prevention, 2007d; 2008; Pavia et al., 1990; Ryan et al., 1986; Vogt und Dippold, 2005; Willshaw et al., 1994). Hackfleisch und aus Hackfleisch hergestellte Erzeugnisse stellen aufgrund ihrer großen Oberfläche, dem freigesetzten Fleischsaft und einer Schädigung der mechanischen Schutzbarrieren gegen das Eindringen von Keimen (beispielsweise Faszien) ein ideales Habitat für Mikroorganismen dar. Selbst bei einer Temperatur von 4°C bzw. -18°C erfolgte bei einer Lagerung von bis zu 180 Tagen lediglich eine geringgradige Reduktion des Keimgehaltes in Hackfleisch oder Hamburger Patties (Ciftcioglu et al., 2008). Bei primärer Kontamination des Schlachtkörpers können STEC im Kühlhaus ebenfalls mehrere Wochen überleben. In diesem Zusammenhang können die Keime auch von einem Schlachtkörper auf einen anderen übertragen werden. Weitere Möglichkeiten der sekundären Kontamination bestehen im Rahmen der

Fleischverarbeitung, bei der Zerkleinerung des Fleisches zu Hackfleisch und beim Verpacken. Hier ist nicht nur die Gefahr einer Verschleppung der Keime von Teilstück zu Teilstück existent, sondern auch die Problematik einer Kontamination durch das verarbeitende Personal. In einer Schweizer Studie wurden 3,5% der 5590 gesunden Mitarbeiter als STEC-Ausscheider identifiziert (Stephan et al., 2000). Nur für das sorgfältige und vollständige Erhitzen ist bisher eine ausreichende Reduktion von STEC und anderen *Enterobacteriaceae* bewiesen (Robert Koch-Institut, 1999c). Dies stellt zurzeit die einzige und wichtigste Maßnahme dar, die die Infektkette vom Fleisch zum Menschen unterbricht.

Auch **fermentierte Rohwurstzeugnisse** wurden in den 1990er Jahren immer wieder als Vektoren für STEC nachgewiesen. So wurde beispielsweise durch kontaminierte Mettwurst ein großer Ausbruch im Süden von Australien hervorgerufen (Centers for Disease Control and Prevention, 1999), aber auch in Norwegen gab es einen Ausbruch in Folge des Verzehrs einer traditionellen fermentierten Salami, die aus Schaffleisch hergestellt worden war (Schimmer et al., 2008). Rohwürste sind aufgrund der sich aus ökonomischen Gründen verkürzenden Reifezeiten der Würste in der industriellen Herstellung als potentielle Infektionsquellen einzustufen. Der in den ersten Stunden der Reifung eintretende deutliche Abfall des pH-Wertes von etwa 6,0 auf 5,0 führt lediglich zu einer Hemmung des Keimwachstums, nicht aber zu einer Abtötung der Mikroorganismen. STEC können in der Rohwurst zum Teil mehrere Wochen überleben (Glass et al., 1992; Stiebing et al., 2000a; 2000b). Besonders die Serovare O157:H7 weist eine hohe Überlebensfähigkeit gegenüber niedrigen pH-Werten bis zu pH 2,0 auf und kann sich begrenzt an solche Umgebungen adaptieren (Lin et al., 1996). Diese Anpassung an saure Milieus führt zu einer Resistenz gegenüber der Salzsäure bei der Magenpassage, einer fehlenden Elimination durch dieselbe und daraufhin zu wesentlich niedrigeren minimalen Infektionsdosen (Lin et al., 1996). Die Reduktion des a_w -Wertes in Folge der Abtrocknung bei der Reifung besitzt besonders bei industriell hergestellter Rohwurst kein Potential, das Wachstum von *Enterobacteriaceae* zu stoppen. Bei einer Verminderung des a_w -Wertes in Bereiche um 0,94 erfolgt immer noch ein, wenn auch reduziertes, Wachstum von *Enterobacteriaceae* (Fehlhaber, 2004). Eine Reduktion des a_w -Wertes auf 0,7, wie es für manche traditionelle Salamis üblich ist, führt jedoch zur deutlichen Wachstumshemmung (Gibson und Roberts, 1986).

Eine weitere Quelle für STEC-Infektionen stellen **Milch und Milchprodukte** dar. Im Jahre 1990 wurden in Deutschland die ersten Erkrankungsfälle durch den Verzehr von unpasteurisierter Kuhmilch beschrieben (Bockemühl et al., 1990). Auch bei einem der größten Ausbrüche in Deutschland in den Jahren 1996 und 1997 in Bayern wurde bei einem Teil der Erkrankten Rohmilch als Infektionsvektor nachgewiesen (World Health Organisation, 1997). In anderen Fällen von STEC-Infektionen in Europa wurde Rohmilch oder sogar pasteurisierte Milch als Vektor bestätigt oder verdächtigt (Bielaszewska et al., 1997; Liptakova et al., 2004; Robert Koch-Institut, 1996b; Upton

und Coia, 1994). In einem Fall infizierten sich drei Patienten über Rohmilchverzehr in einem Urlaub in Tunesien (Robert Koch-Institut, 1999a). Aber auch Milcherzeugnisse, hier in besonderem Fall Produkte aus Rohmilch, können zu Erkrankungen führen. Es wurde von einer Gruppenerkrankung berichtet, die in Folge des Verzehrs eines Ziegenrohmilchkäses entstand (N.N., 1999). Bereits mehrfach wurde gezeigt, dass in Cheddar-Käse aus Rohmilch *E. coli* O157:H7 über die gesamte, 60 Tage dauernde Reifepériode infektionsfähig bleiben (Civera et al., 2007; Schlessler et al., 2006). Auch außerhalb Europas wurden Infektionen durch Milchprodukte, meist durch Rohmilch und Rohmilcherzeugnisse, vielfach beschrieben (Centers for Disease Control and Prevention, 2007b; Denny et al., 2008; Keene et al., 1997). In den USA ergab eine Untersuchung von Tankmilchproben eine *stx*-Nachweisrate von 4,3%; es handelte sich aber vor allem O157:H7-Serovare (Murinda et al., 2002). In Großbritannien hingegen wurden für Non-O157:H7 Prävalenzen von 2,1% ermittelt (McKee et al., 2003), die Serovare O157:H7 bildete eine Minderheit. Ähnliche Werte und Serovarenverteilungen wurden auch in Deutschland ermittelt (Karns et al., 2007; Klie et al., 1997).

Lebensmittel pflanzlichen Ursprungs wurden in der Vergangenheit ebenfalls regelmäßig als Vektor identifiziert. Im Jahre 1996 wurde in den USA ein Ausbruch aufgrund von kontaminiertem Apfel-Cidre nachgewiesen werden (Hilborn et al., 2000). Auch unpasteurisierter Apfelsaft stellte in Nordamerika und Kanada eine Infektionsquelle für 45 Personen dar (Alpers et al., 1996). Der größte beschriebene Ausbruch mit einem Vektor pflanzlichen Ursprungs ereignete sich 1996 in Japan: Über 9000 Personen erkrankten, mehr als 500 Patienten benötigten eine Hospitalisation und bei 101 Erkrankten kam es zu einem Hämolytisch-Urämischen Syndrom (World Health Organisation, 1996). Die Infektion erfolgte durch den Verzehr von Daikon-Kresse, gekeimten Daikon-Rettichsamen, die im asiatischen Raum üblicherweise roh verzehrt werden und über Großküchen an mehrere Kindergärten und Kindertagesstätten ausgegeben wurden (World Health Organisation, 1996). Weitere Fälle in Schweden und den USA sind bekannt, in denen kontaminierter Salat zu STEC-Infektionen führte (Brooks et al., 2004; Soderstrom et al., 2005). In den USA kam es 2006 zu einem Ausbruch von STEC-Infektionen mit 199 Erkrankten in 26 Bundesstaaten, wobei sich bei 31 Patienten die Infektion zu einem HUS verkomplizierte und drei Fälle einen letalen Ausgang nahmen (Centers for Disease Control and Prevention, 2006). Als Erregerreservoir wurde abgepackter Spinat identifiziert (Centers for Disease Control and Prevention, 2006). Im Herbst 2007 wurde in den USA ein Ausbruch beschrieben, bei dem Peperoni auf einer Tiefkühlpizza als Infektionsquelle identifiziert wurden (Centers for Disease Control and Prevention, 2007c), so dass inzwischen davon ausgegangen werden muss, dass auch tiefgefrorene Lebensmittel als Vektoren in Betracht gezogen werden müssen.

Selbst **kontaminiertes Wasser** führt immer wieder zu Erkrankungsfällen. Im Jahre 1992 kam es zu einem größeren Ausbruch mit 240 Patienten in einer Ortschaft in Missouri/USA durch verunreinigtes Leitungswasser (Swerdlow et al., 1992). In ähnlicher Art war ein Ausbruch in Kanada auf eine Kontamination der öffentlichen Wasserversorgung zurückzuführen (World Health Organisation, 2000). Auch Brunnenwasser hat durch die Gefahr der fäkalen Kontamination ein großes Gefährdungspotential: In Japan infizierten sich so 174 Kinder mit STEC (Akashi et al., 1994). Der Nachweis von STEC aus Wasser gestaltet sich häufig schwierig. In vielen Fällen kann Wasser nur durch den Ausschluss anderer Infektionsquellen und durch epidemiologische Hinweise als Ursache ermittelt werden.

Aufgrund der Rolle des Wiederkäuers als Reservoir für STEC birgt der direkte **Kontakt zu Tieren** im Allgemeinen und zu Wiederkäuern als STEC-Reservoir im Besonderen (**Tabelle 5**) ein bedeutendes Gefahrenpotential. Bei dem bereits beschriebenen Ausbruch in Bayern hatten 43% der Patienten, bei denen eine Erregerquelle ermittelt wurde, Kontakt zu Tieren von landwirtschaftlichen Höfen (World Health Organisation, 1997). Auch bei anderen Erkrankungsfällen konnten Nutztiere als Infektionsquelle erkannt werden (Gallien et al., 1997).

Auf einer agrarwissenschaftlichen Messe in Texas/USA infizierten sich beispielsweise 25 Personen im Alter von 18 Monaten bis zu 67 Jahren mit STEC, wobei fünf Patienten mit lebensgefährlichen Folgen zu kämpfen hatten (Durso et al., 2005). Als Risikofaktoren wurde vor allem der Kontakt zu den Tieren der Ausstellung identifiziert, auch wenn ein Erregernachweis dort nicht durchgeführt wurde (Durso et al., 2005). Ähnliche Hinweise auf die Bedeutung des Kontaktes zu Rindern für eine Infektion mit STEC geben auch andere Studien. So ermittelten Wilson et al. (1996) bei 41% der untersuchten Blutproben von Landwirts-Familien Antikörper gegen Stx₁. Antikörper gegen O157:H7 wurden nur in 12,5% der humanen Blutproben gefunden, allerdings war dann O157:H7 auch bei den Rindern der entsprechenden Höfe nachweisbar (Wilson et al. 1996). Das regelmäßige Vorkommen von Antikörpern gegen Stx₁ in dieser Studie weist auf häufige Infektionen der Kinder mit wenig virulenten STEC-Stämmen aus Rindern hin. Schwerwiegende Erkrankungen treten bei diesen Infektionen nur selten auf. Bei adulten Menschen können jedoch auch O157:H7-Infektionen asymptomatisch verlaufen, wobei diese Personen dann als gesunde Ausscheider ein erhöhtes Infektionsrisiko für andere Menschen bergen (Silvestro et al., 2004).

Neben dem klassischen Reservoir „Rind“ wurden auch kleine Wiederkäuer und Wildwiederkäuer als Träger von STEC erkannt (**Tabelle 12**). Während bei Wildwiederkäuern hauptsächlich der Verzehr kontaminierten Fleisches als Infektionsquelle dient, spielen kleine Wiederkäuer besonders in Streichelzoos eine Rolle. Der enge Kontakt der Risikogruppe Kleinkind mit Schafen und Ziegen, deren Bedeutung als Reservoir für STEC nicht zu unterschätzen ist, birgt bedeutendes Gefahrenpotential (Robert Koch-Institut, 2004b) und führte bereits zu mehreren Erkrankungsfällen (Centers for Disease Control and Prevention, 2005). Zur Stärkung des Bewusstseins der Eltern für diese Gefahren haben das amerikanische CDC (Center for Disease Control and Prevention) (2007a) und das Robert Koch-Institut (2005b) einen Katalog von Präventionsmaßnahmen veröffentlicht, die zur Vermeidung von Risiken befolgt werden sollten.

Tabelle 12: Übersicht über nachgewiesene Prävalenzen von STEC bei kleinen Wiederkäuern und Wildwiederkäuern, nach Ländern alphabetisch sortiert

Land	Tiere	Anzahl Proben	Gesamtzahl pos. Proben (%)		Referenz
			O157: H7	Non-O157	
D ¹	Schafe	15	.	3 (20,0)	Gallien, 1994
	Schafe	28	0	9 (32,1)	Zschöck et al., 2000
	Ziegen	93	0	70 (75,3)	"
	Schafe	131	0	53 (40,5)	Bülte et al., 2002
	Wildwiederkäuer	k.A.	k.A.	k.A. (14,0)	Bundesinstitut für Risikobewertung, 2007
E ²	Lämmer	204	5 (0,4)	467 (35,9)	Blanco et al., 2003
	Wildwiederkäuer	243	.	58 (23,9)	Sanchez et al., 2008
N ³	Schafe	665	0	.	Johnsen et al., 2001
NL ⁴	Mutterschafe	52	2 (3,8)	.	Heuvelink et al., 1998b
USA ⁵	Wildhirsche	338	1 (0,3)	.	Dunn et al., 2004b
	Gatter-Hirsche	55	1 (1,8)	.	"

¹ D: Deutschland

² E: Spanien

³ N: Norwegen

⁴ NL: Niederlande

⁵ USA: Vereinigte Staaten von Amerika

k.A.: keine Angabe

.: nicht untersucht

(): prozentualer Anteil (%)

O157: H7: Serovare O157: H7

Non-O157: andere O-Serogruppen als O157

Andere Tierarten, wie Schweine, Hunde, Katzen, Wildenten, Rotfüchse und Hühner wurden als Träger von STEC ermittelt, spielen aber im infektionsepidemiologischen Geschehen eher eine geringe Rolle (Beutin et al., 1993; Hörzer und Awad-Masalmeh, 2000; Syngé et al., 1993). Trotzdem lag bei einem italienischen Ausbruch der Verdacht nahe, dass sich die STEC-Infektion durch Kontakt zu Hühnern ausgebreitet hat (Tozzi et al., 1994). Die Bedeutung von Haustieren im Infektionszyklus von STEC sollte deshalb nicht unterschätzt werden. Zwar wird von geringen Prävalenzen bei Haustieren berichtet, aber der Kontakt von Kleinkindern zu diesen Tieren ist vielfach eng. In einem Fall wurde von einer ausschließlich in der Wohnung gehaltenen Katze berichtet, die über sechs Monate als STEC-Ausscheider nachgewiesen werden konnte und bei einem Kleinkind der Familie zu einer Erkrankung führte (Schraner et al., 2007). STEC-positive Pferde führten in einigen Fällen zu Erkrankungen beim Menschen. In einem Fall erkrankte ein älterer Landwirt, der sich vermutlich beim Entfernen von Kot eines Durchfall-kranken Pferdes mit STEC infizierte. In einem weiteren Fall entwickelte ein 15 Monate alter Junge nach Kontakt zu Minipferden ein inkomplettes HUS (Chalmers et al., 1997; Robert Koch-Institut, 1999b).

Zunehmende Bedeutung gewinnt die direkte Übertragung des Erregers von **Mensch zu Mensch** („Person-to-Person“). Sie tritt neben dem Kontakt zu Tieren und dem Verzehr von Tieren stammender Lebensmittel immer mehr in den Vordergrund (Brooks et al., 2004). Bei vielen größeren Ausbrüchen beginnt die STEC-Infektion mit Einzelpersonen, die sich an verschiedenen Quellen anstecken und den Erreger entweder indirekt über Lebensmittel oder über direkten Kontakt weiter verbreiten. Ein solcher Fall ereignete sich beispielsweise in einem Altersheim: Eine erste Erkrankungswelle resultierte aus dem Verzehr kontaminierter Sandwiches, die zweite Erkrankungswelle schloss sich durch Mensch-zu-Mensch-Übertragungen durch infiziertes Pflegepersonal an (Carter et al., 1987) Die Relevanz der direkten Übertragung lässt sich bei der Betrachtung einiger Ausbrüche ermessen. So infizierten sich 1995 in Großbritannien 31 von 104 Kindern in einer privaten Kindertagesstätte mit STEC O157:H7 (Al-Jader et al., 1999). Zwei der Kinder litten beim Besuch der Kindertagesstätte bereits an Hämorrhagischer Colitis. Eines der beiden Kinder wurde mit dieser Erkrankung sogar über den Zeitraum einer Woche in die Kindertagesstätte geschickt. Von diesen beiden Fällen ausgehend infizierten sich weitere 29 Kinder im Alter von vier Monaten bis 7 Jahren, drei Betreuer des Kindergartens und 13 mit den Kindern im Haushalt lebende Personen. Andere Infektionsquellen konnten nicht ermittelt werden (Al-Jader et al., 1999). Ähnliche Ausbrüche mit Ausbreitung der Infektion über direkten Kontakt zu STEC-Ausscheidern wurden auch in Deutschland beobachtet (Reida et al., 1994).

Regelmäßig wird bei Ausbrüchen die Infektion auf Familienmitglieder oder befreundete Kinder, die symptomlose Ausscheider oder ebenfalls erkrankt waren, zurückgeführt. In der Studie von Al-Jader et al. (1999) erkrankten Mädchen häufiger als Jungen. Dies resultierte vermutlich aus ihrem ausgeprägteren Sozial- und Gruppenverhalten und der

damit verbundenen höheren Ansteckungsgefahr. Sporadische STEC-Infektionen gingen jedoch auch vermehrt auf asymptomatische Ausscheider in der näheren Umgebung oder der Familie zurück (Gallien et al., 1997). In Frage kamen hier vor allem die älteren Verwandten, wie beispielweise die Großeltern, aber auch die Eltern und andere Erwachsene, sowie Geschwisterkinder (Robert Koch-Institut, 2008b). Dieser Sachverhalt wird ebenfalls durch epidemiologische Daten untermauert: Im Jahr 2007 traten in Deutschland nur vier Häufungen von STEC-Infektionen auf, wobei es sich jeweils um ein Kind handelte, welches an HUS erkrankte, sowie um jeweils ein an STEC-bedingter Enteritis leidendes Geschwisterkind (Robert Koch-Institut, 2008b).

Das Robert Koch-Institut (RKI) hat in den Jahren 2003 bis 2004 eine Fall-Kontroll-Studie zu den Risikofaktoren für sporadische STEC-Infektionen in Deutschland durchgeführt (Robert Koch-Institut, 2005b). Hier wurden die bereits beschriebenen Vektoren bestätigt. Bedeutung haben für Kleinkinder nach Aussage des RKI der direkte und indirekte Kontakt zu Wiederkäuern, in besonderem Maße der Besuch von Bauernhöfen und Streichelzoos mit und ohne Kontakt zu den Tieren, für erwachsene Menschen eher der Verzehr von Rohmilch, streichfähigen, industriell hergestellten Rohwurstprodukten, rohem bzw. nicht vollständig durcherhitztem und Dönerkebab-Fleisch. Insgesamt ist aber auch der Kontakt zu Infizierten und Ausscheidern relevant. Bülte et al. (2001) messen dem Kontakt zu Wiederkäuern ebenfalls die größte Bedeutung zu; als zweitgrößte Infektionsquelle schätzen sie jedoch die Mensch-zu-Mensch-Übertragung ein.

3 Eigene Untersuchungen

In dieser Studie wurde die STEC-Ausscheidung von Milchkühen mit verschiedenen Anzahlen absolvierter Laktationen über den Zeitraum von zwölf Monaten in sechs schleswig-holsteinischen landwirtschaftlichen Betrieben untersucht.

3.1 Material

3.1.1 Versuchsbetriebe und Probenzahl

Für die Probennahme standen zehn Milchvieh-haltende Betriebe zur Auswahl, auf denen bereits zuvor in einer abgeschlossenen Studie Daten zur Tierhaltung, Tiergesundheit und zum Management erhoben worden waren (Kemper, 2007). Diese Betriebe verteilten sich auf fünf Regionen Schleswig-Holsteins, den Kreisen Schleswig, Rendsburg-Eckerförde, Segeberg, Stormarn und Hamburg. In der entsprechenden Region bildeten jeweils zwei Betriebe ein Betriebspaar, wobei jeweils ein Hof ökologisch und der andere konventionell bewirtschaftet wurde.

Die Auswahl der drei Betriebspaare, die für diese Studie besucht werden sollten, erfolgte aufgrund der Kooperationsbereitschaft der Landwirte und in Anbetracht der Vergleichbarkeit der allgemeinen Bedingungen wie Herdengröße, Management und Fütterung.

Es wurden sechs Betriebe ausgewählt, die in etwa gleiche Kuhzahlen aufwiesen und ähnliche Futtermittel vorlegten. Hierbei konnten allerdings nur Betriebe gleicher Bewirtschaftungsformen verglichen werden, da sich die Futterratten im Ökolandbau aufgrund der zulässigen Futtermittel deutlich unterschied. In fünf Betrieben wurden die Tiere im Gruppenlaufstall mit Weidegang im Sommer gehalten. Lediglich ein Betrieb hielt seine Kühe im Anbindestall, wobei auch hier Weidegang im Sommer gewährt wurde.

Die Auswahl der Probestiere innerhalb der Betriebe wurde anhand der Daten des Landeskontrollverbandes (LKV) vom Januar 2007 getroffen. Es wurde ein geschichtetes Stichprobenverfahren mit zufälliger, systematischer Auswahl vorgenommen. Alle zu diesem Zeitpunkt gehaltenen Milchkühe ab der ersten Abkalbung wurden in Gruppen entsprechend der Anzahl ihrer absolvierten Laktationen eingeteilt. Hierbei bildeten die erstlaktierenden Tiere die Gruppe 1, die zweit- und drittlaktierenden Milchkühe die Gruppe 2 und alle älteren Tiere wurden der Gruppe 3 zugerechnet. Nach Cannon und Roe (1982) wurden die bei einer anzunehmenden Prävalenz von 50% und einem Signifikanzniveau von 90% zu nehmenden Stichprobenzahlen errechnet. Von einer Prävalenz von 50% wird in diesem Falle ausgegangen, da die zu nehmenden Probenzahlen bei diesem Wert maximal sind und die erwarteten STEC-Prävalenzen durchaus in diesem Bereich liegen könnten (Geue et al., 2002). Die Verteilung der Probenzahlen auf die verschiedenen Gruppen erfolgte proportional entsprechend der jeweiligen Altersverteilung auf den Betrieben und ist in **Tabelle 13** aufgeführt.

Tabelle 13: Übersicht der teilnehmenden Milchvieh-haltenden Betriebe A, B, C, D, E und F und Anzahl der jeweils monatlich untersuchten Kotproben in den drei Gruppen der Kühe mit unterschiedlichen Anzahlen absolvierter Laktationen

Betrieb	Region	Bewirtschaftungsform	Kuhzahl	Probenzahl	Probenzahl Gr. 1	Probenzahl Gr. 2	Probenzahl Gr. 3
A	1	konventionell	89	22	10	7	5
B	1	ökologisch	55	21	6	6	9
C	2	konventionell	115	24	8	11	5
D	2	ökologisch	62	21	6	7	8
E	3	konventionell	77	21	7	7	7
F	3	ökologisch	73	23	5	9	7

Stand Kuhzahlen: 01/2007

Region 1: Landkreis Segeberg Region 2: Landkreis Stormarn Region 3: Hamburg

Gr. 1: Erstlaktierende Gr. 2: Kühe in der zweiten und dritten Laktation

Gr. 3: Kühe mit mehr als drei absolvierten Laktationen

3.1.2 Probennahme

Die Probennahme wurde als monatliches Monitoring von Kotproben durchgeführt. Jeder Betrieb wurde in etwa vierwöchigem Abstand besucht, wobei jeweils das in der gleichen Region liegende Betriebspaar an einem Tag beprobt wurde.

Die Probennahme erfolgte rektal mittels handelsüblicher Einmalhandschuhe (Krutex Soft Rectal Gloves, Heiland Vet GmbH, Hamburg). In Vorversuchen erwies sich die Besiedelung der Handschuhe mit bovinen Fäkaleregern als vernachlässigbar, so dass nicht sterile Handschuhe verwendet wurden.

Jedes Probestier wurde nach der Identifikation fixiert und eine Kotmenge von circa 20g wurde aus dem Rektum entnommen. Diese Methode war bei trocken stehenden Tieren aufgrund mangelnder Fixationsmöglichkeiten auf der Weide und im Tiefstrelaufstall nicht durchführbar, so dass in diesen Fällen eindeutig zuzuordnender Kot vom Boden gesammelt wurde. Bei Abgang eines Probestieres aus der Herde wurde ein in der Laktationsgruppe und dem Laktationsstadium adäquates Tier als Ersatz ausgewählt.

Die Kotproben wurden innerhalb eines Zeitraumes von acht Stunden ins Labor verbracht und dort untersucht.

3.2 Methoden

3.2.1 Voruntersuchungen

Zur Optimierung der Hauptuntersuchung wurden im Vorfeld Versuche in verschiedenen Bereichen der Methodik durchgeführt.

Zunächst war es erforderlich, ein praxistaugliches, zeiteffizientes Probenahmeverfahren für die zur Anreicherung notwendigen Kotprobentupfer zu finden. Geue et al. (2002) verwendeten rektal entnommene Kotprobentupfer, für deren Entnahme die Fixation der Tiere notwendig war, so dass in der genannten Studie während der gesamten Zeit des Weidegangs auf eine Probennahme verzichtet wurde. Um auch nicht fixierte Tiere beproben zu können, wurden in dieser Studie im Rahmen der Voruntersuchungen die Ergebnisse einer Untersuchung von Kotproben mit denen des rektalen Tupfers verglichen. Die Kotproben wurden entweder – bei fixierten Tieren – rektal oder von auf dem Boden liegenden Kot entnommen. Nach einer sorgfältigen Durchmischung der Kotprobe wurden im Labor 2g Kot in eine Schraubverschlußflasche mit 30mL 1xPBS-Lösung (137mM Natriumchlorid, 2,7mM Kaliumchlorid und 12mM Phosphat, pH 7,4) eingewogen. Die Flasche wurde manuell geschwenkt, bis eine homogene Verteilung der Kotprobe erreicht war. Im Anschluß erfolgte ein einminütiges Mischen auf dem Vortex (Vortex Genie 2, Scientific Industries, Inc., New York / USA). Nach 15min dauernder Sedimentation der groben Kotbestandteile wurde 2mL der Bakteriensuspension in 9mL LB-Bouillon (Carl Roth GmbH+Co.KG) gegeben. Es erfolgte eine Anreicherung über Nacht (18h) bei 37°C auf dem Schüttler.

Problematisch war bei diesem Verfahren jedoch die starke Verschleppung von Kotinhaltsstoffen in die Anreicherungsbouillon und schließlich auch die Kontamination der DNA mit denselben. Im Kot enthaltene Stoffe, beispielsweise Gallenfarbstoffe und Hämoglobine, wirken als PCR-Inhibitoren (Rossen et al., 1992). Aus diesem Grund wurde in der Hauptstudie ein anderes Verfahren (siehe Kapitel 3.2.3) angewandt, bei dem mit dem Tupfer aus der Kotprobe hauptsächlich die in der Kotprobenflüssigkeit enthaltenen Bakterien aufgenommen werden, während die anderen groben und feinen Bestandteile des Kotes weitestgehend in der Kotprobe belassen werden.

In einem Testlauf der PCR wurden zur Verringerung der im Kot enthaltenen PCR-Inhibitoren 2µL von 18 Proben mit 1µL *stx*-positiver DNA eines 1:1-Gemisches von den Referenzstämmen J1 und W34 angereichert und in verschiedenen Verdünnungen mit sterilem bidestilliertem Wasser mit den Primern MK1/2 (**Tabelle 16**) nach den Reaktionsbedingungen der **Tabelle 17** untersucht. Die verwendete Template-DNA wurde dabei einmal unverdünnt und zusätzlich in den Verdünnungen 1:1, 1:2, 1:4 und 1:8 eingesetzt. Eine Verdünnung von 1:4 erwies sich in diesen Testläufen als optimal, bei niedrigeren Verdünnungen wurden einige Proben als falsch negativ nachgewiesen. Bei der Verdünnung 1:8 wurden hingegen einige Proben bereits fälschlicherweise als negativ erkannt.

Das Ausstreichen der Voranreicherungsbouillon auf einer LB-Agarplatte (Carl Roth GmbH+Co.KG) mit dem Ziel des Wachstums von homogen verteilten, einzeln liegenden Kolonien in einer Größenordnung von 10^2 bis 5×10^2 nach einer Inkubation von 18h bei 37°C stellte aufgrund der in den Anreicherungsbouillons enthaltenen verschiedenen Keimzahlen ein Problem dar. Testweise wurden von 25 Proben 100µL verschiedener Verdünnungen der Anreicherungsbouillon (unverdünnte Bouillon, 1×10^1 , 1×10^2 , 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8) mit dem Drigalski-Spatel ausgestrichen. Während bei der unverdünnten Bouillon bis zu der Verdünnung 1×10^3 regelmässig ein Rasen-Wachstum auftrat, wuchsen bei den Verdünnungen 1×10^7 und 1×10^8 nicht immer ausreichend Kolonien. Zur Absicherung des Vorhandenseins einer angezüchteten Agarplatte mit der gewünschten Kolonienzahl und -verteilung nach der Inkubation wurden drei LB-Agarplatten vorbereitet. Der Auftrag von jeweils 100µL der Verdünnungen 1×10^5 und 1×10^6 , mit einer zusätzlichen Abstufung von 50µL der 1×10^5 Verdünnung, erwiesen sich als optimal.

3.2.2 Referenzstämme

Die verwendeten Referenzstämme stellte freundlicherweise das Nationale Referenzlabor für *Escherichia coli* (BfR, Berlin) zur Verfügung.

Die in **Tabelle 14** aufgeführten Stämme dienten als Referenz für die jeweilige PCR, der Herstellung der Sonden und für die Koloniehybridisierung. Sie wurden entweder auf LB-Agarplatten (Carl Roth GmbH+Co.KG) oder in LB-Bouillon (Carl Roth GmbH+Co.KG) kultiviert und im Anschluss im Kühlschrank bei 4°C gelagert oder in Mikrobank®- Röhrchen (Inverness Medical Deutschland, Köln) bei -70°C tiefgefroren aufbewahrt.

Tabelle 14: Referenzstämme, Verwendung für die PCR und die Koloniehybridisierung (Cebula et al., 1995; Karch und Meyer, 1989; Schmidt et al., 1994a; Schmidt et al., 1994b)

BfR-Nummer	Herkunft	vorh. Virulenzgene	Serovare	Referenzstamm für folgende Primer
C 600	<i>E. coli</i> K-12		Or:H48	Negativ-Kontrolle
J 1	<i>E. coli</i> K-12	<i>stx</i> ₁	Or:H48	LP 30/31
W 34	<i>E. coli</i> K-12	<i>stx</i> ₂	Or:H48	LP 43/44
Aberdeen	<i>E. coli</i> WT	<i>eae</i>	O55	SK 1/2
CB 4270	<i>E. coli</i> WT	<i>eae</i> , <i>hly</i> _{EHEC}	O157:H7	hly A 1/4

3.2.3 Anreicherung der Proben

Die gewonnenen Kotproben wurden schnellstmöglich weiterverarbeitet. Dazu wurde ein steriler Tupfer verwendet und drei bis fünf Mal in die Kotprobe getaucht, so dass er sich vollständig mit Kotwasser füllen konnte. Dieser benetzte Tupfer wurde dann in ein Reagenzglas mit 2mL PBS gegeben und 1min auf dem Vortex gemischt. Von dieser Suspension wurden 50µL in ein mit 3mL LB-Bouillon gefülltes Reagenzglas gegeben und über Nacht bei 37°C auf einem Schüttler mit 150 rpm bebrütet.

3.2.4 DNA-Isolierung aus den Proben

Der Übernachtkultur wurde 1mL angereicherte Bakteriensuspension entnommen und in 1,5mL große Reaktionsgefäße überführt. Die Bakterien wurden zunächst durch Zentrifugation (1min, 14.000 rpm, RT) von der Nährbouillon separiert und im Anschluss – nach Verwerfen des Überstandes – dreimalig mit jeweils 1mL bidestilliertem Wasser gewaschen, um die im Kot und in der Anreicherungsbouillon enthaltenen PCR-Inhibitoren zu entfernen. Danach erfolgte eine erneute Zentrifugation nach oben

genanntem Protokoll, verbunden mit einem wiederholten Verwerfen des Überstandes. Im Anschluss wurde das Pellet in 200µL bidestilliertem Wasser resuspendiert und 20 Minuten im Wasserbad gekocht, wobei nach 10 Minuten für eine 3 minütige Ultraschall-Lyse unterbrochen wurde. Unmittelbar danach erfolgte eine erneute Zentrifugation unter oben genannten Bedingungen. Der Überstand wurde nun in ein neues Reaktionsgefäß überführt, 1:4 mit bidestilliertem Wasser verdünnt und stand für die Screening-PCR zur Verfügung.

3.2.5 Screening-PCR

Zur Identifikation der Kotproben, die STEC enthalten, wurde eine Screening-PCR jeder Probe durchgeführt. Das verwendete Primerpaar MK1 und MK 2 (Karch und Meyer, 1989) stellt degenerierte Primer mit Wobble-Basen (bei MK1 drei Wobble-Basen, bei MK2 zwei Wobble-Basen) in den hoch konservierten Regionen des *stx*-Gens dar, so dass mit diesen Primern verschiedene Sequenzen von STEC mit unterschiedlichen Toxintypen nachgewiesen werden können. Sie weisen jedoch mindestens 90% Ähnlichkeit mit den verschiedenen Toxinsequenztypen auf. Mit diesen Primern werden alle *stx*₁- und *stx*₂-Subtypen bis auf *stx*_{2f} erfasst (Karch und Meyer, 1989; Leung et al., 2003; Schmidt et al., 2000).

Die Reaktionsansätze (15 μ L) zur Amplifikation der DNS-Sequenzen bestanden aus den in **Tabelle 15** genannten Reagenzien.

Tabelle 15: Eingesetzte Substrate für die PCR

Reagenzien	Hersteller	Inhalt	Menge
DyNAzyme-II-PCR Mastermix	Finnzymes Oy (Espoo, Finnland)	- DyNAzyme-II-DNA-Polymerase (rekombinante <i>Thermus brockianus</i> - Polymerase) - 2xDyNAzyme PCR-Puffer (1.5 mM MgCl ₂) - 400 μ M jeder Desoxyribonukleinsäure	7,5 μ L
jeweiliger Primer	Eurofins MWG Operon (Ebersberg)		30pM
steriles bidestilliertes Wasser	Milipore Milli-Q UF plus (Schwalbach)		3,9 μ L
Template-DNA			3 μ L

mM: Millimol

μ M: Mikromol

μ L: Mikroliter

pM: Picomol

In **Tabelle 16** und **Tabelle 17** sind alle in dieser Arbeit verwendeten Primer, ihre Genspezifitäten und die Reaktionsbedingungen für die PCR aufgeführt.

Tabelle 16: Angaben zu den verwendeten Primern zum Nachweis der verschiedenen Virulenzfaktoren

Primer-Bez.	Primersequenz (5´-3´)	Länge (bp)		Ziel	Länge des Produkts		Referenz
MK 1	TTT ACG ATA GAC TTC TCG AC	20		stx	227 (stx ₁)	Karch und Meyer, 1989	
MK 2	CAC ATA TAA ATT ATT TCG CTC	21			224 (stx ₂)		
LP 30	CAG TTA ATG TGG TGG CGA AGG	21		stx _{1A}	348	Cebula et al., 1995	
LP 31	CAC CAG ACA ATG TAA CCG CTG	21					
LP 43	ATC CTA TTC CCG GGA GTT TAC G	22		stx _{2A}	584	Cebula et al., 1995	
LP 44	GCG TCA TCG TAT ACA CAG GAG C	22					
SK 1	CCC GAA TTC GGC ACA AGC ATA AGC	24		eae	863	Schmidt et al., 1994b	
SK 2	CCC GGA TCC GTCTCG CCA GTA TTC G	25					
hly A 1	GGT GCA GCA GAA AAA GTT GTA A	22		EHEC-hlyA	1551	Schmidt et al., 1994a	
hly A 4	TCT CGC CTG ATA GTG TTT GGT A	22					

bp: Basenpaare

Tabelle 17: Reaktionsbedingungen der PCR zum Nachweis der verschiedenen Virulenzfaktoren

Gen	Primer	Anzahl der Zyklen	Denaturierung	Annealing	Elongation
<i>stx</i>	MK 1 MK 2	1	94 °C, 210s	43 °C, 180s	72 °C, 240s 72 °C, 300s
		30	94 °C, 90s		
		1			
<i>stx_{1A}</i>	LP 30 LP 31	1	94 °C, 90s	64 °C, 90s	72 °C, 90s 72 °C, 180s
		30	94 °C, 90s		
		1			
<i>stx_{2A}</i>	LP 43 LP 44	1	94 °C, 90s	64 °C, 90s	72 °C, 90s 72 °C, 180s
		30	94 °C, 90s		
		1			
<i>eae</i>	SK 1 SK 2	1	94 °C, 60s	52 °C, 60s	72 °C, 90s 72 °C, 180s
		30	94 °C, 60s		
		1			
<i>hly_{EHEC}</i>	hly A 1 hly A 4	1	94 °C, 90s	57 °C, 60s	72 °C, 120s 72 °C, 180s
		30	94 °C, 60s		
		1			

Referenz: Cebula et al. (1995), Karch und Meyer (1989); Schmidt et al. (1994a; 1994b)

Die Amplifikate wurden im Anschluss bis zur weiteren Verwendung bei 4°C oder aber bei einer Lagerungsdauer von über 24h bei -20°C aufbewahrt. Die Analyse der PCR-Produkte erfolgte durch Auftrennung per Agarosegel-Elektrophorese. Hierbei wurde eine der Größe des Amplifikats entsprechende Gelkonzentration gewählt. Produkte bis zu 600bp wurden in die Taschen eines 1,5%igen Gels gefüllt, größere Amplifikate auf einem 1%igen Gel untersucht. Das Gel wurde aus LE-Agarose (Biozym Scientific GmbH), 230mL 0,5xTBE-Puffer (44,5 mM Tris-HCl, 44,5 mM Borsäure, 1 mM EDTA) bei Gelkammer 1 (ComPhor Maxi MT, Biozym Scientific GmbH), bzw. 345mL 0,5xTBE-Puffer bei Gelkammer 2 (PerfectBlue™ Breitformat-Gelsystem Maxi ExW, PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen) und 14µL bzw. 18µL Ethidiumbromid (Carl Roth GmbH+Co.KG) hergestellt. Nach dem Festwerden des Gels wurde es in der entsprechenden mit 0,5xTBE-Puffer gefüllten Gelkammer platziert. Die 15µL des Reaktionsansatzes wurden mit 3µL Ladepuffer RotiLoad DNA (mit Glycerin) (Carl Roth GmbH+Co.KG) vermischt und je 10µL des Gemisches in eine Tasche gegeben. Als Längenstandard wurde je nach Amplifikatslänge der PuC19-Längenstandard (bis 600bp) oder der 1kb-DNA-Ladder, extended (beide Carl Roth GmbH+Co.KG) verwendet. Nach einer Laufzeit von 50min bei 200V und 80mA wurden die Gele unter UV-Licht der Wellenlänge 302nm untersucht und fotografiert (Molecular Imager Gel Doc Systems, Bio-Rad Laboratories GmbH, München) sowie mit der GelDoc-Funktion des Programms „Quantity One-Analysis Software“ (Bio-Rad Laboratories GmbH) ausgewertet.

Bei den Proben, deren Banden sich bei der Auswertung der PCR als deutlich *stx*-positiv darstellten, erfolgte im Anschluss eine Koloniehybridisierung, die es ermöglichte, die STEC-Kolonien aus der umfangreichen Kotflora zu isolieren.

3.2.6 Koloniehybridisierung

Die Koloniehybridisierung stellt eine elegante Methode zur Isolierung *stx*-positiver Kolonien dar (Bülte, 1991; Gallien et al., 1996; 1999). Die Übertragung des Koloniematerials erfolgt hierbei durch ein Abklatschverfahren von einer mit Einzelkolonien bewachsenen Agarplatte auf eine Nylonmembran. Anschließend an einige Denaturierungsschritte wird eine mit Digoxigenin markierte Sonde hinzugegeben. Die Sonde bindet an *stx*-codierende Genabschnitte des Bakteriengenoms, die in der Nylonmembran gebunden sind, und kann im weiteren Untersuchungsverlauf über eine Antikörperreaktion gegen das Digoxigenin und eine Farbreaktion sichtbar gemacht werden. Die farblich markierten Bereiche werden mit der abgeklatschten Agarplatte in Deckung gebracht, so dass die *stx*-positiven Einzelkolonien isoliert und einzeln weiter untersucht werden können.

3.2.6.1 Sondenherstellung

Die benötigten Polynukleotidsonden wurden mit Hilfe des Markierungskits der Firma Roche Diagnostics GmbH, Mannheim per PCR-Labeling synthetisiert. Als Marker diente Digoxigenin-11-2'-desoxyuridin-5'-triphosphat (DIG-11-UTP), welches in der Amplifikationsreaktion der PCR zum Teil anstatt Thymin eingebaut wird. Die Reaktion wurde entsprechend den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Zur Kontrolle wurden eine nichtmarkierte Probe und eine Labelling-Test-Probe mit standardisierter DNA mitgeführt.

Der Erfolg der Labelling-Reaktion wurde durch das verlangsamte Laufverhalten bei der Gelelektrophorese und durch eine Kontrollhybridisierung eines jeweils positiven Referenzstammes überprüft. Im Anschluss wurden die Banden aus dem Low-Melting-Agarosegel (Biozym GP Plaque Agarose Low Melting, Biozym Scientific GmbH) ausgeschnitten und vor der Zugabe zu DigEasyHyb einmalig für 5min aufgeköcht. Die Sonden MK1 und MK 2 wurden jeweils mit Hilfe des *stx*₁-positiven Stammes J1 und des *stx*₂-positiven Stammes W34 hergestellt und im Anschluss als Mix eingesetzt.

Als PCR-Protokolle zur Sondenherstellung wurden die auch bei der Screening-PCR und den Charakterisierungs-PCRs verwendeten Cyclo-Programme (**Tabelle 17**) genutzt.

3.2.6.2 Durchführung der Koloniehybridisierung

Die Koloniehybridisierung erfolgte als Kolonie-Blot einer mit *E. coli*-Kolonien bewachsenen Agarplatte. Die Bakterienkolonien wurden mittels Replika-Technik auf eine Nylonmembran übertragen.

Vor der Koloniehybridisierung wurden zunächst 50µL und 100µL einer 10⁻⁵-Verdünnung und 100µL einer 10⁻⁶-fachen Verdünnung auf einer LB-Agarplatte ausgespatelt und bebrütet (18h, 37°C). Zusätzlich wurde eine LB-Agarplatte mit den Kontrollstämmen J1, W34 und C600 beimpft und bei der gesamten Vorbereitung und Koloniehybridisierung mitgeführt. Am nächsten Morgen wurden Platten ausgewählt, die verteilte, einzeln liegende Kolonien in einer Größenordnung von 10² bis 5x10² aufwiesen. Nach einer halbstündigen Kühlung wurde auf jede Agarplatte eine Nylonmembran (Roche Diagnostics GmbH) luftblasenfrei aufgelegt, eine Minute anhaften gelassen, die Orientierung der Membran zur Agarplatte gekennzeichnet und im Anschluss der Filter vorsichtig abgelöst. Die Membran wurde nun nach Protokoll des Herstellers behandelt. Zunächst wurden die Bakterienzellen zweifach in einem 1xDenaturierungspuffer (0,5M NaOH, 1,5M NaCl, 15min) lysiert. Es erfolgte eine Neutralisation mit 1xNeutralisationspuffer (1,5M NaCl, 1M Tris-HCl, pH 7,4 (RT) für 15min) und eine Äquilibrierung der Membran mit 2xSSC-Puffer (300 mM NaCl, 30 mM Natriumcitrat, pH 7,0, RT, 10min). Die Fixation der DNA an der Membran erfolgte per Stratalinker® UV Crosslinker mit 1200mJ (Stratagene, La Jolla / USA). Zur Beseitigung der Zelltrümmer schloss sich eine Behandlung mit 2xSSC verdünnter Proteinase K (Roche Diagnostics GmbH) für die Dauer einer Stunde und ein Abstreifen der verbliebenen Zellreste auf befeuchtetem Filterpapier an. Nach dieser Behandlung waren die Membranen bereit für die Hybridisierung.

Nach einer einstündigen Prähybridisierung (42°C, 6 rpm) mit DigEasyHyb-Lösung (Roche Diagnostics GmbH) wurde die ebenfalls in DigEasyHyb gelöste, vorher für 5min auf 68°C erwärmte Sonde zu den Membranen in den Hybridisierungskubator gegeben und über Nacht (18h, 42°C, 6 rpm) inkubiert.

Die Waschschritte zur Ablösung der unspezifischen Bindungen der Sonden erfolgten zweimalig mit dem Low-Stringency-Waschpuffer 1 (2xSSC / 0,1%SDS) (5min, RT) und zweimalig mit dem High-Stringency-Waschpuffer 2 (0,1xSSC / 0,1%SDS) (15min, 68°C). Danach wurden die Nylonmembranen aus den Rohrflaschen des Hybridisierungskubators genommen und jeweils in eine Petrischale gelegt.

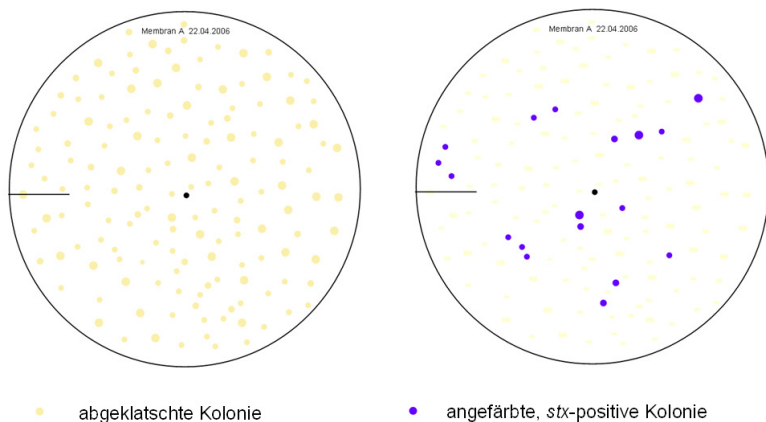
Der immunologische Nachweis der positiven Kolonien erfolgte mit dem Washbuffer-Set (Roche Diagnostics GmbH), ovinen Anti-Digoxigenin-Alkalische-Phosphatase-gekoppelten Antikörpern (Roche Diagnostics GmbH) und der chromogenen Reaktion von Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT) und 5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat (BCIP) (Roche Diagnostics GmbH) nach Anweisung des Herstellers. Zunächst wurden mit einem Blockpuffer unspezifische Bindungen abgesättigt und dann die (Anti-Digoxigenin-haltige, Alkalische-Phosphatase-gekoppelte) Antikörperlösung auf die

Membran gegeben. Nicht oder unspezifische gebundene Antikörper wurden in den nächsten beiden Schritten durch zweimalige Waschung mit dem 1xRoche Waschpuffer entfernt. Im nächsten Schritt wurde die Mischung aus NBT und BCIP mit 1xDetektionspuffer (0,1M Tris-HCl, 0,1M NaCl, pH 9,5, RT) verdünnt und auf die Membran gegeben.

Das Abstoppen der Farbreaktion erfolgte je nach Farbentwicklung nach 3-4h durch vierfaches Waschen mit 1xTE-Puffer (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8,0, RT). Zur Aufbewahrung der Membranen wurde ebenfalls 1xTE-Puffer verwendet.

3.2.6.3 Isolierung der *stx*-positiven Kolonien

Die beim Abklatschen der Agarplatte erfolgte Markierung der Orientierung der Nylonmembran ermöglicht es, die durch violettfarbenen Niederschlag markierten Regionen der Membran den Bakterienkolonien auf der Agarplatte zuzuordnen. Durch die helle Farbe und relative Transparenz des LB-Agars konnten die Membran und die Referenz-Agarplatte übereinander gelegt werden und die als *stx*-positiv nachgewiesenen Kolonien mit einer Impfnadel abgenommen werden.



Der Punkt in der Mitte und die Markierung an der linken Seite dienen der Orientierung.

Abbildung 7: Nylonmembran nach dem Kolonielift (links) von einer LB-Agarplatte mit abgeklatschtem Koloniematerial (gelb) und nach der Kolonie-Hybridisierung (rechts) mit der DIG-markierten Sonder MK 1/2 nach Karch und Meyer (1989), über eine Farbreaktion werden *stx*-Abschnitte in den Kolonien detektiert (violette Punkte)

Die so erhaltenen Reinkulturen *stx*-positiver Bakterien wurden in ein Reagenzglas mit 2mL LB-Bouillon überführt, kurz auf dem Vortexer gemischt und über Nacht (18h, 37°C) auf dem Schüttler bebrütet. Diese Isolate wurden im Anschluss auf Microbank® (Inverness Medical Deutschland) archiviert.

3.2.7 Konservierung der Isolate

Zur Archivierung der gewonnenen Isolate wurden 20µL aus der Übernachtskultur in LB-Bouillon entnommen und in ein Mikrobank®-Gefäß (Inverness Medical Deutschland) überführt. Nach Herstellerangaben wurde das Röhrchen vier bis fünf Mal geschwenkt, der Flüssigkeitsüberstand abgesogen und das Gefäß bei -70 °C eingelagert.

3.2.8 Charakterisierung der Isolate

Zur weiteren Untersuchung auf zusätzlich Virulenzfaktoren wurden die auf Microbank® (Inverness Medical Deutschland) archivierten Isolate wiederum in 2mL LB-Bouillon angezüchtet und einer PCR zur Überprüfung des Vorhandenseins von *stx*, *eae* und *EHEC-hly_A* unterzogen.

3.2.8.1 PCR zur Charakterisierung

Zur Erstellung eines Virulenzprofils wurden alle Isolate per PCR untersucht. Dafür wurden die Primer LP30/31, LP43/44, Hly A1/4 und SK1/2 (siehe **Tabelle 16**) nach den Programmen eingesetzt, die in **Tabelle 17** aufgeführt sind. Die DNA wurde wie in Kapitel 3.2.4 beschrieben hergestellt. Zusätzlich zu den bisher verwendeten Kontrollstämmen J1, W34 und C600 wurden nun noch der *eae*- und *hly_{EHEC}*-positive Stamm CB 4270 und der *eae*-positive Stamm Aberdeen als Positiv-Kontrolle in der PCR mitgeführt. Die Auswertung erfolgte wie in Kapitel 3.2.5 dargestellt.

3.2.9 Weitere durchgeführte Untersuchungen

Tiere, die bei mindestens vier Probenahmen in Folge und bei mehr als der Hälfte ihrer Proben *stx*-positiv waren, wurden als kontinuierlich ausscheidende Tiere definiert. Von den kontinuierlich ausscheidenden Tieren gewonnene STEC-Isolate wurden aufgrund ihres Virulenzprofils gruppiert und jeweils ein Stamm der Virulenzmustergruppe wurde weiteren Untersuchungen unterzogen. Eine Überprüfung der Serovarzugehörigkeit und der Stoffwechselaktivität wurde vorgenommen.

3.2.9.1 Serotypisierung

Die Serotypisierung der 70 ausgewählten STEC-Isolate wurde freundlicherweise vom Nationalen Referenzzentrum für *Salmonella* und andere bakterielle Enteritiserreger des Robert Koch-Instituts (Wernigerode) übernommen und nach folgendem Schema durchgeführt:

In Anlehnung an die ersten Serotypisierungsprotokolle von Ørskov et al. (1984) erfolgte die Agglutination mit spezifischem hyperimmunem Kaninchenserum in Mikrotiterplatten. Zur Bestimmung der O-Antigene wurden die Isolate zunächst mit gepoolten Antiseren gegen 177 O-Antigene in 96-Well-Mikrotiterplatten (Greiner Bio One GmbH, Frickenhausen) über Nacht bei 50°C inkubiert, Agglutinationsreaktionen zeigten sich in Form einer großflächigen Trübung. Bei positiver Reaktion wurde das Isolat mit den den Poolseren entsprechenden Einzelseren ebenfalls über Nacht bei 50°C inkubiert und zusätzlich mit den positiven Einzelseren in verschiedenen Verdünnungen titriert. Für die Bestimmung der H-Antigene wurde zur Erlangung voll beweglicher Isolate wiederholt über Nacht bei 37°C in U-Rohren mit semisolidem Schwärmagar angezüchtet. Nach mehrfachem Wachstum im gesamten U-Rohr wurden die Bakterien mit 1% PBS-Formalin-Lösung abgetötet und wie bereits für die O-Antigene beschrieben mit gepoolten und einzelnen H-Antiseren gegen 53 H-Antigene getestet (Prager et al., 2003; Robert Koch-Institut, 2004c).

Die entsprechenden hyperimmunen O- und H-Antiseren vom Kaninchen wurden im Nationalen Referenzzentrum für *Salmonella* und andere bakterielle Enteritiserreger in Anlehnung an die Protokolle von Ørskov et al. (1984) selbst hergestellt.

3.2.9.2 Untersuchung auf Sorbitol-Fermentation

Die 70 ausgesuchten Isolate wurden ebenfalls auf ihr Vermögen der Sorbitol-Fermentation innerhalb von 24h bei 37°C geprüft.

Zu diesem Zweck wurden jeweils eine Perle der auf Mikrobank® (Inverness Medical Deutschland) archivierten Stämme in 2mL LB-Bouillon über 18h, bei 37°C auf dem Schüttelinkubator bei 150 rpm angezüchtet. Am nächsten Morgen wurden die Übernachtskulturen auf SMAC (Sorbitol-MacConkey)-Agar (Oxoid Deutschland GmbH, Wesel) dreifach fraktioniert ausgestrichen und wiederum inkubiert (37°C). Nach 24-stündigem Wachstum wurde die Farbe der Kolonien beurteilt. Kolonien mit der Fähigkeit der Sorbitol-Fermentation erscheinen pink-farben, solche denen diese Fähigkeit fehlt weiß-opaque.

3.2.10 Statistische Analyse

Die deskriptive Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit dem Microsoft Office-Programm Excel® (Windows 2003). Eine statistische Analyse der Daten wurde mit dem Programmpaket SAS® (Version 9.1; SAS Institute Inc, Cary, NC, USA) und der Prozedur „Logistic“ in Form eines logistischen Regressionsmodell unter Berechnung von Chancenverhältnissen (Odds-Ratio) mit ausschliesslich kategorialen Variablen durchgeführt. Unter Odds wird der Quotient aus der Wahrscheinlichkeit, dass ein Ereignis eintritt und der Wahrscheinlichkeit, dass es nicht eintritt (Gegenwahrscheinlichkeit) verstanden. Um Unterschiede zweier Odds für ein Ereignis zu bewerten und damit Aussagen über die Stärke von Zusammenhängen zu machen, wird das Verhältnis zweier Odds (Odds-Ratio) verwendet. Die Odds-Ratio ist demzufolge ein Assoziationsmaß für zwei kategoriale Variablen. Die Anwendung erfolgt mit dem Ziel, die Assoziation eines Risikofaktors mit einer bestimmten Erkrankung zu bestimmen.

3.2.10.1 Modellbildung mit den Ergebnissen der Screening-PCR (Modell1)

Zur Analyse der Ergebnisse der Screening-PCR wurde folgendes Modell zu Grunde gelegt:

$$\text{logit}(p(y=1/0)) = \beta_0 + \beta_1 (\text{MON}) + \beta_2 (\text{REG}) + \beta_3 (\text{FRM}) + \beta_4 (\text{LNR}) + \beta_5 (\text{LTG}) + \beta_6 (\text{KAT})$$

mit $\text{logit}(p(y=1/0)) =$ Odds des Ergebnis der Screening-PCR für den Fall $y=1$ ($1=\text{stx-positiv}$), entspricht $\ln(p(y=1) / p(y=0))$

β_0, \dots, β_6	=	Regressionskoeffizienten
MON	=	Probenahmemonat (1-12)
REG	=	Region des Betriebes (1-3)
FRM	=	Bewirtschaftungsform des Betriebes (1,2)
LNR	=	Anzahl absolvierter Laktationen in Klassen (1-3)
LTG	=	Laktationstagsklassen je 50 Laktationstage (1-9)
KAT	=	Anwesenheit eines identifizierten kontinuierlich ausscheidenden Tieres im Betrieb (0,1)

Als abhängige Variable y floss in das Modell der logistischen Regression der Nachweis von stx im Kot mittels der Screening-PCR mit den Primern MK1/2 ein. Unabhängige Variablen waren der Probenahmemonat MON, die Region REG und die Bewirtschaftungsform des Betriebes FRM, sowie die wie bereits erläutert klassierten Anzahlen absolvierter Laktationen LNR und der Laktationstag LTG, der in Klassen von jeweils 50 Tagen zusammengefasst war, wobei Gruppe 8 alle Tiere mit mehr als 350 Laktationstagen und Gruppe 9 alle trocken stehenden Tiere beinhaltete. Zusätzlich beinhaltete das Modell die Anwesenheit eines in dieser Studie als kontinuierlich ausscheidend identifizierten Tieres KAT.

Aufgrund des geringen Stichprobenumfanges wurden weitere Variablen, die vom LKV zur Verfügung gestellt oder im Falle des Gesundheitszustandes und des BCS selbst erhoben wurden, nur jeweils einzeln mit dem Modell geschätzt.

3.2.10.2 Modellbildung mit den Kühen, bei denen eine STEC-Isolierung aus den Kot gelang (Modell 2)

Zur Analyse der Ergebnisse der STEC-Isolierung wurde hingegen ein modifiziertes Modell verwendet:

$$\text{logit}(p(y=1/0)) = \beta_0 + \beta_1 (\text{QTL}) + \beta_2 (\text{REG}) + \beta_3 (\text{FRM}) + \beta_4 (\text{LNR}) + \beta_5 (\text{LTG}) + \beta_6 (\text{KAT})$$

mit	$\text{logit}(p(y=1/0)) =$	Odds des Ergebnis der Screening-PCR für den Fall $y=1$ ($1=\text{stx-positiv}$), entspricht $\ln(p(y=1) / p(y=0))$
	β_0, \dots, β_6	= Regressionskoeffizienten
	QTL	= Quartal der Probenahme (1-4)
	REG	= Region des Betriebes (1-3)
	FRM	= Bewirtschaftungsform des Betriebes (1,2)
	LNR	= Anzahl absolvierter Laktationen in Klassen (1-3)
	LTG	= Laktationstagsklassen je 50 Laktationstage (1-9)
	KAT	= Anwesenheit eines identifizierten kontinuierlich ausscheidenden Tieres im Betrieb (0,1)

In dieses Modell wurde als abhängige Variable y wiederum das Ergebnis der Untersuchung auf STEC ein, jedoch wurden bei diesem Modell nur die Tiere als positiv gewertet, von denen die Isolierung von STEC aus dem Kot gelang. Als unabhängige Variablen gingen hier ebenfalls die Region REG und die Bewirtschaftungsform des Betriebes FRM als Codierung für die einzelnen Betriebe ein, weiterhin die wie bereits beschrieben gruppierte Anzahl absolvierter Laktationen LNR und der Laktationstag LTG, der wiederum in Klassen von jeweils 50 Tagen zusammengefasst war. Aufgrund der ungünstigeren Verteilung der Ergebnisse STEC-positiv/STEC-negativ musste für eine korrekte Ausführung der Analyse durch das Programm SAS® der Probenahmemonat lediglich als Quartal QTL in das Modell eingeführt werden. Die Monate Februar, März und April bildeten dabei das erste Quartal, Mai, Juni und Juli das zweite, August, September und Oktober das dritte, sowie November, Dezember und Januar das vierte Quartal. Die zusätzlichen Variablen wurden – ebenso wie bei dem vorherigen Modell – jeweils nur einzeln mit dem Modell durchgerechnet. Auch in diesem Modell wurde die Anwesenheit eines kontinuierlich ausscheidend identifizierten Tieres KAT_n berücksichtigt.

3.2.10.3 Zusätzliches Datenmaterial

Der Landeskontrollverband übermittelte für die Probestiere über den gesamten Probenahmezeitraum die bei der monatlichen Milchprüfung erfassten Daten über die Milchmenge in Kilogramm, den Eiweiss- und Fettgehalt der Milch, sowie den Laktosegehalt in Prozent, den Milchharnstoffgehalt (mg/L) und die Anzahl der in der Milch enthaltenen somatischen Zellen pro Mililiter Milch, sowie den pH-Wert der Milch. Eine Auswertung der Daten fand jeweils im Vergleich zu den in der Literatur als optimal empfohlenen Werten statt (**Tabelle 18**). Eine Einteilung erfolgte mit wenigen Ausnahmen in Gruppe 1, welche Tiere mit Werten unterhalb des Optimums beinhaltete. Gruppe 2 enthielt die Kühe mit Werten im optimalen Bereich, während Gruppe 3 die Tiere beinhaltete, deren Werte oberhalb des Optimums lagen. Lediglich beim Zellgehalt, bei dem niedrigste Werte optimal sind, und beim pH-Wert boten sich Einteilungen in nur zwei Klassen an. Die Eingruppierung in Bezug auf den Fettgehalt wurde mit engeren Grenzen vorgenommen, da die vorgegebenen Grenzen von 2,9-5,0% Fettgehalt nahezu die gesamte Variation abdeckten.

Tabelle 18: Normwerte der Variablen, die vom Landeskontrollverband zur Verfügung gestellt wurden und ihre Klasseneinteilung für die statistische Auswertung

Variable	Klasse 1	Norm (Klasse 2)	Klasse 3
Zellgehalt (/mL Milch)	-	<100.000 ¹	≥100.000
Eiweißgehalt (in Prozent)	<3,00	3,00-3,80 ¹	>3,80
Fettgehalt (in Prozent)	<3,50	3,50-3,80 ² (2,9-5,0 ¹)	>3,80
Laktosegehalt (in Prozent)	<4,7	4,7-5,0 ¹	>5,0
Harnstoffgehalt (mg/L)	<150	150-300 ¹	>300
pH-Wert	<6,6	6,6-6,7 ¹	>6,7

Klasse 1: liegt unterhalb der Normwerte

Klasse 2: beinhaltet die Normwerte

Klasse 3: liegt oberhalb der Normwerte

¹ Referenz Normwerte: Grabowski (2000)

-: Klasse nicht vorhanden

²: aufgrund der weiten Variation der prozentualen Fettgehalte innerhalb der Norm wurde zur Auswertung eine engere Klassifizierung für dieses Merkmal vorgenommen

Eine Eingruppierung der Kühe aufgrund ihrer Milchleistung erfolgte ebenfalls in drei Leistungsgruppen, sowie einer Gruppe, die die trocken stehenden Tiere beinhaltete. Dies sind die in der Regel ab etwa acht Wochen präpartal aufgrund der bevorstehenden Kalbung nicht mehr gemolkene Kühe. Sie befinden sich in der Trockensteherperiode, ihr vom LKV mitgeteilter Status ändert sich in der Folge in „Trocken“. Für die Beurteilung der Milchleistung wurde für jeden Betrieb zu jedem 50 Tage beinhaltenden Laktationsabschnitt die mittlere Milchleistung bestimmt. Tiere, die nach oben und unten nicht mehr als zehn Prozent von diesem Mittel abweichen gelten als Tiere mit durchschnittlicher Milchleistung. Übersteigt die Milchleistung das Betriebs-

und Laktationsstadien-bedingte Mittel um mehr als zehn Prozent, so gilt das Tier als hochleistend. Liegt die Milchleistung der Kuh unter mehr als zehn Prozent unter der für sie geltenden mittleren Leistung, wird sie als niedrigleistend definiert.

Weiterhin wurde im Rahmen der bereits erwähnten Studie (Kemper, 2007) die Körperkondition der Probestiere als objektiverer Body-Condition-Score (BCS) erhoben. Bei einer Skala von 1,0 bis 5,0 mit Viertelpunkt-Stufen wurde ein BCS von 2,75 bis 3,75 ohne Einbeziehung des Laktationsstadium als optimal betrachtet, davon nach unten und oben abweichende BCS-Werte können über Stoffwechselbelastungen einen negativen Einfluss auf die Leistung der Kuh ausüben (Fritze, 2003). Diese Tiere wurden somit in einer zweiten Gruppe den Kühen mit optimalem BCS gegenübergestellt. Weiterhin erfolgte ein Vergleich der STEC-Ausscheideraten von Kühen mit niedrigerem BCS (<3,50) mit Kühen mit höheren BCS-Noten. Ebenfalls In Rahmen der oben genannten Studie wurde der Gesundheitszustand jeder beprobten Kuh bei jedem Probesternumfassend beurteilt (**Tabelle 19**).

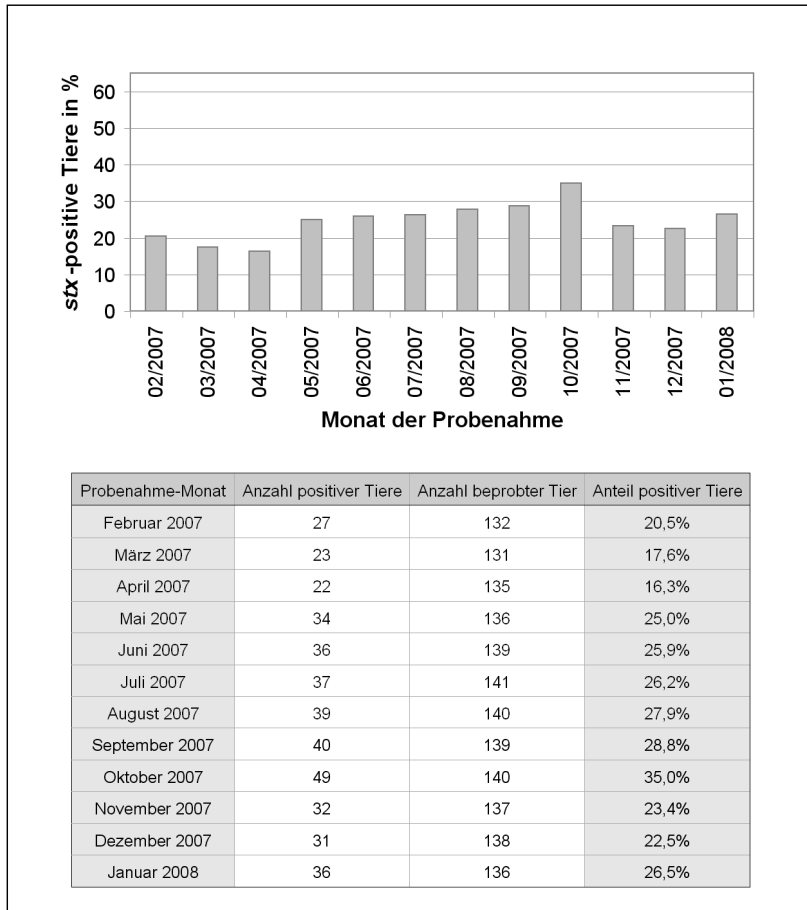
Ein Ergebnis mit $p < 0,001$ wurde als höchst signifikant bezeichnet und mit **** abgekürzt. Bei einem p-Wert $< 0,01$ war es hoch signifikant (***) und bei $p < 0,05$ signifikant (**). Als Tendenz wurden Ergebnisse mit $p \leq 0,10$ (*) bezeichnet. Ergebnisse mit p-Werten $> 0,10$ wurden als nicht signifikant (n.s.) angegeben.

Tabelle 19: Erhobene Variablen zur Beurteilung des Gesundheitszustandes der Probenkühe

Variable	Beispiele
Lahmheit	<ul style="list-style-type: none"> – Lahmheit – aufgewölbter Rücken – Probleme beim Aufstehen
Fehlstellungen der Gliedmaßen	<ul style="list-style-type: none"> – Kuhhessigkeit – Bockklauen
weitere Erkrankungen der Gliedmaßen	<ul style="list-style-type: none"> – Klauenverletzung – assymetrische Bemuskelung
phänotyp. Auffälligkeiten des Euters	<ul style="list-style-type: none"> – Zwischenschenkelekzem – Euterasymmetrien – Fehlen von Strichen
Fruchtbarkeitsstörungen	<ul style="list-style-type: none"> – Endometritiden
Hauterkrankungen	<ul style="list-style-type: none"> – Trichophytie, Schwanzräude – Schürfwunden
Verdauungsstörungen	<ul style="list-style-type: none"> – Durchfall – Geruchsveränderung der Faeces – hoher Anteil unverdauten Futters in den Faeces
Stoffwechselerkrankungen	<ul style="list-style-type: none"> – „Festliegen“ – Acetongeruch – eingefallene Augen – Hypothermie
Verhaltensauffälligkeiten	<ul style="list-style-type: none"> – „Futterwerfen“
Liegeboxen-bedingte Technopathien	<ul style="list-style-type: none"> – Liegebeulen an den Gliedmaßen – Verletzungen am Rücken – „Knickschwanz“
Fressgitter-bedingte Technopathien	<ul style="list-style-type: none"> – Schürfwunden in der Nackenregion – Hautverdickungen/ Beulen im Nacken
sonstige Technopathien	<ul style="list-style-type: none"> – Hüfthöckerfraktur
Lungenfunktionsstörung	<ul style="list-style-type: none"> – Schweratmigkeit – Nasenausfluß – Hypertrophie der Interkostalmuskulatur

4 Ergebnisse

In dieser Studie wurden 1.646 Kotproben von 182 Milchkühen untersucht, wobei 133 der Tiere regelmäßig über den gesamten Zeitraum von zwölf Monaten beprobt wurden. Auf die 49 übrigen Kühe wurde bei nicht möglicher Beprobung des eigentlichen Probestieres, zum Beispiel bei Abgängen, ausgewichen. Von den untersuchten Proben waren 24,7% (407 Proben) bei der PCR mit den Primern MK1/2 (Screening-PCR) *stx*-positiv. Im saisonalen Verlauf zeigte sich, dass der Anteil mittels der Screening-PCR als *stx*-positiv nachgewiesenen Tiere in den Sommer-, Herbst und Wintermonaten mit Prävalenzen von 25,0% bis 35,0% höher war als im Frühjahr (16,3% bis 20,5%) (**Abbildung 8**).



Probenahme-Monat	Anzahl positiver Tiere	Anzahl beprobter Tier	Anteil positiver Tiere
Februar 2007	27	132	20,5%
März 2007	23	131	17,6%
April 2007	22	135	16,3%
Mai 2007	34	136	25,0%
Juni 2007	36	139	25,9%
Juli 2007	37	141	26,2%
August 2007	39	140	27,9%
September 2007	40	139	28,8%
Oktober 2007	49	140	35,0%
November 2007	32	137	23,4%
Dezember 2007	31	138	22,5%
Januar 2008	36	136	26,5%

Abbildung 8: Entwicklung der STEC-Prävalenzen bei den untersuchten Milchkühen von sechs Milchvieh-haltenden Betrieben (n=1.646) im saisonalen Verlauf bei monatlichem Untersuchungsrhythmus, der Nachweis erfolgte aus Kotproben mittels Screening-PCR nach Karch und Meyer (1989)

Von 140 Kühen, die regelmäßig und bei mehr als sechs Probenahmen getestet wurden, wurden 77 Tiere mit der Screening-PCR als *stx*-positiv identifiziert. Die gesamten 140 Probenkühe wurden zu Beginn der Studie ausgewählt, sieben dieser Tiere gingen jedoch aus dem Betrieb ab. Für diese Kühe musste ein Ersatz ausgewählt werden, die nun ausgewählten Kühe konnten aus diesem Grund nicht den gesamten Zeitraum beprobt werden. Die weiteren 133 Probenahme-Kühe wurden über den gesamten Zeitraum von zwölf Monaten kontinuierlich monatlich beprobt.

Von allen beprobten Tieren wurden insgesamt 1.416 Isolate mittels Koloniehybridisierung gepickt. Davon wiesen 1.105 ein oder mehrere *stx*-Gene auf und können somit als STEC bezeichnet werden. Daraus resultiert eine Rate der korrekten Zuordnung der bei der Koloniehybridisierung angefärbten Dots zu den aufgrund ihrer Lage ausgewählten Kolonien von 78,1%.

Von den isolierten STEC (n=1.105) waren über die Hälfte in der PCR *stx*₂-positiv (56,7%). Ein Drittel der Isolate (34,9%) trugen *stx*₁+*stx*₂ und lediglich 8,4% (93) besaßen den Virulenzfaktor *stx*₁. Als zusätzliche Virulenzfaktoren fanden sich bei 91 Isolaten (8,2%) *eae* und bei 862 Isolaten (78,0%) *EHEC-hly*_A (**Tabelle 20**).

Tabelle 20: Vorkommen von Virulenzfaktoren bei isolierten STEC, gewonnen per Koloniehybridisierung aus bovinen Kotproben, Charakterisierung mittels PCR (Cebula et al. (1995); Schmidt et al. (1994a; 1994b))

Virulenzfaktor	Anzahl <i>stx</i> -pos. Isolate	Anteil <i>stx</i> -pos. Isolate an n=1.105
<i>stx</i> ₁	93 / 1.105	8,4%
<i>stx</i> ₂	626 / 1.105	56,7%
<i>stx</i> ₁ + <i>stx</i> ₂	386 / 1.105	34,9%
<i>eae</i>	91 / 1.105	8,2%
<i>EHEC-hly</i> _A	862 / 1.105	78,0%

Besonders häufige Kombinationen bei den STEC-Isolaten waren der Besitz von *stx*₂ bzw. *stx*₁+*stx*₂ und *EHEC-hly*_A (434 Isolate, 39,3% bzw. 311 Isolate, 28,1%, **Tabelle 21**). Isolate mit diesen beiden Virulenzmustern stellten einen Anteil von mehr als zwei Drittel (67,3%, 745) der gesamten Isolate. Weitere 145 Isolate (13,1%) trugen als einzigen Virulenzfaktor *stx*₂. Andere Virulenzmuster traten eher vereinzelt und lediglich mit Anteilen von bis zu 5,1% auf.

Tabelle 21: Virulenzmuster der isolierten STEC, gewonnen per Koloniehybridisierung aus bovinen Kotproben, Charakterisierung mittels PCR (Cebula et al. (1995); Schmidt et al. (1994a; 1994b)), sortiert nach Häufigkeit des Auftretens

<i>stx</i> ₁	<i>stx</i> ₂	<i>eae</i>	<i>EHEC-hly</i> _A	Häufigkeit Virulenzmuster	Anteil der Isolate an n=1.105
-	+	-	+	434/ 1.105	39,3%
+	+	-	+	311/ 1.105	28,1%
-	+	-	-	145/ 1.105	13,1%
+	+	-	-	56/ 1.105	5,1%
-	+	+	+	43 / 1.105	3,9%
+	-	-	-	35/ 1.105	3,2%
+	-	-	+	33/ 1.105	3,0%
+	-	+	+	24 / 1.105	2,2%
+	+	+	+	17 / 1.105	1,5%
-	+	+	-	4/ 1.105	0,4%
+	+	+	-	2/ 1.105	0,2%
+	-	+	-	1/ 1.105	0,1%

Von den 1.105 STEC in dieser Studie isolierten STEC stammten 148 Isolate von Betrieb A, 433 Isolate von Betrieb B, 16 Isolate von Betrieb C, 122 Isolate von Betrieb D, 276 Isolate von Betrieb E und 110 Isolate von Betrieb F.

Bei einer Analyse der häufig vorkommenden Virulenzmuster auf den einzelnen Betrieben fiel auf, dass beispielsweise stx_1 bei den Isolaten von Betrieb A deutlich unterrepräsentiert war. Stattdessen wiesen 100% der auf Betrieb A gewonnenen STEC-Isolate stx_2 auf. Mit prozentualen Anteilen von 14,2% und 21,3% wurden von Betrieb A und F deutlich mehr *eae*-positive STEC isoliert als auf den andern Betrieben, bei denen zum Teil keine *eae*-positiven STEC gewonnen wurden (**Abbildung 9**).

EHEC- hly_A wurde bei Isolaten aus allen Betrieben nachgewiesen. Bei den STEC von Betrieb E waren jedoch lediglich 50,9% EHEC- hly_A -positiv, in Betrieb C hingegen 100,0%.

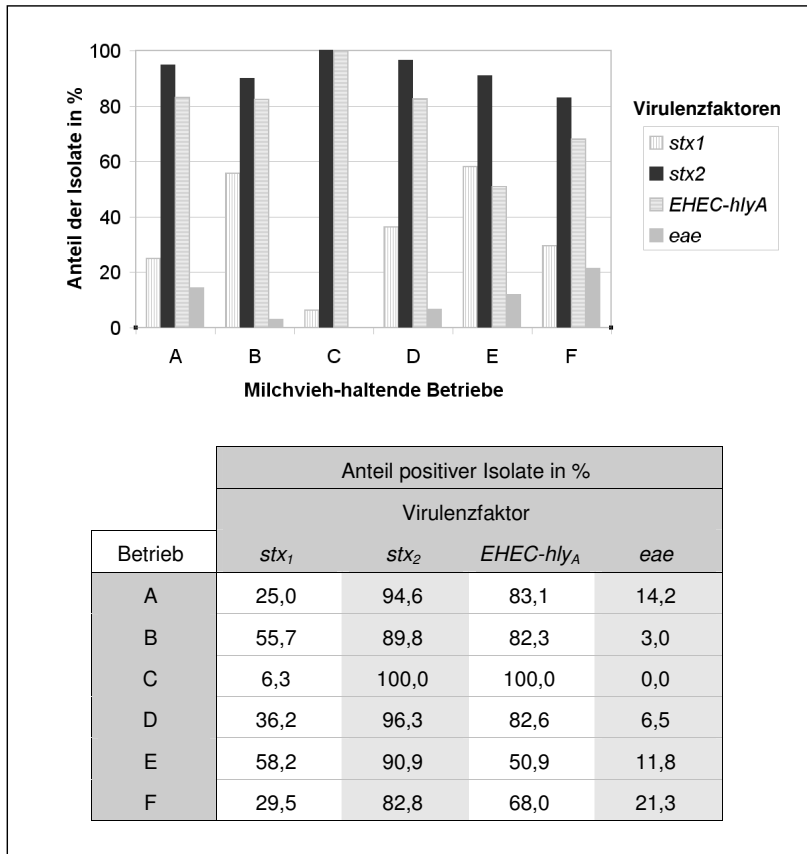


Abbildung 9: Vorkommen der Virulenzfaktoren *stx₁*, *stx₂*, *eae* und *EHEC-hly_A* bei den untersuchten Milchkühen auf den sechs Betrieben A, B, C, D, E und F, gewonnen per Koloniehybridisierung aus bovinen Kotproben, Charakterisierung mittels PCR (Cebula et al. (1995); Schmidt et al. (1994a; 1994b))

Unter der Annahme, dass STEC-Isolate mit stx_2 , eae und $EHEC-hly_A$ die höchste Humanpathogenität aufweisen erfolgte eine Auswertung in Hinsicht auf das Vorkommen solcher potentiell humanpathogenen Isolate. Von Betrieb A wurden 17 solcher STEC (11,5% der vom Betrieb isolierten STEC), von Betrieb B 12 (2,8%) und von Betrieb C keine potentiell humanpathogenen STEC gewonnen. Acht (6,2%) der gewonnenen Isolate von Betrieb D, 20 (7,3%) von Betrieb E und fünf (4,9%) von Betrieb F wiesen dieses Virulenzprofil auf (**Abbildung 10**).

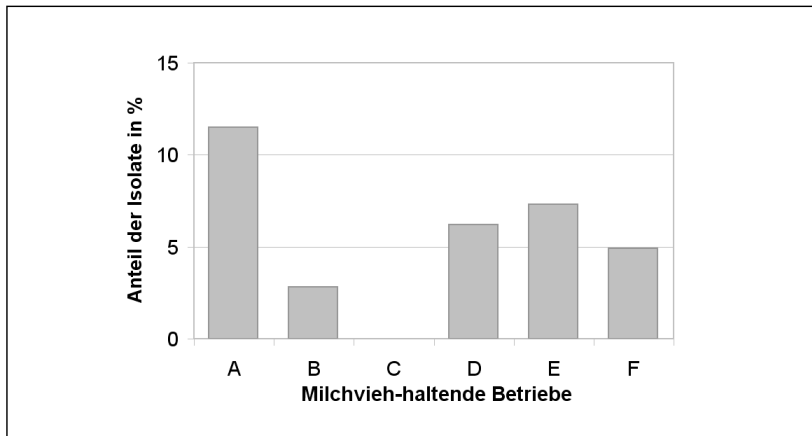


Abbildung 10: Anteile der aus bovinen Kotproben gewonnenen STEC-Isolate mit potentiell humanpathogenem Virulenzprofil (stx_2 , eae , $EHEC-hly_A$) an der Gesamtzahl ($n=1.105$), separat für die Milchvieh-haltenden Betriebe A, B, C, D, E und F, gewonnen per Koloniehybridisierung, Charakterisierung mittels PCR (Cebula et al. (1995); Schmidt et al. (1994a; 1994b))

4.1 Ergebnisse auf Betriebsebene unter Berücksichtigung der Saisonalität

4.1.1 Untersuchungen der STEC-Prävalenzen von Betrieb A

Betrieb A ist ein konventionell wirtschaftender Betrieb mit 89 Milchkühen, die vorwiegend der Rasse Schwarzbuntes Milchrind angehören (Stand: Januar 2007). Die durchschnittliche Herdenleistung im Jahr 2006 betrug 9.232 kg Milch bei 4,12% Fett und 3,39% Eiweiß. Allgemein lag der Mittelwert aller beprobten konventionellen Betriebe bei 9.211 kg Milch, 4,06% Fett und 3,35% Eiweiß (Kemper, 2007). Innerhalb dieser Studie betrug die durchschnittliche Milchleistung jeder laktierenden Probenkuh in diesem Betrieb 27,65 kg/Tag und damit befand sich die Leistung der Tiere über dem Durchschnitt aller Betriebe (25,70 kg/Tag).

Nach den Annahmen in Kapitel 3.1.1 waren für diese Studie 22 Probestiere auszuwählen, von denen sich – die Altersverteilung der Herde repräsentierend – zehn Tiere (45,5%) zum Zeitpunkt der Auswahl der Probestiere in der ersten Laktation befanden. Sieben Tiere (32,8%) waren in der zweiten oder dritten Laktation und fünf Tiere (22,7%) hatten schon mehr als drei Laktationen absolviert.

Bei der Beurteilung des Gesundheitszustandes der Probekühe fiel auf, dass in Betrieb A deutlich mehr Tiere Lahmheiten aufwiesen als durchschnittlich in den anderen Betrieben festzustellen waren (15 Tiere, 12,0% in Betrieb A vs. 8,0% im überbetrieblichen Durchschnitt). Weiterhin zeigten 7,2% (9) der Tiere Liegeboxenbedingte und 84,8% (106) Fressgitterbedingte Technopathien (Vergleich Durchschnitt: 3,9% und 26,0%). Anhand des klinischen Erscheinungsbildes wurden bei vier Tieren (3,2%) Fruchtbarkeitsstörungen in Form von Endometritiden festgestellt. Der Anteil an Fruchtbarkeitsstörungen liegt im Durchschnitt aller Betriebe bei 1,8%. Insgesamt 4 Tiere (3,2%) zeigten Auffälligkeiten im Stoffwechsel, dies war im überbetrieblichen Mittel nur bei 0,8% der Tiere der Fall.

Der durchschnittliche BCS innerhalb des Betriebes lag bei 3,17 Punkten. Die Entwicklung des BCS im Laktationszyklus ist in Kapitel 1.1.1 im Vergleich mit den anderen Betrieben dargestellt.

Über den gesamten Probenahmezeitraum waren 32,2% (86) der 267 Proben von Betrieb A in der Screening-PCR *stx*-positiv. Bei den monatlichen Probenahmen variierte die Anzahl positiver Kühe in der Gesamtzahl der beprobten Tiere zwischen vier und zwölf. Dies entspricht einer minimalen Prävalenz von 18,2% im Mai und November 2007. Maximale Werte wurden im Sommer (Juli und August) 2007 nachgewiesen. Die Prävalenz lag bei 52,2% bzw. 37,5%. Entsprechend des zweigipfeligen Verlaufs der Prävalenzkurve in **Abbildung 11** zeichnet sich eine weitere, wenn auch niedrigere Prävalenzerhöhung in den Wintermonaten bzw. den frühen Frühjahrsmonaten ab.

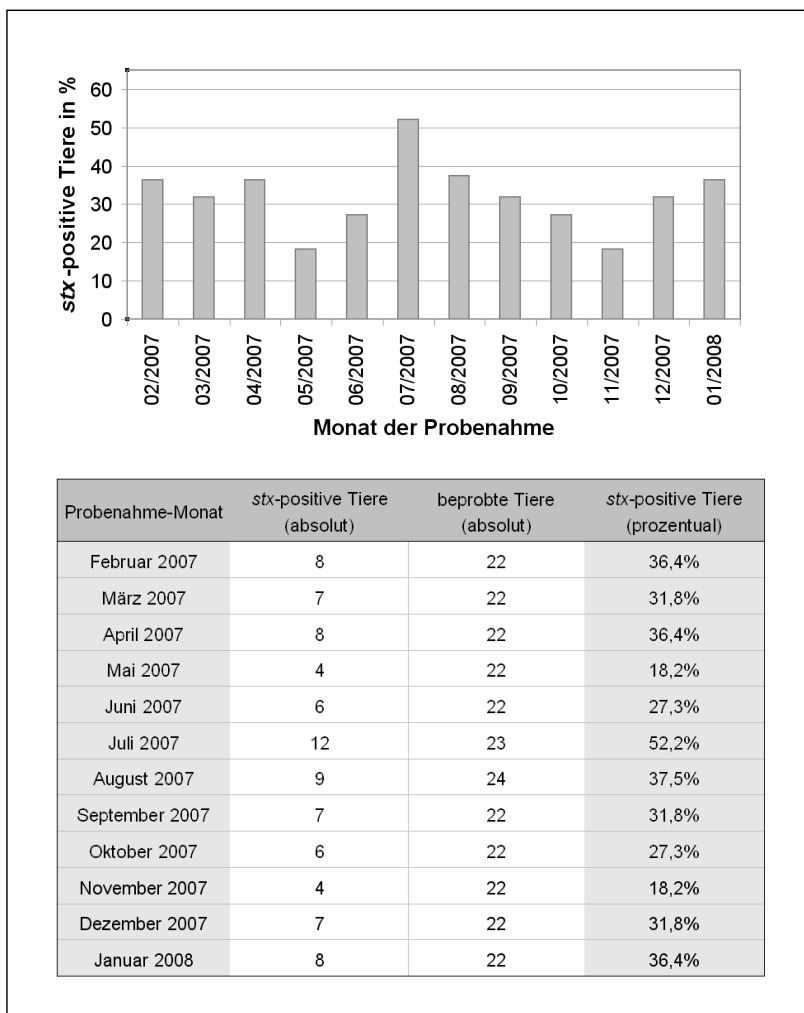


Abbildung 11: Entwicklung der STEC-Prävalenzen und Anzahl stx-positiver Milchkühe von Betrieb A im Verlauf des Probenahmezeitraums bei monatlichem Untersuchungsrythmus, der Nachweis erfolgte aus Kotproben mittels Screening-PCR nach Karch und Meyer (1989)

4.1.2 Untersuchungen der STEC-Prävalenzen von Betrieb B

Betrieb B ist ein ökologisch wirtschaftender Betrieb mit 55 Milchkühen der Rasse Altdeutsches Schwarzbuntes Niederungsind (Stand: Januar 2007). Die durchschnittliche Milchleistung seiner Herde betrug im Jahr 2006 5.606 kg Milch bei 4,31% Fett und 3,36% Eiweiß und befand sich somit deutlich unter dem Mittelwert der ökologischen Betriebe (7.044 kg Milch, 4,16% Fett und 3,28% Eiweiß (Kemper, 2007)). Innerhalb des Probenahmezeitraumes lag die durchschnittliche Milchleistung der laktierenden Probenkühe bei einem niedrigen Wert von 18,14 kg/Tag, im Vergleich mit den durchschnittlichen Milchleistungen aller Betriebe von 25,70 kg/Tag.

Wie in Kapitel 3.1.1 bereits erläutert, waren nach Cannon und Roe (1982) in Betrieb B 21 Probestiere auszuwählen (Cannon und Roe, 1982). Um die Altersverteilung der Herde zu repräsentieren, befanden sich sechs Tiere (28,6%) zum Zeitpunkt der Auswahl der Probestiere in der ersten Laktation, ebenfalls sechs Tiere (28,6%) in der zweiten oder dritten Laktation und neun Tiere (42,9%) in der vierten Laktation oder älter.

Die Untersuchung des Gesundheitszustandes der Probekühe ergab wenige Auffälligkeiten, lediglich ein etwas gehäuftes Auftreten von Erkrankungen der Fortpflanzungsorgane war zu beobachten. Vier Tiere (3,2%) erkrankten daran in Betrieb B, wohingegen im Durchschnitt nur bei 1,8% der Tiere eine Störung der Genitalorgane gegeben war.

Als durchschnittlicher BCS innerhalb des Betriebes wurde ein Wert von 3,34 Punkten festgestellt. Die Entwicklung des BCS im Laktationszyklus ist in Kapitel 1.1.1 im Vergleich mit den anderen Betrieben dargestellt.

Von 265 untersuchten Proben in Betrieb B wurden 29,8% (79) Kotproben in der Screening-PCR als *stx*-positiv detektiert. Bei den monatlichen Probenahmen variierte die Anzahl STEC-ausscheidender Kühe stark. In den Frühjahrsmonaten wurde keine Kuh, in den Sommer und Herbstmonaten hingegen bis zu zwölf Tiere (54,5%) als *stx*-positiv nachgewiesen (**Abbildung 12**). Maximale Prävalenzen wurden im Spätsommer (August, September und Oktober) 2007 detektiert. Die Prävalenzen lagen in diesen Monaten bei 54,5%, 52,4% bzw. 52,2%.

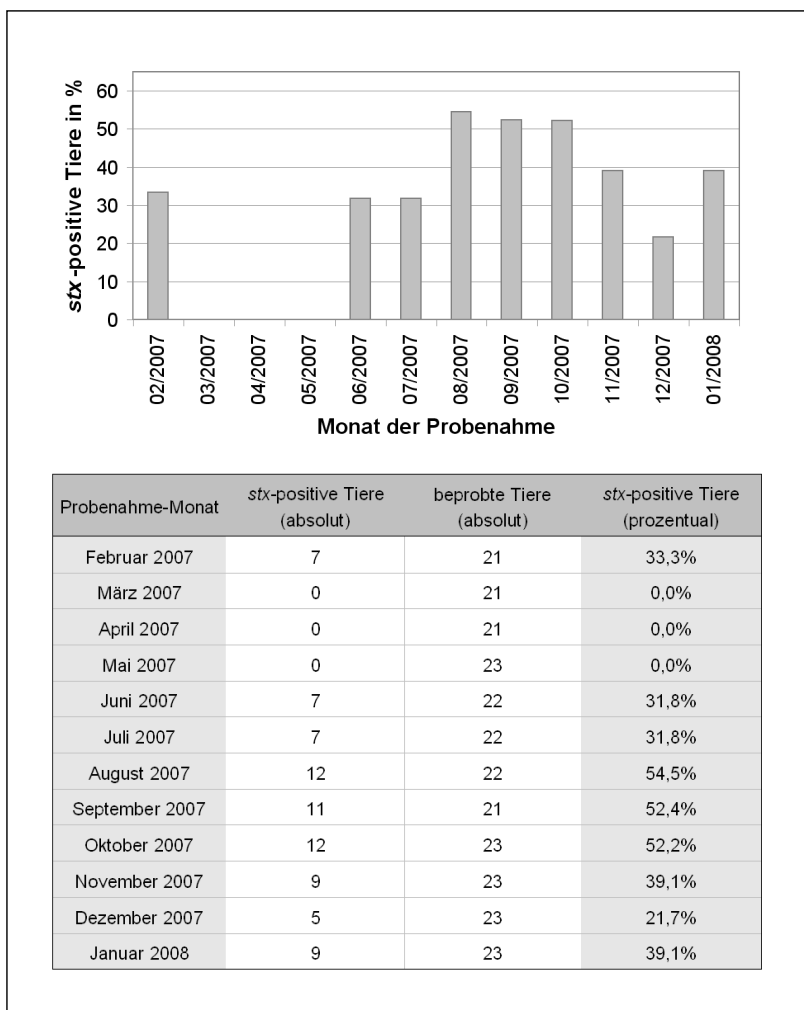


Abbildung 12: Entwicklung der STEC-Prävalenzen und Anzahl stx-positiver Milchkühe von Betrieb B im Verlauf des Probenahmezeitraums bei monatlichem Untersuchungsrythmus, der Nachweis erfolgte aus Kotproben mittels Screening-PCR nach Karch und Meyer (1989)

4.1.3 Untersuchungen der STEC-Prävalenzen von Betrieb C

Betrieb C ist ein konventionell wirtschaftender Betrieb mit 115 Milchkühen, die zum Großteil der Rasse Schwarzbuntes Milchrind angehören (Stand: Januar 2007). Bei einer durchschnittlichen Milchleistung von 10.969 kg lag dieser Betrieb deutlich über dem Mittelwert der konventionellen Betriebe (9.211 kg), wies jedoch im Gegensatz zu den Vergleichsbetrieben niedrigere Milchinhaltstoffe (3,86% vs. Mittelwert 4,06% Fett und 3,33% vs. Mittelwert 3,35% Eiweiß, (Kemper, 2007)) auf. Auch im Zeitraum der Probenahme befand sich die durchschnittliche Milchleistung der laktierenden Probestiere mit 30,20 kg/Tag deutlich über dem bei 25,70 kg/Tag liegenden Durchschnitt.

Bei der Begutachtung des Gesundheitszustandes fielen einige Kühe mit Lahmheiten (16; 11,1%), aber auch mit klinisch offensichtlichen Endometritiden (3; 2,1%) auf. Beide Erkrankungen kamen im Durchschnitt der Betriebe mit Werten von 8,0% und 1,8% wesentlich seltener vor.

Im Durchschnitt wiesen die Probenkühe auf Betrieb C einen BCS von 3,24 auf. Der Verlauf der BCS-Kurve im Laktationszyklus ist in Kapitel 1.1.1 vergleichend mit den anderen Betrieben dargestellt.

Nach Cannon und Roe (1982) waren in diesem Betrieb 24 Probestiere auszuwählen. In der Herde befanden sich 33,3% der Tiere in ihrer ersten Laktation, 45,8% in der zweiten oder dritten Laktation und 20,8% der Tiere waren mindestens in der vierten Laktation. Dementsprechend wurden für die Probenahmegruppe 1 acht Kühe und für die Gruppen 2 und 3 elf bzw. fünf Tiere ausgewählt.

In Betrieb C wurden 286 Kotproben genommen, von denen 18,2% (52) in der Screening-PCR *stx*-positiv waren. Die höchsten Prävalenzen im Jahresverlauf wurden im Frühjahr (März: 45,8% und Mai: 41,7%) nachgewiesen, ein weiterer Zeitraum mit höheren Prävalenzen zwischen 20,8% und 21,7% befand sich im Sommer (Juli und August) (**Abbildung 13**).

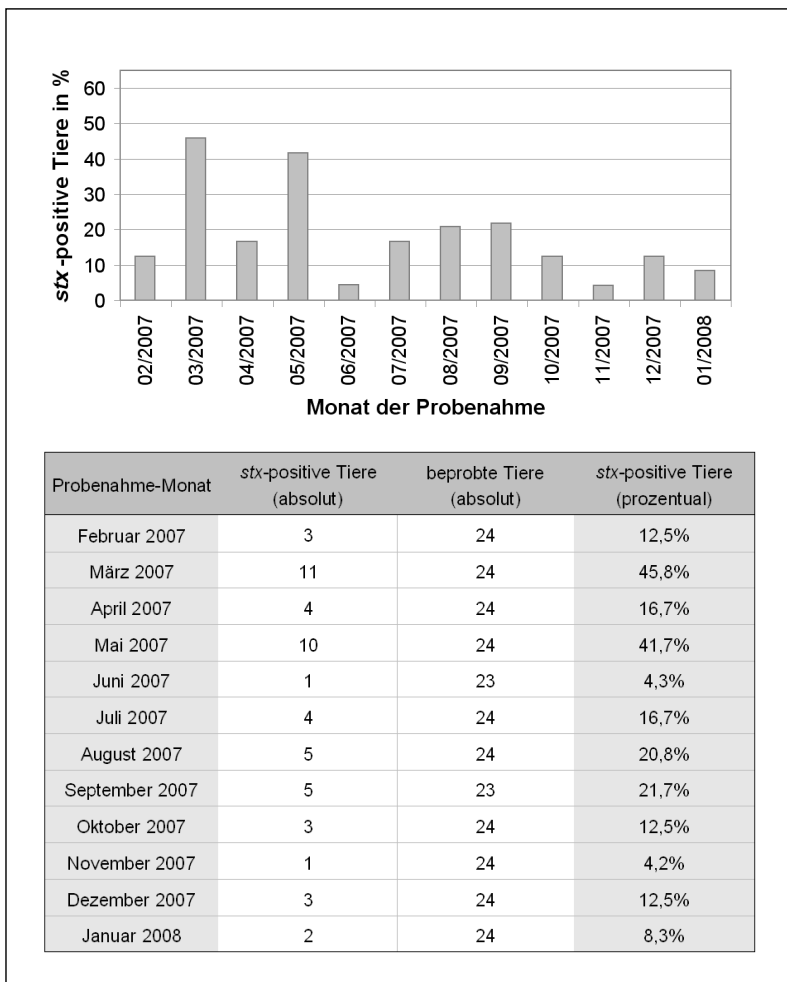


Abbildung 13: Entwicklung der STEC-Prävalenzen und Anzahl stx-positiver Milchkühe von Betrieb C im Verlauf des Probenahmezeitraums bei monatlichem Untersuchungsrythmus, der Nachweis erfolgte aus Kotproben mittels Screening-PCR nach Karch und Meyer (1989)

4.1.4 Untersuchungen der STEC-Prävalenzen von Betrieb D

Betrieb D ist ebenfalls ein ökologisch wirtschaftender Betrieb. Es werden dort 62 Milchkühe gehalten, die vorwiegend der Rasse Schwarzbuntes Milchrind angehören (Stand: Januar 2007). Die durchschnittliche Milchleistung lag im Jahr 2006 bei 7.432 kg Milch mit 4,22% Fett und 3,21% Eiweiß etwas über dem Mittelwert der ökologischen Betriebe (7.044 kg Milch, 4,16% Fett und 3,28% Eiweiß (Kemper, 2007)). Im Zeitraum der Probenahme wiesen die laktierenden Probtiere eine durchschnittliche Milchleistung von 23,05 kg/Tag auf, dies war etwas niedriger als der überbetrieblich bestimmte Durchschnitt von 25,70 kg/Tag.

Besonders auffällig war bei der Begutachtung des Gesundheitszustandes die große Häufung der Tiere mit Fressgitter-bedingten Technopathien, wobei 95 Probtiere (89,6%) im Nackenbereich verdickte Haut bis hin zu Beulen aufwiesen. Durchschnittlich kamen solche Technopathien bei 26,0% der Tiere innerhalb aller Betriebe vor.

Der Ernährungszustand der Probtiere befand sich im Rahmen der BCS-Bonitierung bei durchschnittlich 3,13 Punkten. Ein Vergleich der BCS-Entwicklung mit der anderer Betriebe wird in Kapitel 1.1.1 vorgenommen.

Im Rahmen der bereits erläuterten Probtierauswahl wurden 21 Kühe bestimmt. In der Herde befanden sich 28,6% der Tier in ihrer ersten Laktation, 33,3% in der zweiten oder dritten und 38,1% der Tiere hatten schon mehr als drei Laktationen absolviert. Daraus folgte die Auswahl von sechs Tieren in Probenahmegruppe 1 und sieben bzw. acht Tieren in die Gruppen 2 und 3.

Ein Anteil von 29,5% (77) der untersuchten 261 Kotproben war in der Screening-PCR *stx*-positiv. Im Jahresverlauf waren die Prävalenzen im Juni, Juli und Oktober mit Werten von 61,9%, 50,0% und 59,1% am höchsten. Besonders im Frühjahr und Winter (Februar 2007 bis Mai 2007 und November 2007 bis Januar 2008) waren nur sehr wenige Tiere STEC-Ausscheider (**Abbildung 14**).

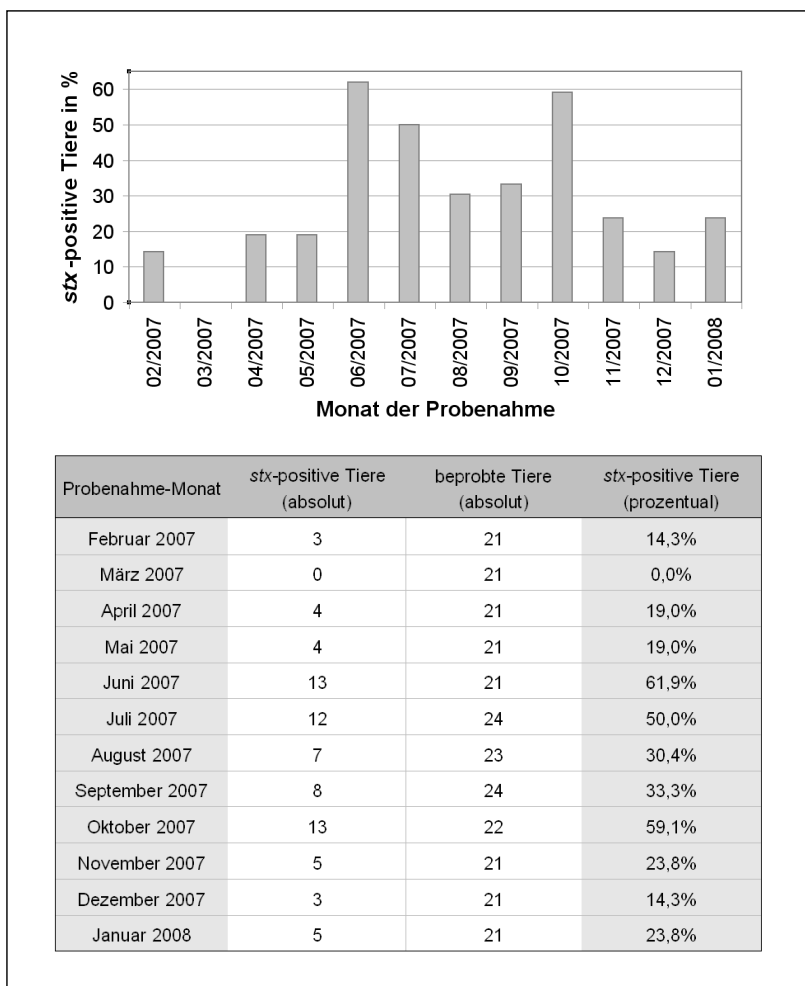


Abbildung 14: Entwicklung der STEC-Prävalenzen und Anzahl stx-positiver Milchkühe von Betrieb D innerhalb des Probenzeitraums bei monatlichem Untersuchungsrythmus, der Nachweis erfolgte aus Kotproben mittels Screening-PCR nach Karch und Meyer (1989)

4.1.5 Untersuchungen der STEC-Prävalenzen von Betrieb E

Betrieb E wird konventionell bewirtschaftet und hält 77 Milchkühe der Rassen Schwarzbuntes Milchrind und Rotbunte Red Holstein (RH) (Stand: Januar 2007). Bei einer durchschnittlichen Milchleistung von 7.432 kg Milch im Jahr 2006 mit 4,21% Fett und 3,33% Eiweiß lag Betrieb D etwas unter dem Mittelwert der konventionellen Betriebe (9.211 kg Milch, 4,06% Fett und 3,35% Eiweiß (Kemper, 2007)). Während der Probenahme zeigten die laktierenden Probtierere eine Milchleistung von durchschnittlich 27,68 kg/Tag, dies liegt etwas über dem Betriebs-weiten Durchschnitt von 25,70 kg/Tag.

Bei der Gesundheitsbeurteilung der Probenkühe wurden überdurchschnittlich viele Tiere mit Lahmheiten identifiziert (15 Tiere; 11,1%, im Vergleich zum überbetrieblichen Durchschnitt von 8,0%). Zusätzlich wiesen sieben Tiere (5,2%) Technopathien auf, die durch mangelhafte Liegeboxen bedingt waren, im Durchschnitt der sechs Betriebe wiesen nur 3,9% der Tiere derartige Technopathien auf.

Bei der Bestimmung des BCS konnte ein durchschnittlicher Wert von 3,30 Punkten errechnet werden, die Entwicklung der BCS-Werte im Verlauf der Laktation ist in Kapitel 1.1.1 im Vergleich zwischen den sechs Betrieben dargestellt.

Entsprechend der homogenen Altersverteilung der Herde wurden für jede Probenahmegruppe sieben Tiere (33,3%) ausgewählt.

Von den 278 auf Hof E genommenen Kotproben erwiesen sich 29,1% (81) in der Screening-PCR als *stx*-positiv. Deutlich als Perioden erhöhter Prävalenzen wurden Herbst und Winter erkannt: Hier lagen die Prävalenzen von Oktober bis Januar mit Werten von 39,2% bis 54,2% sehr hoch (**Abbildung 15**). Im Frühjahr und Sommer wiesen jedoch immer weniger als ein Drittel der Kühe ein positives Ergebnis in der Screening-PCR auf.

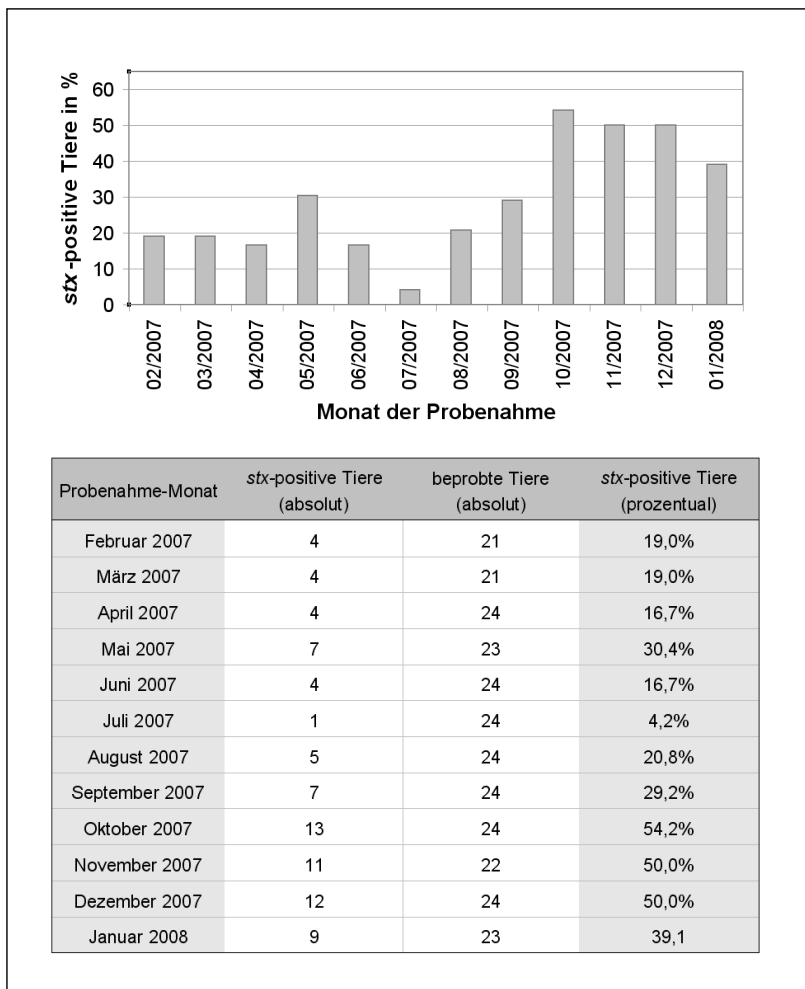


Abbildung 15: Entwicklung der STEC-Prävalenzen und Anzahl *stx*-positiver Milchkühe von Betrieb E innerhalb des Probenzeitraums bei monatlichem Untersuchungsrythmus, der Nachweis erfolgte aus Kotproben mittels Screening-PCR nach Karch und Meyer (1989)

4.1.6 Untersuchungen der STEC-Prävalenzen von Betrieb F

Betrieb F ist ebenfalls ein ökologisch wirtschaftender Betrieb, auf dem 73 Milchkühe der Rasse Schwarzbuntes Milchrind gehalten werden (Stand: Januar 2007). Mit einer durchschnittliche Milchleistung von 8.094 kg Milch im Jahr 2006 bei 3,95% Fett und 3,32% Eiweiß liegt Betrieb F deutlich über dem Mittelwert der ökologischen Betriebe (7.044 kg Milch, 4,16% Fett und 3,28% Eiweiß (Kemper, 2007)). Diese hohe durchschnittliche Milchleistung wurde auch im Zeitraum der Probenahme erhoben. Mit einer Leistung von 27,46 kg/Tag lagen die laktierenden Probtierere in Betrieb F über dem überbetrieblichen Durchschnitt von 25,70 kg/Tag.

Bei der Beurteilung des Gesundheitszustandes wurden wenig Auffälligkeiten analysiert. Beobachtet wurde lediglich eine Periode mit vermehrten Hautveränderungen durch Trichophytie. Dabei waren sieben Tiere (5,0%) befallen, dies liegt deutlich über dem überbetrieblichen Durchschnitt von 1,4%.

Mit einem durchschnittlichen BCS-Wert von 3,48 wurde in Betrieb F der höchste durchschnittliche BCS-Wert auf Betriebsebene errechnet. Auf den Vergleich sowie die Entwicklung des BCS innerhalb der Laktation wird in Kapitel 1.1.1 detaillierter eingegangen.

Es wurden entsprechend der Altersverteilung in der Herde fünf Tiere (21,7%) in der ersten Laktation, neun Tiere (39,1%) in der zweiten und dritten Laktation, sowie sieben Tiere (30,4%) in der vierten Laktation oder höher ausgewählt.

Insgesamt wurden von Betrieb F 289 Kotproben untersucht. Lediglich 32 Proben (11,1%) zeigten sich in der Screening-PCR als *stx*-positiv. Maximale Prävalenzen in diesem Betrieb waren im Mai und Juni 2007 (39,1%; 18,5%) nachzuweisen, ansonsten wurden in den weiteren Monaten des Probenahmezeitraumes meist weniger als 10,0% der Tiere als STEC-Ausscheider identifiziert (**Abbildung 16**).

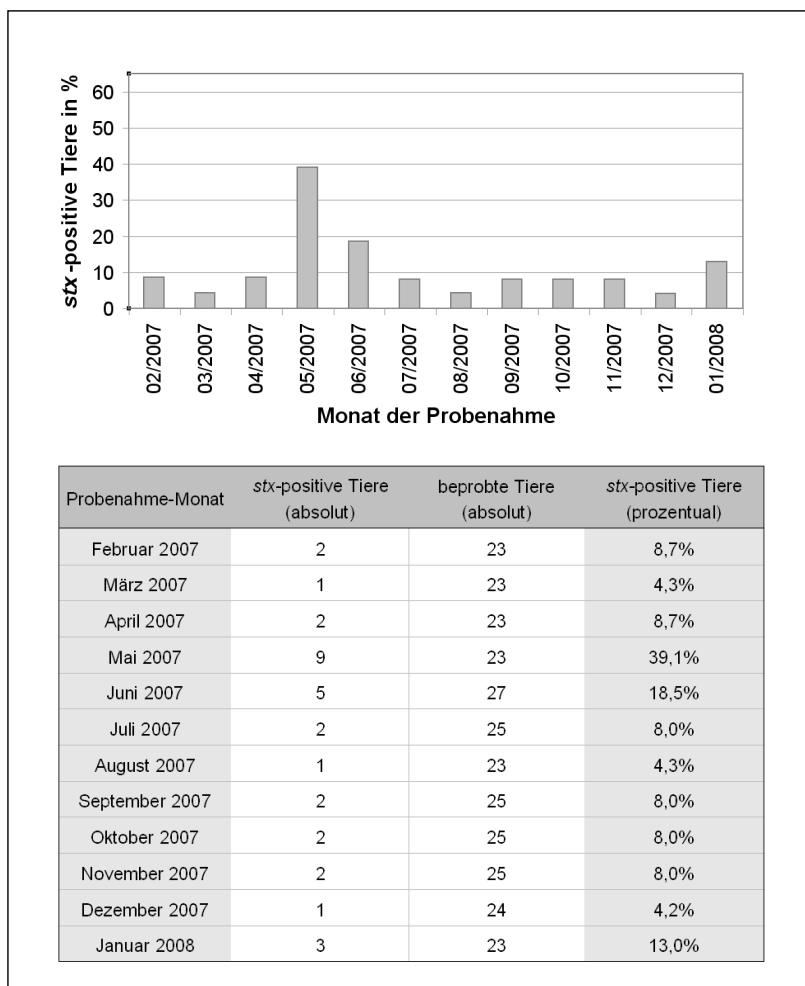


Abbildung 16: Entwicklung der STEC-Prävalenzen und Anzahl stx-positiver Milchkühe von Betrieb F innerhalb des Probenzeitraums bei monatlichem Untersuchungsrythmus, der Nachweis erfolgte aus Kotproben mittels Screening-PCR nach Karch und Meyer (1989)

4.1.7 Vergleich der STEC-Prävalenzen zwischen den Betrieben

Zwischen den Betrieben sind deutliche Unterschiede in der Qualität des Herdenmanagements bezüglich Ernährungs- und Gesundheitszustand, aber auch in den Milchleistungsdaten festzustellen.

In **Tabelle 22** sind die Verläufe der BCS-Scores in den verschiedenen Laktationsabschnitten dargestellt. Auffällig sind die in einigen Betrieben unterkonditioniert abgekalbten Tiere (Betriebe A, B, C), aber auch Tiere von Betrieb D, deren Gewichtszunahme unter den empfohlenen Werten zurückfällt und die daraufhin in einigen Laktationsabschnitten unterkonditioniert sind. Hingegen sind auf Betrieb F über viele Laktationsabschnitte überkonditionierte Kühe zu beobachten. Besonders zum Ende der Laktation und im Rahmen der Trockensteh-Periode gibt es jedoch auch in anderen Betrieben (C, D) überkonditionierte Tiere.

Tabelle 22: Entwicklung der BCS-Scores der untersuchten Probenkühe (n=1.646) im Laufe des Laktationszyklus auf den Milchvieh-haltenden Betrieben A, B, C, D, E und F

Laktationsabschnitt	Betrieb A	Betrieb B	Betrieb C	Betrieb D	Betrieb E	Betrieb F	Empf. ¹
0.-50.d	2,55	2,96	2,91	3,17	3,05	3,40	3,00-3,50
51.-100.d	2,86	2,97	2,75	2,97	2,81	3,35	2,50-3,25
101.-150.d	3,17	2,88	3,03	2,86	3,09	3,37	3,00-3,50
151.-200.d	3,28	3,06	3,21	2,94	3,23	3,44	
201.-250.d	3,41	3,48	3,41	3,32	3,16	3,56	
251.-300.d	3,54	3,40	3,56	3,20	3,34	3,58	3,0-3,75
301.-350.d	2,88	3,50	3,85	2,95	3,10	3,38	
>350.d	3,25	3,55	3,63	3,31	3,75	3,81	3,25-3,75
trocken stehend	3,25	3,38	3,68	3,82	3,37	3,61	
⊙	3,19	3,34	3,24	3,13	3,30	3,48	

Empf.¹: Empfehlungen nach Mahlkow-Nerge (2003), davon abweichende Werte in **Fett**

⊙: innerbetrieblicher Mittelwert

d: Tag

BCS: Body Condition Score

Betriebstypische Problembereiche bezüglich des Gesundheitszustandes sind oftmals vorhanden und sind bei der Besprechung der einzelnen Betriebe bereits erwähnt. Eine Übersicht dieser Erkrankungsschwerpunkte wird in **Tabelle 23** nochmals dargestellt.

Tabelle 23: Überblick über beobachtete Erkrankungsschwerpunkte in den Betrieben A, B, C, D, E und F bei den untersuchten Probenkühen (n=1.646)

Erkrankung	Betrieb A	Betrieb B	Betrieb C	Betrieb D	Betrieb E	Betrieb F	⊙	Empf.
Lahmheit	×		×		×		8,0%	<10% ¹
Genitalerkr.	×	×	×				1,8%	<5% ²
Hauterkr.						×	1,4%	↓
Stoffwechsel- erkr.	×						0,8%	↓
Technopathie, Boxen- bedingt	×				×		3,9%	↓
Technopathie, Fressgitter bedingt	×			×			26,0%	↓

-erkr.: Erkrankungenen ⊙: überbetrieblicher Mittelwert ↓: möglichst niedrig

¹: Vermunt und Greenough (1997)

²: Esslemont und Peeler (1993)

prozentuale Anteile der einzelnen Erkrankungen: siehe Beschreibung in den jeweiligen Kapiteln 4.1.1, 4.1.2, 4.1.3, 4.1.4, 4.1.5 und 4.1.6

Im Hinblick auf die Milchleistungsmerkmale der einzelnen Betriebe sind, wie in **Tabelle 24** dargestellt, ebenfalls Unterschiede vorhanden. Die Streuung der durchschnittlichen Milchleistung bei den ökologisch bewirtschafteten Betrieben ist mit einer Spannweite von 18,14kg/Tag bis 27,46kg/Tag höher als die der konventionell bewirtschafteten Betriebe (27,65 kg/Tag bis 30,20 kg/Tag). Dabei fällt Betrieb B – auch im Vergleich der ökologisch wirtschaftenden Betriebe – durch eine deutlich unterdurchschnittliche Milchleistung von 18,14kg/Tag auf, Betrieb C hingegen durch eine überdurchschnittlich hohe Milchleistung von 30,20kg/Tag. Beachtenswert ist ebenfalls die über dem Durchschnitt für konventionelle und ökologische Betriebe liegende Milchleistung von Betrieb F, einem ökologischen Betrieb, für den eine solche Leistung wesentlich aufwendiger zu realisieren ist. Weiterhin sticht der niedrige Milch-Harnstoffgehalt der ökologischen Betriebe heraus. Besonders auffällig sind hier die Betriebe B und D mit Werten um und unter 200mg/L (201,79 mg/L und 181,82 mg/L). Bei einem empfohlenen Wert von unter 300.000 somatischen Zellen/mL Milch (Kielwein, 1994) sind besonders die erhöhten Zellzahl-Werte der Betriebe B, C und E bemerkenswert.

Die Probestiere von Betrieb E liegen mit einer durchschnittlichen Zellzahl von 416.760 Zellen/mL sogar über dem von der Milchverordnung für verkehrsfähige Milch angegebenen Wert von 400.000 Zellen/mL (Anonymus, 2000).

Tabelle 24: Durchschnittliche Milchkennzahlen (Milchmenge, prozentualer Milcheiweiß und -fettanteil, Milchharnstoffhalt und somatische Zellzahl) der Probenkühe auf den sechs untersuchten Milchviehbetrieben A, B, C, D, E und F

	Betriebe						☉
	konventionell			ökologisch			
	A	C	E	B	D	F	
Milchmenge (kg/Tag)	27,65	30,20	27,68	18,14	23,05	27,46	25,70
Eiweiß (%)	3,47	3,52	3,44	3,58	3,28	3,42	3,45
Fett (%)	4,46	4,15	4,21	4,44	4,33	4,09	4,28
Harnstoff (mg/L)	246,50	256,77	263,31	201,79	181,82	215,1	227,55
somatische Zellen (*1.000/mL)	117,98	331,53	416,76	356,61	280,78	132,49	272,69

fett dargestellte Werte: Abweichung von Mittelwert um mehr als 10% ☉: überbetrieblicher Mittelwert
 kg: Kilogramm mg: Miligramm L: Liter mL: Milliliter

Die Entwicklung der durchschnittlichen Milchleistung der Probestiere über den gesamten Laktationszeitraum ist in **Abbildung 17** dargestellt. Diese Mittelwerte wurden zur Einteilung jeder Kuh in die Klassen niedrigleistend, mittelleistend und hochleistend verwendet. Erwähnenswert ist das gewünschte Leistungsplateau mit einer Persistenz der Milchleistung innerhalb der ersten drei Laktationsmonaten (Huth, 1995), welches in Betrieb C und F zu beobachten ist, bei den anderen Betrieben jedoch nicht vorliegt. Die Verringerungen der durchschnittlichen Milchleistungen auf den konventionell bewirtschafteten Betrieben weisen keine wesentlichen Unterschiede untereinander auf. Anders verhält es sich bei den ökologisch bewirtschafteten Betrieben: Die durchschnittliche Milchleistung auf Betrieb F fällt nach dem Plateau sehr schnell ab und liegt nach 250 Laktationstagen sogar unter der Leistungen von Betrieb D. Die bereits zu Beginn der Laktation relativ niedrige durchschnittliche Milchleistung von Betrieb B zeigt aber im Vergleich zu den anderen Betrieben besonders innerhalb der ersten 150 Tage eine verhältnismäßig geringe Abnahme.

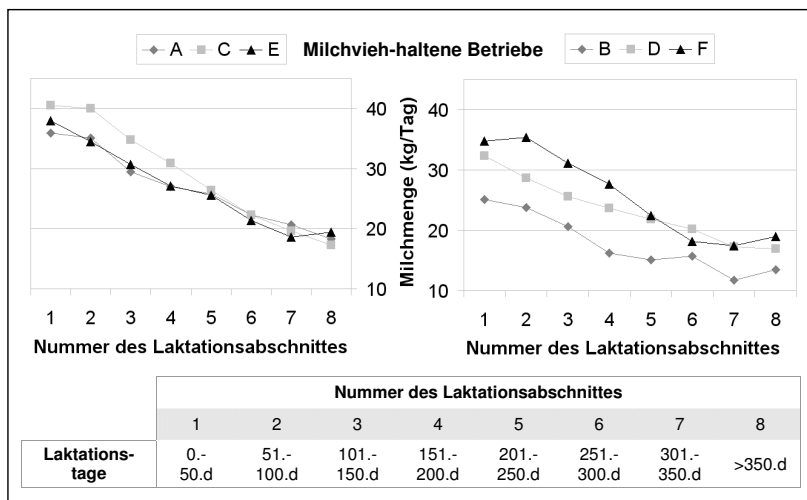


Abbildung 17: Milchleistung der untersuchten Probestiere in den verschiedenen Laktationsabschnitten für die konventionell (links) und ökologisch bewirtschafteten (rechts) Betriebe A, B, C, D, E und F

kg: Kilogramm

d: Tag

Bei einem Vergleich der STEC-Herdenprävalenzen existieren deutliche Unterschiede zwischen den Betrieben: Zwei Betriebe (C und F) liegen mit Prävalenzen von 18,2% bzw. 11,1% in wesentlich niedrigeren Bereichen als die anderen Betriebe. Diese weisen relativ gleichmäßig Prävalenzen um 30% auf (Betrieb A: 32,2%, Betrieb B: 29,8%, Betrieb D: 29,5% und Betrieb E: 29,1%). Im saisonalen Vergleich der Betriebe ist auffällig, dass mehrere relativ häufige Peak-Varianten mit einem vermehrten Auftreten von STEC nachzuweisen sind. Die graphische Darstellung der Verläufe erfolgt entsprechend der Gruppierung in Betriebspaaren (**Abbildung 18**). In Betrieb A, C und F treten in den Sommermonaten Juni, Juli und August vermehrt positive Ergebnisse in der Screening-PCR auf. Besonders für Betrieb C ist dies jedoch nicht die Saison mit den höchsten Prävalenzen; diese finden sich dort in den Frühjahrsmonaten März, April und Mai. In diesen Monaten ist auch bei Betrieb E eine Prävalenzsteigerung zu beobachten; die größte Anzahl an positiven Ergebnissen in der Screening-PCR ist jedoch in den Herbst- und Wintermonaten von Oktober 2007 bis Januar 2008 zu verzeichnen. In diesen Monaten ist auch in den Betrieben A und B eine Steigerung der Prävalenzen zu beobachten. Ein weiterer Zeitraum für den Nachweis hoher Prävalenzen ist der Spätsommer bzw. Frühherbst mit den Monaten August, September und Oktober. Hier zeigen sich vor allem bei den Betrieben B und E besonders hohe Prävalenzen, aber auch bei Betrieb D ist in dieser Zeit ein Ausscheidungspeak nachzuweisen. Das vermehrte Auftreten von höheren Prävalenzen in den Sommer- und Herbstmonaten führt schließlich zu dem in **Abbildung 18** sichtbaren Peak in dieser Periode.

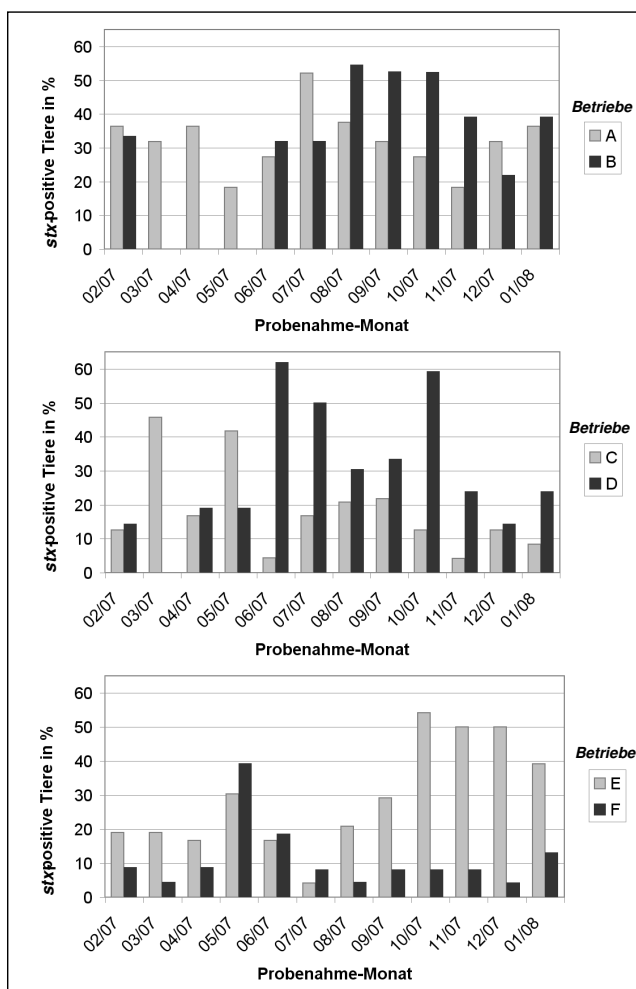


Abbildung 18: Vergleich der Entwicklung der STEC-Prävalenzen der Milchkuhe auf den sechs Betrieben A, B, C, D, E und F im Verlauf des Probenahmezeitraums, geordnet nach regional zusammen liegenden Betriebspaaren, monatlicher Untersuchungsrythmus, der Nachweis erfolgte aus Kotproben mittels Screening-PCR nach Karch und Meyer (1989)

4.2 Deskriptive und statistische Auswertung

Im Rahmen der Auswertung wurden zwei statistische Modelle gebildet:

- Modell 1 mit den Ergebnissen der Screening-PCR (*stx*-Nachweis)
- Modell 2 mit den Ergebnissen der STEC-Isolierung (STEC-Nachweis)

Von 1.646 untersuchten Proben waren 407 (24,7%) in der Screening-PCR *stx*-positiv, es wurden jedoch nur von 134 Tieren STEC isoliert. Die Ergebnisse des Nachweises von STEC in der zweiten Untersuchung gingen in Modell 2 ein. Insgesamt wurden aus labortechnischen und methodischen Gründen lediglich die Kotproben von 235 Kühen einer Koloniehbridisierung unterzogen. Es gelang, von 134 Tieren (57,0%) STEC zu isolieren. Bei isolierten *E. coli* von 24 weiteren Tieren war der Nachweis eines *stx*-Gens nicht möglich.

4.2.1 Statistische Auswertung mit Modell 1 (*stx*- Nachweis mittels Screening-PCR) auf Einzeltierebene

Das mit logistischer Regression geschätzte Modell ergab mehrere signifikante Risikofaktoren für einen *stx*-Nachweis mittels Screening-PCR in den Fäzes der gesamten untersuchten Milchrinder. Relevant waren folgende Faktoren:

- der Monat der Probenahme,
- die Anzahl der absolvierten Laktationen,
- das Laktationsstadium,
- die Anwesenheit eines kontinuierlich ausscheidenden Tieres in der Herde.

4.2.1.1 Ergebnisse unter Berücksichtigung der Laktation

Aufgrund der Auswahl der Kühe imit verschiedenen Anzahlen absolvierter Laktationen und Laktationsstadien konnte eine Analyse der Einflüsse dieser beiden Faktoren auf den *stx*-Nachweis mittels Screening-PCR aus den Fäzes erfolgen.

4.2.1.1.1 Assoziation des *stx*-Nachweises mittels Screening-PCR und der Anzahl absolvierter Laktationen (Berechnung mit Modell 1)

Insgesamt wurden 293 Tiere in der ersten Laktation (Gruppe 1), 626 Kühe in zweiter und dritter Laktation (Gruppe 2) und 508 Tiere, die schon mehr als drei Laktationen absolviert hatten (Gruppe 3), beprobt. Bei 199 Tieren lagen vom Landeskontrollverband (LKV) keine Angaben zu Laktationsdaten vor, so dass diese Tiere in der Auswertung nicht berücksichtigt wurden. Die Auswahl der Tiere erfolgte im Januar 2007 im Rahmen des bereits beschriebenen zufälligen Auswahlverfahrens. Verschiebungen der Zuordnungen der Tiere in andere Laktationsnummerngruppen ergaben sich im Laufe des Probenahmezeitraumes. Mit Hilfe der Daten des LKV über die Abkalbungsdaten und die Anzahl der Laktationen war es möglich, jede Kuh nach

ihrer nächsten Kalbung der dann jeweils passenden Gruppe zuzuordnen. Insgesamt fiel auf, dass der Anteil der in der Screening-PCR als *stx*-positiv nachzuweisenden Tiere in der Gruppe der Erstlaktierenden mit 31,7% zu 22,8% bzw. 21,7% in den anderen Gruppen deutlich höhere Werte aufwies (**Tabelle 25**).

Tabelle 25: Bewertung des Risikos eines *stx*-Nachweises im Kot der Probenkühe mittels Screening-PCR in Assoziation mit der Anzahl absolvierter Laktationen, Angabe von Anteilen *stx*-positiver Kühe, sowie der jeweiligen Odds Ratio, die mit Modell 1 (*stx*-Nachweis mittels Screening-PCR) berechnet wurden, Sortierung nach Laktationsnummerngruppen, aufgetragen gegen Laktationsgruppe 3 mit Odds=1

Gruppe	beprobte Tiere	<i>stx</i> -positive Tiere	Anteil	Odds-Ratio	95%-KI	Signifikanz
1	293	93	31,7%	1,74	1,22-2,47	***
2	626	143	22,8%	1,15	0,86-1,55	n.s.
3	508	110	21,7%	1,00	-	-

***: hoch signifikant n.s.: nicht signifikant KI: Konfidenzintervall -: nicht vorhanden

Gruppe 1: Erstkalbende Gruppe 2: Zweit- und Drittkalbende

Gruppe 3: Kühe mit mehr als drei absolvierten Laktationen

Im Rahmen der statistischen Auswertung erwies sich die Odds-Ratio (OR) für Kühe der Gruppe 1 mit einer 1,74-fachen Erhöhung hoch signifikant im Vergleich zur Gruppe 3. Im Vergleich mit der Gruppe 2 zeigte die Gruppe 1 ebenfalls einen signifikanten Unterschied (OR=1,51**; 95%-KI=1.074-2.112). Hingegen traten zwischen den Gruppen 2 und 3 ähnliche Chancen auf, in der Screening-PCR als *stx*-positiv nachgewiesen zu werden (**Tabelle 25**).

4.2.1.1.2 Assoziation des *stx*-Nachweises mittels Screening-PCR und des Laktationsstadiums (Berechnung mit Modell 1)

Bei der zufälligen Auswahl der Probenkühe wurde der Laktationstag nicht berücksichtigt, trotzdem ergab sich eine relativ gleichmäßige Verteilung der Tiere in die verschiedenen Laktationsstadien. Die Anteile der *stx*-positiven Tiere lagen in den Gruppen der Tiere, die sich im 51.-150. Laktationstag befanden, sowie bei den Tieren, die schon mehr als 350 Tage in Laktation waren oder trocken standen, bei über 25,0% (**Tabelle 26**). Hingegen wurden besonders wenig *stx*-positive Tiere bei den Tieren unmittelbar nach der Kalbung bis zum 50. Laktationstag und bei alt-melkenden Kühen vom 301. bis zum 350. Laktationstag nachgewiesen.

Tabelle 26: Bewertung des Risikos eines *stx*-Nachweises im Kot der Probenkühe mittels Screening-PCR in Assoziation mit dem Laktationstag, Angabe von Anteilen *stx*-positiver Tiere, nach Laktationsstadien sortiert, sowie der jeweiligen Odds-Ratio, die mit Modell 1 (*stx*-Nachweis mittels Screening-PCR) berechnet wurden, aufgetragen gegen 0.-50. Laktationstag mit Odds=1

Laktationsstadium	beprobte Tiere	<i>stx</i> -positive Tiere	Anteil	Odds-Ratio	95%-KI	Signifikanz
0.-50.d	152	25	16,4%	1,00	-	-
51.-100.d	175	44	25,1%	1,73	0,98-3,04	*
101.-150.d	192	52	27,1%	1,93	1,11-3,35	**
151.-200.d	186	45	24,2%	1,59	0,91-2,80	n.s.
201.-250.d	166	38	22,9%	1,43	0,80-2,57	n.s.
251.-300.d	155	36	23,2%	1,36	0,75-2,45	n.s.
301.-350.d	105	20	19,0%	1,01	0,52-1,96	n.s.
>350.d	114	36	31,6%	2,06	1,12-3,79	**
trocken stehend	182	50	27,5%	1,67	0,95-2,91	*

** : signifikant * : Tendenz

n.s.: nicht signifikant

- : nicht vorhanden

KI: Konfidenzintervall

d: Tag

Bei der statistischen Auswertung hatten die Tiere im 101. bis 150. Laktationstag, sowie Tiere mit mehr als 350 Laktationstagen im Vergleich zu den Kühen innerhalb der ersten 50 Laktationstage eine höhere Chance auf ein *stx*-positives Ergebnis in der Screening-PCR. Diese Tiere besaßen im Vergleich zur ersten Laktationsstadiengruppe signifikant höhere Odds (**Tabelle 26**). Trocken stehende Kühe sowie Tiere im 51. bis 100. Laktationstag wiesen lediglich eine Tendenz zu einer höheren Ausscheidungschance auf, welche nicht signifikant war.

Signifikant höhere OR zeigten sich ebenfalls im Vergleich zu Tieren mit 301 bis 350 Laktationstagen bei Kühen, die sich bereits mehr als 350 Tage in Laktation befanden oder trocken standen (**Tabelle 27**). Kühe mit 51 bis 150 Laktationstagen hatten im Vergleich mit Tieren im 301. bis 350. Laktationstag eine tendenziell bis signifikant erhöhte Chance in der Screening-PCR als *stx*-positiv nachgewiesen zu werden.

Tabelle 27: Bewertung des Risikos eines *stx*-Nachweises im Kot der Probenkühe mittels Screening-PCR in Assoziation mit dem Laktationstag, Angabe von weiteren signifikanten Odds-Ratio zwischen den Laktationsstadien, nach Laktationsstadien sortiert, berechnet mit Modell 1 (*stx*-Nachweis mittels Screening-PCR), aufgetragen gegen verschiedene Laktationsstadien (Odds=1)

Laktationsstadium	Laktationsstadium (Odds=1)	Odds-Ratio	95%-KI	Signifikanz
51.-100.d	300.-350.d	1,72	0,93-3,19	*
101.-150.d	300.-350.d	1,92	1,05-3,50	**
>350.d	300.-350.d	2,05	1,07-3,93	**
trocken stehend	300.-350.d	1,66	0,91-3,03	*

** : signifikant

* : Tendenz

KI: Konfidenzintervall

d: Tag

4.2.1.1.3 Assoziation des *stx*-Nachweises mittels Screening-PCR und der Milchleistung und den Milchinhaltsstoffen (Berechnung mit Modell 1)

Ein Vergleich des Anteils der in der Screening-PCR *stx*-positiven Kühen in den unterschiedlichen Milchleistungsgruppen ergab eine stetige Abnahme der Prävalenz von der hochleistenden Kuh (mehr als 10% über dem Betriebs- und Laktationsabschnitt-spezifischen Mittel) bis hin zur niedrigleistenden Kuh (weniger als 10% unter dem Betriebs- und Laktationsabschnitt-spezifischen Mittel, **Tabelle 28**), welche allerdings nicht signifikant war. Trocken stehende Kühe wiesen im Vergleich zu den anderen Leistungsgruppen eine ebenfalls nicht signifikant höhere Prävalenz auf.

Tabelle 28: Bewertung des Risikos eines *stx*-Nachweises im Kot der Probenkühe mittels Screening-PCR in Assoziation mit der Milchleistung, Angabe von Anteilen *stx*-positiver Tiere sowie der jeweiligen Odds-Ratio, die mit Modell 1 (*stx*-Nachweis mittels Screening-PCR) berechnet wurden, aufgetragen gegen niedrige Milchleistung mit Odds=1

Milchleistung	beprobte Tiere	<i>stx</i> -positive Tiere	Anteil	Odds-Ratio	95% KI	Signifikanz
hoch	388	103	26,6%	1,34	0,92-1,95	n.s.
mittel	469	113	24,1%	1,24	0,87-1,77	n.s.
niedrig	388	80	20,6%	1,00	-	-
trocken stehend	182	50	27,5%	1,36	0,88-2,11	n.s.

hohe Leistung: Milchleistung der Kuh befindet sich mehr als 10% über dem Betriebs- und Laktationsabschnitt-spezifischen Mittel
 mittlere Leistung: Milchleistung der Kuh weicht nach oben oder unten nicht mehr als 10% von dem Betriebs- und Laktationsabschnitt-spezifischen Mittel ab
 niedrige Leistung: Milchleistung der Kuh liegt mehr als 10% unter dem Betriebs- und Laktationsabschnitt-spezifischen Mittel
 n.s.: nicht signifikant -: nicht vorhanden KI: Konfidenzintervall

Eine Prüfung der Anteile in der Screening-PCR als *stx*-positiv nachgewiesener Kühe, die in Bezug auf den prozentualen Fett- und Laktosegehalt, sowie dem Harnstoffgehalt und dem pH-Wert in der Milch von den empfohlenen Normwerten abwichen, ergaben keine signifikanten Assoziationen der genannten Variablen mit dem *stx*-Nachweis mittels Screening-PCR (Karch und Meyer, 1989). Lediglich Tiere, in deren Milch der Harnstoffgehalt geringer als 150 mg/L betrug, wiesen im Vergleich zu den in der Norm befindlichen Tieren ein tendenziell erniedrigtes Risiko auf, in der Screening-PCR als *stx*-positiv erkannt zu werden. Signifikante Risikofaktoren waren vor allem die Zellzahl, aber auch der Eiweißgehalt in der Milch. Kühe mit Zellzahlen bis 100.000 Zellen/mL Milch wurden in der Screening-PCR 1,57-fach häufiger als *stx*-positiv identifiziert als

Tiere mit höheren Zellzahlen in der Milch. Ebenso hatte ein Eiweißgehalt von mehr als 3,00% in der Milch eine Erhöhung der Chance zur Folge, von der Screening-PCR als *stx*-positiv nachgewiesen zu werden.

Tabelle 29: Bewertung des Risikos eines *stx*-Nachweises im Kot der Probenkühe mittels Screening-PCR in Assoziation mit den Milchinhaltsstoffen, Berechnung der Odds-Ratio mit Modell 1 (*stx*-Nachweis mittels Screening-PCR), aufgetragen gegen die Referenzwerte mit Odds=1

Variable	Werte	Referenz (Odds =1)	OR	95% KI	Signifikanz	Norm ¹
Zellgehalt (/mL Milch)	<100.000	≥100.000	1,57	1,18-2,10	***	<100.000
Eiweißgehalt (in Prozent)	3,00-3,80	<3,00	1,80	1,06-3,08	**	3,00-3,80
	>3,80		2,30	1,18-4,48	**	
Fettgehalt (in Prozent)	<3,50	3,50-3,80	0,81	0,49-1,35	n.s.	2,9-5,0
	>3,80		0,78	0,55-1,13	n.s.	
Laktosegehalt (in Prozent)	<4,7	4,7-5,0	1,01	0,74-1,36	n.s.	4,7-5,0
	>5,0		0,72	0,30-1,73	n.s.	
Harnstoffgehalt (mg/L)	<150	150-300	0,69	0,45-1,06	*	150-300
	>300		1,37	0,94-2,01	n.s.	
pH-Wert	<6,6	6,6-6,7	1,51	0,84-2,73	n.s.	6,6-6,7
	>6,7		1,07	0,78-1,47	n.s.	

***: hoch signifikant

** : signifikant

*: Tendenz

n.s.: nicht signifikant

¹: Referenz: Grabowski (2000)

KI: Konfidenzintervall

L: Liter

mL: Mililiter

mg: Milligramm

OR: Odds-Ratio

4.2.1.2 Assoziation des *stx*-Nachweises mittels Screening-PCR und weiteren untersuchten Merkmalen (Berechnung mit Modell 1)

Weiterhin erfolgte eine statistische Auswertung bezüglich der Bewirtschaftungsform, sowie den erhobenen Gesundheitsmerkmale und den BCS-Werten.

Dieses Modell ergab keinen statistisch signifikanten Unterschied in den Prävalenzen ökologisch und konventionell bewirtschafteter Betriebe. Dies gilt ebenso für alle erhobenen Gesundheitsmerkmale, die keine statistisch signifikante Assoziation mit dem Anteil der *stx*-positiven Tiere aufweisen.

Bei der Auswertung in Bezug auf den Ernährungszustand wurde deutlich, dass Kühe mit einem BCS über 3,50 im Vergleich zu dünneren Tieren eine nahezu doppelt so große Chance haben, in der Screening-PCR als *stx*-positiv identifiziert zu werden (**Tabelle 30**).

Tabelle 30: Bewertung des Risikos eines *stx*-Nachweises im Kot der Probenkühe mittels Screening-PCR in Assoziation mit dem Ernährungszustand, erfasst in Form des Body Condition Scores, Berechnung in Form von Odds-Ratio mit Modell 1 (*stx*-Nachweis mittels Screening-PCR), aufgetragen gegen die jeweiligen Referenzwerte (Odds=1)

Variable	Werte	Referenz (Odds=1)	OR	95%-KI	Signifikanz	Norm ¹
BCS	1,00-2,50	2,75-3,50	1,06	0,68-1,65	n.s.	2,75-3,50
	3,75-5,00					
	3,50-5,00	1,00-3,25	1,92	1,22-3,04	**	

** : signifikant n.s.: nicht signifikant OR: Odds-Ratio KI: Konfidenzintervall

BCS: Body Condition Score

¹: Referenz: Fritze (2003)

4.2.1.3 Assoziation des *stx*-Nachweises mittels Screening-PCR und des Monates der Probenahme (Berechnung mit Modell 1)

Auf die Assoziationen der Anzahl absolvierter Laktationen, des Laktationsstadiums und der Anwesenheit eines kontinuierlich ausscheidenden Tieres in der Herde mit dem Risiko eines *stx*-Nachweises mittels Screening-PCR wird in den jeweiligen Kapiteln (4.2.1.1.1, 4.2.1.1.2 und 4.2.2) eingegangen. In diesem Kapitel wird nun die Saisonalität der *stx*-Ausscheidung erläutert.

Wie in **Abbildung 8** erkennbar, wurden im Spätsommer und Frühherbst (August, September und Oktober) in der Screening-PCR die höchsten Prävalenzen über die gesamte Tierzahl beobachtet. Die Unterschiede der OR im Vergleich der Monate gegeneinander sind in **Tabelle 31** dargestellt. Vom Monat Juli lagen aus betriebstechnischen Gründen des LKV keine Laktationsdaten der Kühe vor, so dass für diesen Monat keine Werte berechnet wurden.

Am deutlichsten wurden die Prävalenz-Höhepunkte im Vergleich der Monate August, September und Oktober mit den Frühjahrsmonaten Februar, März und April. Hier sind für die genannten Spätsommer- bzw. Herbstmonate nahezu durchweg signifikante OR von 1,91 bis 3,22 (95%-Konfidenzintervalle im Anhang 10.3) errechnet worden (**Tabelle 31**). Lediglich im Vergleich zu März bestand für den Monat August nur ein tendenzieller Unterschied. Dies entsprach deutlich höheren Ausscheidungschancen im Spätsommer und Herbst. Weiterhin existierten tendenzielle bis signifikante Unterschiede im Januar (OR=2,12; 95%-KI=1,14-3,94) und Juni (OR=1,94; 95%-KI=0,94-3,26) im Vergleich zu April. Neben den bereits erwähnten Frühjahrsmonaten wies der Oktober im Vergleich zu Mai (OR=1,84; 95%-KI=1,06-3,19), November (OR=1,80; 95%-KI=1,05-3,10) und Dezember (OR=2,11; 95%-KI=1,20-3,71) erhöhte Odds-Ratio auf.

4 Ergebnisse

Tabelle 31: Bewertung des Risikos eines *stx*-Nachweises im Kot der Probenkühe mittels Screening-PCR in Assoziation mit dem Probenahme-Monat, Berechnung in Form von Odds-Ratio mit Modell 1 (*stx*-Nachweis mittels Screening-PCR), aufgetragen gegen die jeweiligen Probenahme-Monate (Odds=1)

Monat	Jan	Feb	Mrz	Apr	Mai	Jun	Aug	Sept	Okt	Nov	Dez
Jan	×	1,88*	1,64	2,12**	1,21	1,10	0,91	0,86	0,67	1,20	1,39
Feb	0,53*	×	0,87	1,13	0,65	0,58	0,50**	0,46**	0,35***	0,64	0,74
Mrz	0,61	1,14	×	1,29	0,74	0,67	0,57*	0,52**	0,37***	0,66	0,85
Apr	0,47**	0,89	0,77	×	0,57*	0,52**	0,44***	0,41***	0,32***	0,57*	0,66
Mai	0,82	1,55	1,35	1,75*	×	0,90	0,77	0,71	0,55**	0,99	1,15
Jun	0,91	1,72	1,50	1,94**	1,11	×	0,85	0,78	0,60*	1,08	1,27
Aug	1,08	2,03**	1,77*	2,29***	1,31	1,18	×	0,93	0,72	1,29	1,50
Sept	1,17	2,19**	1,91**	2,47***	1,41	1,28	1,07	×	0,78	1,41	1,62*
Okt	1,52	2,85***	2,49***	3,22***	1,84**	1,66*	1,40	1,30	×	1,80**	2,11***
Nov	0,84	1,58	1,38	1,78*	1,02	0,92	0,78	0,72	0,56**	×	1,17
Dez	0,72	1,35	1,18	1,52	0,87	0,79	0,66	0,62*	0,48***	0,87	×

Fett, schwarz: signifikant

Mrz: März

Apr: April

Aug: August

Sept: September

Okt: Oktober

Nov: November

Dez: Dezember

***: hoch signifikant

Mai: Mai

Okt: Oktober

Nov: November

Dez: Dezember

** : signifikant

Jun: Juni

Nov: November

*: Tendenz

Jan: Januar

Feb: Februar

grau Schrift: nicht signifikant

Jul: Juli, fehlt aufgrund unvollständigen Datenmaterials

Dez: Dezember

4.2.2 Statistische Auswertung mit Modell 2 (STEC-Nachweis mittels Kolonie-Hybridisierung) auf Einzeltierebene

Aufgrund der ungleichmäßigeren Verteilung der positiven und negativen Ergebnisse für die Tiere, von denen STEC isoliert wurden – von 1.646 untersuchten Proben gelang nur bei 134 (8,1%) eine Isolierung von STEC – war das oben genannte Modell für dieses Datenmaterial nicht anwendbar. Eine Einteilung der Daten in eine geringere Klassenanzahl war notwendig und daraus ergab sich eine geringere Aussagekraft des statistischen Modells. Signifikanz war folgenden Faktoren zuzumessen:

- dem Quartal der Probenahme,
- der Anzahl der absolvierten Laktationen,
- dem Laktationsstadium,
- der Anwesenheit eines kontinuierlich ausscheidenden Tieres in der Herde.

4.2.2.1 Ergebnisse unter Berücksichtigung der Laktation

4.2.2.1.1 Assoziation der Präsenz von STEC im Kot und der Anzahl absolvierter Laktationen (Berechnung mit Modell 2 –STEC-Nachweis mittels Kolonie-Hybridisierung)

Wie bereits erwähnt, wurden 293 Tiere in der ersten Laktation (Gruppe 1), 626 Kühe in zweiter und dritter Laktation (Gruppe 2) und 508 Tiere, die schon mehr als drei Laktationen absolviert hatten (Gruppe 3), beprobt. Wie in **Tabelle 32** dargestellt, zeigten auch die Prävalenzwerte der Tiere, bei denen eine Isolierung von STEC möglich war, eine Verminderung bei steigender Anzahl absolvierter Laktationen (von 8,9% auf 8,3%).

Tabelle 32: Bewertung des Risikos einer STEC-Isolierung aus dem Kot der Probenkühe mittels Kolonie-Hybridisierung in Assoziation mit der Anzahl absolvierter Laktationen, Angabe von Anteilen gelungener STEC-Isolierungen bei Probenkühen, sowie den jeweiligen Odds Ratio, die mit Modell 2 (STEC-Nachweis mittels Kolonie-Hybridisierung) berechnet wurden, Sortierung nach Laktationsgruppen, aufgetragen gegen Laktationsgruppe 3 mit Odds=1

Gruppe	beprobte Tiere	STEC-positiv	Anteil	Odds-Ratio	95%-KI	Signifikanz
1	293	26	8,9%	1,68	0,95-2,96	*
2	626	53	8,5%	1,38	0,88-2,17	n.s.
3	508	42	8,3%	1,00	-	-

*: Tendenz n.s.: nicht signifikant KI: Konfidenzintervall -: nicht vorhanden

Gruppe 1: Erstkalbende Gruppe 2: Zweit- und Drittkalbende

Gruppe 3: Kühe mit mehr als drei absolvierten Laktationen

Bei der statistischen Auswertung zeigte sich, dass die Odds-Ratio (OR) für Kühe der Gruppe 1 mit einer 1,68-fachen Erhöhung im Vergleich zur Gruppe 3 in der Tendenz erhöht ist. Die erhöhte OR der Gruppe 1 im Vergleich zur Gruppe 2 war in diesem Modell nicht signifikant.

4.2.2.1.2 Assoziation der Präsenz von STEC im Kot und dem Laktationsstadium (Berechnung mit Modell 2 – STEC-Nachweis mittels Kolonie-Hybridisierung)

Die Unterschiede der STEC-Prävalenzen von Kühen in unterschiedlichen Laktationsabschnitten waren aufgrund des ungünstigen Verhältnisses positiver zu negativer Tiere im Allgemeinen nicht signifikant. Eine Ausnahme stellt der Abschnitt vom 301. bis zum 350. Laktationstag dar, diese Tiere hatten im Vergleich zu Tieren innerhalb der ersten 50. Laktationstage eine tendenziell erniedrigte Chance ($OR=0,24$; $95\%-KI=0.05-1.15$), als STEC-Ausscheider identifiziert zu werden (**Tabelle 33**).

Tabelle 33: Bewertung des Risikos einer STEC-Isolierung aus dem Kot der Probenkühe mittels Kolonie-Hybridisierung in Assoziation mit dem Laktationstag, Angabe von Anteilen gelungener STEC-Isolierungen bei Probenkühen, sowie den jeweiligen Odds Ratio, die mit Modell 2 (STEC-Nachweis mittels Kolonie-Hybridisierung) berechnet wurden, Sortierung nach Laktationsstadien, aufgetragen gegen 0.-50. Laktationstag mit Odds=1

Laktationsstadium	beprobte Tiere	STEC-positiv	Anteil STEC-positiv	Odds-Ratio	95%-KI	Signifikanz
0.-50.d	152	10	6,6%	1,00	-	-
51.-100.d	175	15	8,6%	1,27	0.53-3.02	n.s.
101.-150.d	192	13	6,8%	1,05	0.43-2.55	n.s.
151.-200.d	186	17	9,1%	1,27	0.54-2.99	n.s.
201.-250.d	166	12	7,2%	1,12	0.45-2.78	n.s.
251.-300.d	155	15	9,7%	1,62	0.68-3.86	n.s.
301.-350.d	105	2	1,9%	0,24	0.05-1.15	*
>350.d	114	15	13,2%	1,98	0.82-4.81	n.s.
trocken stehend	182	22	12,1%	1,82	0.80-4.13	n.s.

*: Tendenz n.s.: nicht signifikant KI: Konfidenzintervall
 -: nicht vorhanden d: Tag

Gegenüber der Klasse der Tiere vom 301. bis zum 350. Laktationstag weisen hingegen alle anderen Laktationsklassen signifikant oder zumindest tendenziell erhöhte OR auf, diese sind in **Tabelle 34** dargestellt.

Tabelle 34: Bewertung des Risikos einer STEC-Isolierung aus dem Kot der Probenkühe mittels Kolonie-Hybridisierung in Assoziation mit dem Laktationstag, Angabe von Anteilen gelungener STEC-Isolierungen bei Probenkühen, sowie den jeweiligen Odds Ratio, die mit Modell 2 (STEC-Nachweis mittels Kolonie-Hybridisierung) berechnet wurden, Sortierung nach Laktationsstadien, aufgetragen gegen Laktationsklasse „300.-350. Laktationstag“ (Odds=1)

Laktationsstadium	Anteil STEC-positiv	Odds-Ratio	95%-KI	Signifikanz
0.-50.d	6,6%	4,15	0,87-19,82	*
51.-100.d	8,6%	5,26	1,15-24,05	**
101.-150.d	6,8%	4,34	0,94-20,06	*
151.-200.d	9,1%	5,25	1,16-23,71	**
201.-250.d	7,2%	4,62	0,99-21,51	*
251.-300.d	9,7%	6,70	1,147-30,50	**
301.-350.d	1,9%	1,00	-	-
>350.d	13,2%	8,21	1,79-37,69	***
trocken stehend	12,1%	7,54	1,71-33,31	***

***: hoch signifikant

** : signifikant

*: Tendenz

n.s.: nicht signifikant

KI: Konfidenzintervall

-: nicht vorhanden

d: Tag

4.2.2.1.3 Assoziation der Präsenz von STEC im Kot und der Milchleistung und den Milchinhaltsstoffen (Berechnung mit Modell 2 – STEC-Nachweis mittels Kolonie-Hybridisierung)

Der Anteil an STEC-ausscheidenden Kühen nahm in den unterschiedlichen Milchleistungsgruppen von der hochleistenden Kuh (mehr als 10% über dem Betriebs- und Laktationsabschnitt-spezifischen Mittel) bis hin zur niedrigleistenden Kuh (weniger als 10% unter dem Betriebs- und Laktationsabschnitt-spezifischen Mittel) ebenfalls ab (**Tabelle 35**). Dieser Zusammenhang war ebenfalls nicht signifikant. Lediglich im Vergleich zu den trocken stehenden Kühen, die die höchsten Prävalenzwerte aufwiesen, zeigte sich eine tendenzielle Erhöhung der Odds im Vergleich zur Klasse der niedrigleistenden Tiere.

Tabelle 35: Bewertung des Risikos einer STEC-Isolierung aus dem Kot der Probenkühe mittels Kolonie-Hybridisierung in Assoziation mit der Milchleistung, Angabe von Anteilen gelungener STEC-Isolierungen bei Probenkühen, sowie den jeweiligen Odds Ratio, die mit Modell 2 (STEC-Nachweis mittels Kolonie-Hybridisierung) berechnet wurden, Sortierung nach Milchleistung, aufgetragen gegen niedrige Milchleistung mit Odds=1

Milchleistung	beprobte Tiere	STEC-positiv	Anteil STEC-positiv	Odds-Ratio	95%-KI	Signifikanz
hoch	388	34	8,76	0,92	0,52-1,65	n.s.
mittel	469	38	8,10	1,04	0,60-1,81	n.s.
niedrig	388	27	6,96	1,00	-	-
trocken stehend	182	22	12,09	1,44	0,71-2,94	n.s.

hohe Leistung: Milchleistung der Kuh befindet sich mehr als 10% über dem Betriebs- und Laktationsabschnitt-spezifischen Mittel
mittlere Leistung: Milchleistung der Kuh weicht nach oben oder unten nicht mehr als 10% von dem Betriebs- und Laktationsabschnitt-spezifischen Mittel ab
niedrige Leistung: Milchleistung der Kuh liegt mehr als 10% unter dem Betriebs- und Laktationsabschnitt-spezifischen Mittel
n.s.: nicht signifikant -: nicht vorhanden KI: Konfidenzintervall

Wie in Modell 1 (*stx*-Nachweis mittels Screening-PCR) ergaben sich in diesem Modell wenige Milchinhaltsstoffe als Risikofaktoren. Zwischen der Chance, als STEC-Ausscheider identifiziert zu werden und der somatischen Zellzahl, dem Harnstoffgehalt, sowie dem prozentualen Laktosegehalt bestanden keine signifikanten Zusammenhänge (**Tabelle 36**).

Eine tendenzielle Erniedrigung der Odds für ein positives Ergebnis war lediglich für Tiere feststellbar, deren prozentualer Eiweißgehalt im empfehlenswerten Bereich zwischen 3,00% und 3,80% lag (OR=0,37 im Vergleich zu Werten <3,00%). Ebenso hatten Tiere mit prozentualen Fettgehalten von über 3,80% eine erniedrigte Odds (OR= 0,41 im Vergleich zu Werten zwischen 3,50% und 3,80%) als *stx*-positiv identifiziert zu werden. Eine erhöhte Chance wiesen hingegen Tiere mit Milch-pH-Werten von unter 6,6 im Vergleich zu Tieren, deren Milch-pH im empfehlenswerten Bereich lag, auf (OR=2,98).

Tabelle 36: Bewertung des Risikos einer STEC-Isolierung aus dem Kot der Probenkühe mittels Kolonie-Hybridisierung in Assoziation mit den Milchinhaltsstoffen, Angabe von Anteilen gelungener STEC-Isolierungen bei Probenkühen, sowie den jeweiligen Odds Ratio, die mit Modell 2 (STEC-Nachweis mittels Kolonie-Hybridisierung) berechnet wurden, aufgetragen gegen Referenzwerte mit Odds=1

Variable	Werte	Referenz (Odds=1)	Odds Ratio	95%-KI	Signifikanz	Norm ¹
Zellgehalt (mL Milch)	<100.000	≥100.000	0,79	0,38-1,65	n.s.	<100.000
Eiweißgehalt (in Prozent)	3,00-3,80	<3,00	0,37	0,15-0,93	**	3,00-3,80
	>3,80		0,86	0,28-2,64	n.s.	
Fettgehalt (in Prozent)	<3,50	3,50-3,80	0,82	0,26-2,59	n.s.	2,9-5,0
	>3,80		0,41	0,16-1,06	*	
Laktosegehalt (in Prozent)	<4,7	4,7-5,0	0,77	0,35-1,71	n.s.	4,7-5,0
	>5,0		0,78	0,08-7,43	n.s.	
Harnstoffgehalt (mg/L)	<150	150-300	1,66	0,71-3,84	n.s.	150-300
	>300		0,58	0,12-2,92	n.s.	
pH-Wert	<6,6	6,6-6,7	2,98	0,97-9,16	*	6,6-6,7
	>6,7		1,69	0,69-4,15	n.s.	

** : signifikant * : Tendenz
¹ : Referenz: Grabowski (2000)

n.s.: nicht signifikant
 ml: Milliliter

KI: Konfidenzintervall
 mg: Milligramm

L: Liter

4.2.2.2 Assoziation der Präsenz von STEC im Kot und weiteren untersuchten Merkmalen (Berechnung mit Modell 2 – STEC-Nachweis mittels Kolonie-Hybridisierung)

Auch in diesem Modell wurde eine statistische Auswertung in Hinsicht auf die Bewirtschaftungsform, sowie die erhobenen Gesundheitsmerkmale und den Body-Condition-Score (BCS)-Werten vorgenommen.

Hier zeigte sich ein höchst signifikanter Effekt der Bewirtschaftungsform mit einer erniedrigten Chance auf Seiten der konventionellen Betriebe (OR=0,35***; 95%-KI=0,21-0,58).

Wie im ersten Modell wurden für die erhobenen Gesundheitsmerkmale keine statistisch signifikanten Assoziationen mit der Anzahl der STEC-ausscheidenden Tiere identifiziert.

Hingegen ergab eine Auswertung bezüglich des erhobenen BCS signifikante Zusammenhänge: im Vergleich zu Tieren mit BCS-Werten kleiner als 3,50 hatten Tiere mit einem $BCS \geq 3,50$ eine hoch signifikant höhere Chance (OR=3,07; 95%-KI=1,50-6,32), STEC auszuschcheiden (**Tabelle 37**). Ebenso zeigte sich, dass Über- oder Unterkonditionierung eine tendenziell erhöhte Chance (OR=1,81; 95%-KI=0,89-3,68) beinhaltet, als STEC-Ausscheider detektiert zu werden.

Tabelle 37: Bewertung des Risikos einer STEC-Isolierung aus dem Kot der Probenkühe mittels Kolonie-Hybridisierung in Assoziation mit dem Ernährungszustand, erfasst in Form des Body Condition Scores, Angabe von Anteilen gelungener STEC-Isolierungen bei Probenkühen, sowie den jeweiligen Odds Ratio, die mit Modell 2 (STEC-Nachweis mittels Kolonie-Hybridisierung) berechnet wurden, aufgetragen gegen Referenzwerte mit Odds=1

Variable	Werte	Referenz (Odds =1)	Odds Ratio	95%-KI	Signifikanz	Norm ¹
BCS	1,00-2,50 3,75-5,00	2,75-3,50	1,81	0,89-3,68	*	2,75-3,50
	3,50-5,00	1,00-3,25	3,07	1,50-6,32	***	

***: hoch signifikant

*: Tendenz

BCS: Body condition Score

KI: Konfidenzintervall

¹: Referenz: Fritze et al. (2003)

4.2.2.3 Assoziation der Präsenz von STEC im Kot und dem Zeitpunkt der Probenahme (Berechnung mit Modell 2 – STEC-Nachweis mittels Kolonie-Hybridisierung)

Eine Auswertung der Assoziation der Saison in Hinsicht auf das Ergebnis der STEC-Isolierung war aufgrund der ungünstigeren Verteilung der Ergebnisse nicht, wie in Modell 1 (*stx*-Nachweis mittels Screening-PCR), für jeden Probenahme-Monat einzeln möglich. Stattdessen musste eine Einteilung in Quartale vorgenommen werden. In diesem Modell erwies sich die Chance, im Quartal 1 als STEC-Ausscheider erkannt zu werden, als höchst signifikant erniedrigt im Vergleich zu allen anderen Quartalen (**Tabelle 38**). Hingegen war im Quartal 4 mit 13,9% der höchste Anteil an STEC-ausscheidenden Tieren zu detektieren; dies spiegelt sich ebenfalls in den erhöhten Odds ($OR_{4 \text{ vs. } 1}=20,13$, $OR_{4 \text{ vs. } 2}=1,74$ $OR_{4 \text{ vs. } 3}=1,52$) dieses Quartals im Vergleich zu den anderen wider.

Tabelle 38: Bewertung des Risikos einer STEC-Isolierung aus dem Kot der Probenkühe mittels Kolonie-Hybridisierung in Assoziation mit dem Quartal der Probenahme, Angabe von Anteilen gelungener STEC-Isolierungen bei Probenkühen, sowie Berechnung in Form von Odds-Ratio mit Modell 2 (STEC-Nachweis mittels Kolonie-Hybridisierung), aufgetragen gegen die jeweiligen Quartale (Odds=1)

Quartal	Quartal (Odds=1)				Anteil STEC-Ausscheider
	1	2	3	4	
1	×	0,09**** (0,03-0,30)	0,08**** (0,02-0,25)	0,05**** (0,02-0,16)	0,8%
2	11,56**** (3,40-39,34)	×	0,88 (0,50-1,53)	0,58** (0,34-0,98)	10,1%
3	13,22**** (4,01-43,61)	1,14 (0,65-2,00)	×	0,66* (0,42-1,04)	10,0%
4	20,13**** (6,16-65,81)	1,74** (1,02-2,98)	1,52* (0,97-2,40)	×	13,9%

Quartal 1: Februar, März, April

Quartal 2: Mai, Juni, Juli

Quartal 3: August, September, Oktober

Quartal 4: November, Dezember, Januar

Fett: signifikant

******:** höchst signifikant

****:** signifikant

***:** Tendenz

graue Schrift: nicht signifikant

in Klammern: 95%-Konfidenzintervall

4.2.3 Vergleich der Risikobewertungen verschiedener Faktoren durch Modell 1 (*stx*-Nachweis mittels Screening-PCR) und Modell 2 (STEC-Nachweis mittels Kolonie-Hybridisierung)

Ein Vergleich der beiden Modelle war nur unter Vorbehalt durchzuführen, da die bei Modell 1 (*stx*-Nachweis mittels Screening-PCR) vorgenommene Einteilung aufgrund der ungleichmäßigeren Verteilung positiver und negativer Ergebnisse zur Berechnung von Modell 2 (STEC-Nachweis mittels Kolonie-Hybridisierung) verändert werden musste. Zu erwähnen ist hier zum Einen die Veränderung der Gruppierung vom einzelnen Probenahme-Monat hin zu Quartalen. Zur Berechnung der Signifikanz des zusätzlichen Datenmaterials (Milchleistung- und Inhaltsstoffe, Gesundheits- und Ernährungszustand) war es zusätzlich notwendig, die Anzahl der Klassen der Laktationsabschnitte zu verringern: Hier wurden für Modell 2 (STEC-Nachweis mittels Kolonie-Hybridisierung) aus den insgesamt neun 50 Laktationstage beinhaltenden Gruppen vier 100 Laktationstage umfassende Klassen gebildet (Klasse 1: 1.-100. Laktationstag, Klasse 2: 101.-200. Laktationstag, Klasse 3: 201.-300. Laktationstag, Klasse 4: 301. Laktationstag bis zur Kalbung).

4.2.3.1 Vergleich der Ergebnisse der beiden Modelle unter Berücksichtigung der Laktation

4.2.3.1.1 Vergleich der Assoziationen des *stx*-Nachweises mittels Screening-PCR (Berechnung mit Modell 1) und des STEC-Nachweises mittels Kolonie-Hybridisierung (Berechnung mit Modell 2) mit der Anzahl absolvierter Laktationen

In beiden Modellen wurde im Vergleich zur Laktationsnummerngruppe 3 eine erhöhte Odds für erstlaktierende Kühe bestimmt. Die in Modell 1 (*stx*-Nachweis mittels Screening-PCR) errechnete signifikante Differenz von Laktationsnummerngruppe 2 und den Erstkalbinnen konnte in Modell 2 (STEC-Nachweis mittels Kolonie-Hybridisierung) nicht bestätigt werden.

4.2.3.1.2 Vergleich der Assoziationen des *stx*-Nachweises mittels Screening-PCR (Berechnung mit Modell 1) und des STEC-Nachweises mittels Kolonie-Hybridisierung (Berechnung mit Modell 2) mit dem Laktationsstadium

Übereinstimmend ergaben beide Modelle für Tiere in den ersten 50 Laktationstagen niedrigere Chancen eines positiven Ergebnisses. Während die Anteile der als *stx*-positiv nachgewiesenen Kühe in Modell 1 (*stx*-Nachweis mittels Screening-PCR) jedoch ab dem 51. Laktationstag einen abfallenden Trend zeigten und in dem Laktationsabschnitt vom 301. bis 350. Tag die niedrigsten Odds aufwiesen, war diese Tendenz in Modell 2 (STEC-Nachweis mittels Kolonie-Hybridisierung) nicht zu erkennen. Die Prävalenzen der STEC-Ausscheider bewegten sich innerhalb des Bereiches von 6,8% bis 9,7%, wobei kein klarer Trend zu erkennen ist. Lediglich der Laktationsabschnitt vom 301. bis zum 350. Laktationstag ist auch in Modell 2 (STEC-

Nachweis mittels Kolonie-Hybridisierung) als Monat mit niedrigen Prävalenzen und sehr niedrigen Odds erkennbar. Übereinstimmend als Perioden höherer Prävalenzen stellen sich die Abschnitte ab dem 350. Laktationstag bis hin zur Kalbung dar, auch wenn dieser Unterschied nur in Modell 1 (*stx*-Nachweis mittels Screening-PCR) signifikant ist.

Auch die Unterschiede der anderen Klassen gegenüber der Klasse der Tiere vom 301. bis zum 350. Laktationstag zeigen sich in beiden Modellen übereinstimmend, in Modell 2 (STEC-Nachweis mittels Kolonie-Hybridisierung) weisen jedoch aufgrund der im Vergleich sehr niedrigen Prävalenzwerte der Klasse 301.-350. Laktationstag alle Klassen signifikant oder tendenziell höhere Odds auf (Kapitel 4.2.1.1.2 und 4.2.2.1.2). Dies ist in Modell 1 (*stx*-Nachweis mittels Screening-PCR) nur für die Abschnitte vom 51.-150. Laktationstag, sowie für Tiere mit mehr als 350 Laktationstagen und trocken stehende Kühe zutreffend.

4.2.3.1.3 Vergleich der Assoziationen des *stx*-Nachweises mittels Screening-PCR (Berechnung mit Modell 1) und des STEC-Nachweises mittels Kolonie-Hybridisierung (Berechnung mit Modell 2) mit der Milchleistung und den Milch Inhaltsstoffen

Der Zusammenhang der Milchleistung mit dem Ergebnis der Untersuchungen ist in beiden Modellen nicht signifikant. Anhand der Prävalenzwerte ist jedoch in beiden Fällen eine mit der Milchleistung abnehmende Wahrscheinlichkeit gegeben, ein Tier dieser Leistungsklasse als positiv nachzuweisen. Die trocken stehenden Kühe weisen hingegen von beiden Modellen übereinstimmend eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für ein positives Ergebnis auf.

Bei der Auswertung der Relevanz der Milch Inhaltsstoffe ergaben sich für die meisten Variablen ebenfalls übereinstimmende Trends, welche jedoch nur in wenigen Fällen signifikant waren (**Tabelle 39**). Nur für die Variable prozentualer Eiweißgehalt sind signifikant unterschiedliche Ergebnisse zu verzeichnen.

Tabelle 39: Vergleich der Risikobewertungen durch Modell 1 (*stx*-Nachweis mittels Screening PCR) und Modell 2 (STEC-Nachweis mittels Kolonie-Hybridisierung) in Assoziation mit den Milch Inhaltsstoffen, Berechnung von Odds-Ratio mit den jeweiligen Modellen, aufgetragen gegen die jeweiligen Referenzwerte (Odds=1)

Variable	Werte	Referenz (Odds = 1)		OR _{Modell 1}		OR _{Modell 2}
Zellgehalt (/mL Milch)	<100.000	≥100.000	↑	1,57***	→	0,79
Eiweißgehalt (in Prozent)	3,00-3,80	<3,00	↑	1,80**	↓	0,37**
	>3,80		↑	2,30**	→	0,86
Fettgehalt (in Prozent)	<3,50	3,50-3,80	→	0,81	→	0,82
	>3,80		→	0,78	→	0,41*
Laktosegehalt (in Prozent)	<4,7	4,7-5,0	→	1,01	→	0,77
	>5,0		→	0,72	→	0,78
Harnstoffgehalt (mg/L)	<150	150-300	→	0,69*	→	1,66
	>300		→	1,37	→	0,58
pH-Wert	<6,6	6,6-6,7	→	1,51	→	2,98*
	>6,7		→	1,07	→	1,69

↑: signifikant erhöht

↓: signifikant erniedrigt

→: nicht signifikant

***: hoch signifikant

** : signifikant

*: Tendenz

Modell 1: *stx*-Nachweis mittels Screening-

PCR Modell 2: STEC-Nachweis mittels Kolonie-Hybridisierung

95%-Konfidenzintervalle: siehe **Tabelle 29** und **Tabelle 36**

4.2.3.1.4 Vergleich der Assoziationen des *stx*-Nachweises mittels Screening-PCR (Berechnung mit Modell 1) und des STEC-Nachweises mittels Kolonie-Hybridisierung (Berechnung mit Modell 2) mit weiteren untersuchten Merkmalen

Bei dem Vergleich der beiden Modelle hinsichtlich der Bewirtschaftungsform ergab sich eine gegensätzliche Aussage, wobei der höchst signifikante Zusammenhang des in der Variablen-Einteilung eingeschränkteren Modells 2 vorsichtig zu betrachten ist.

Für die Bedeutung des Gesundheits- und Ernährungszustandes ergaben beide Modelle übereinstimmende Trends (**Tabelle 40**). Während sich in den Modellen keine signifikanten Zusammenhänge der Wahrscheinlichkeit eines positiven Ergebnisses mit den verschiedenen Gesundheitsmerkmalen feststellen ließen, hatte der Ernährungszustand übereinstimmend in beiden Modellen eine signifikante Assoziation, wobei auch hier wiederum das eingeschränktere Modell 2 (STEC-Nachweis mittels Kolonie-Hybridisierung) mehr tendenziell bis signifikante Zusammenhänge ergab.

Tabelle 40: Vergleich der Risikobewertungen durch Modell 1 (*stx*-Nachweis mittels Screening PCR) und Modell 2 (STEC-Nachweis mittels Kolonie-Hybridisierung) in Assoziation mit den Ernährungszustand, erhoben in Form des Body Condition Scores Berechnung von Odds-Ratio mit den jeweiligen Modellen, aufgetragen gegen die jeweiligen Referenzwerte (Odds=1)

Variable	Werte	Referenz (Odds=1)		OR _{Modell 1}		OR _{Modell 2}
BCS	1,00-2,50	2,75-3,50	→	1,06	→	1,81*
	3,75-5,00					
	3,50-5,00	1,00-3,25	↑	1,92**	↑	3,07***

↑: signifikant erhöht

→: nicht signifikant

BCS: Body Condition Score

***: hoch signifikant

**: signifikant

*: Tendenz

Modell 1: *stx*-Nachweis mittels Screening-PCR

Modell 2: STEC-Nachweis mittels Kolonie-Hybridisierung

95% Konfidenzintervalle: siehe jeweils **Tabelle 30** oder **Tabelle 37**

4.2.3.1.5 Vergleich der Assoziationen des *stx*-Nachweises mittels Screening-PCR (Berechnung mit Modell 1) und des STEC-Nachweises mittels Kolonie-Hybridisierung (Berechnung mit Modell 2) mit dem Zeitpunkt der Probenahme

Aufgrund der veränderten Einteilung in diesem Bereich stellt sich ein Vergleich der saisonalen Einflüsse besonders schwierig dar und ist nur unter Vorsicht und lediglich unter Vergleich der Trends der beiden Modelle zu interpretieren. Bei einer Berechnung des Modells 1 mit der veränderten Einteilung von Modell 2 (STEC-Nachweis mittels Kolonie-Hybridisierung) stellen sich die OR, wie in **Tabelle 41** gezeigt, überwiegend übereinstimmend dar. Eine Ausnahme sind die Quartale 3 und 4 im Vergleich. Während Modell 1 (*stx*-Nachweis mittels Screening-PCR) im Vergleich zu Quartal 4 für das Quartal 3 eine signifikant niedrigere OR ausgibt, besteht nach Aussage des Modells 2 eine tendenziell höhere OR für das Quartal 4 im Vergleich zu Quartal 3.

Tabelle 41: Vergleich der Risikobewertungen durch Modell 1 (*stx*-Nachweis mittels Screening-PCR) und Modell 2 (STEC-Nachweis mittels Kolonie-Hybridisierung) in Assoziation mit den Quartal der Probenahme, Berechnung von Odds-Ratio mit den jeweiligen Modellen, aufgetragen gegen die jeweiligen Quartale (Odds=1)

	Quartal (Odds=1)							
	1 Modell 1	1 Modell 2	2 Modell 1	2 Modell 2	3 Modell 1	3 Modell 2	4 Modell 1	4 Modell 2
1	×	×	↓ 0,61**	↓ 0,09****	↓ 0,43****	↓ 0,08****	↓ 0,63**	↓ 0,05****
2	↑ 1,64**	↑ 11,56****	×	×	→ 0,70*	→ 0,88	→ 1,02	↓ 0,58**
3	↑ 2,35****	↑ 13,22****	→ 1,43*	→ 1,14	×	×	↑ 1,47**	→ 0,66*
4	↑ 1,60**	↑ 20,13****	→ 0,98	↑ 1,74**	↓ 0,68**	→ 1,52*	×	×

Quartal 1: Februar, März, April

Quartal 2: Mai, Juni, Juli

Quartal 3: August, September, Oktober

Quartal 4: November, Dezember, Januar

Modell 1 *stx*-Nachweis mittels Screening-PCR

Modell 2: STEC-Nachweis mittels Kolonie-Hybridisierung

****: höchst signifikant

** : signifikant

*: Tendenz

↑: signifikant erhöht

↓: signifikant erniedrigt

→: nicht signifikant

95%-Konfidenzintervalle: siehe Anhang 10.4

4.2.4 Analyse Tier-individueller *stx*-Ausscheidungsmuster

Bei der Beurteilung der Tier-individuellen Ausscheidungsmuster wurden nur die Tiere berücksichtigt, die mindestens bei sechs Probenahmen untersucht wurden. Dies beinhaltet in dieser Studie 140 Kühe. Bei Tieren, die seltener als sechs Mal beprobt wurden, ist es möglich, dass STEC-Ausscheider aufgrund des kurzen Beprobungszeitraums nicht erkannt werden.

Von den 140 untersuchten Kühen waren in der Screening-PCR lediglich 18 Tiere (12,9%) nie als *stx*-positiv nachzuweisen. Die anderen 122 Kühe (87,1%) waren in der Probenahme-Periode mindestens in einer Screening-PCR *stx*-positiv. Ein Großteil der Tiere (98, 70,0%) waren jedoch in weniger als 50% ihrer Proben *stx*-positiv, wohingegen ein kleinerer Teil von 24 Tieren (17,1%) bei mehr als der Hälfte ihrer Probenahmen als *stx*-positiv ermittelt wurde (**Abbildung 19**).

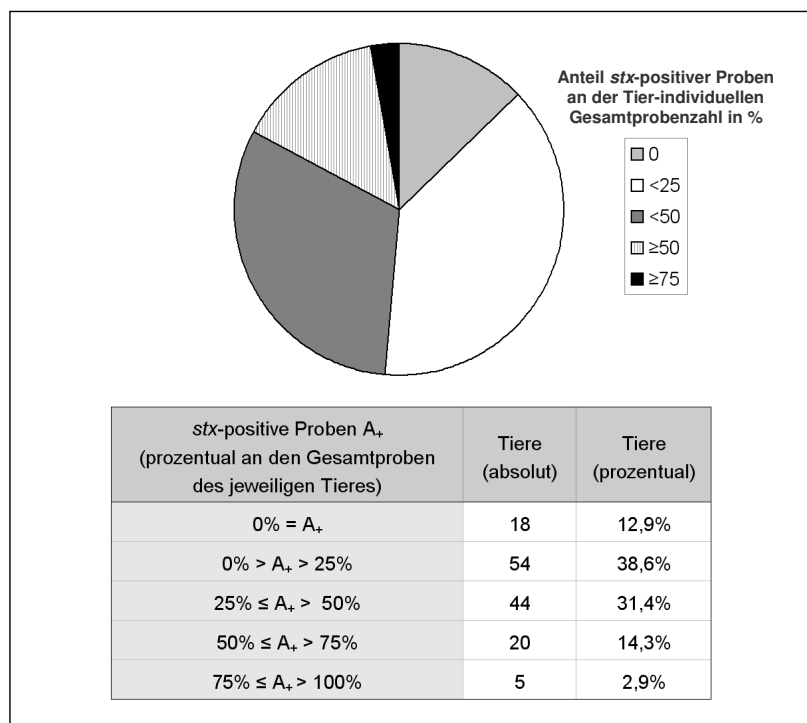


Abbildung 19: Verteilung der *stx*-Ausscheidungshäufigkeiten von mindestens sechsfach beprobten Milchkühen (n=140) innerhalb des zwölfmonatigen Probenzeitraums, *stx*-Nachweis erfolgte aus Kotproben mittels Screening-PCR nach Karch und Meyer (1989)

Die Bedeutung der mehrmaligen Beprobung ist zu ermessen, wenn die Ausscheidungshäufigkeiten der mindestens sechs Mal beprobten Tiere mit denen der zwölfmalig beprobten 90 Tiere verglichen werden (**Abbildung 20**).

Nur noch ein Tier (1,1%) wurde bei den zwölf Probenahmen nie als *stx*-positiv nachgewiesen. Die anderen 89 Tiere (98,9%) waren zumindest einmalig in der Screening-PCR *stx*-positiv. Der Anteil der Tiere, die bei bis zu 50% ihrer Proben als *stx*-positiv nachgewiesen wurden, zeigte keine große Veränderung (70,0% vs. 73,4% bei zwölf Probenahmen). Hingegen stieg der Anteil der Tiere, die bei mehr als 50% ihrer Proben *stx*-positiv waren, deutlich von 17,2% auf 25,5%.

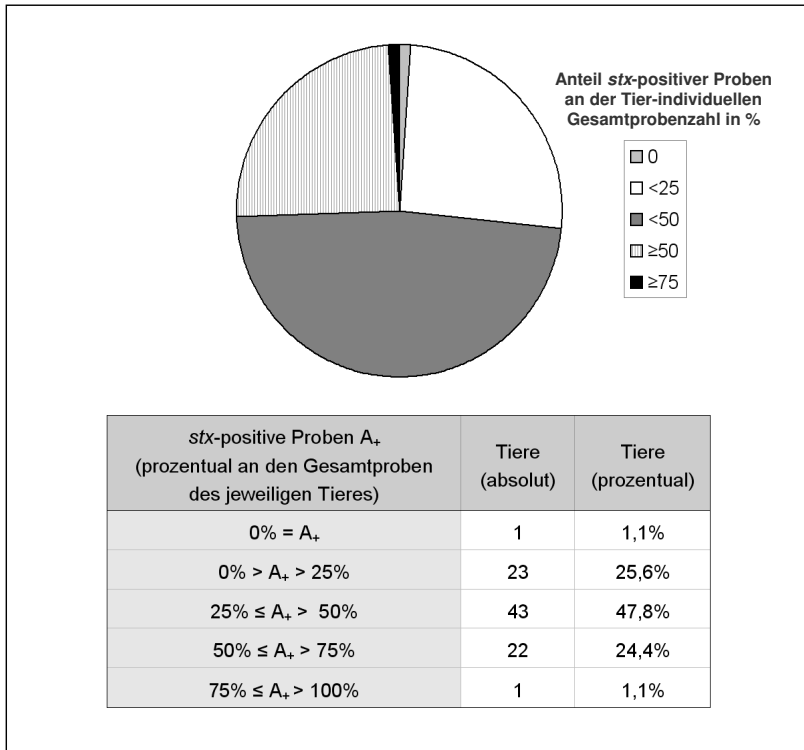


Abbildung 20: Verteilung der *stx*-Ausscheidungshäufigkeiten von zwölfmalig beprobten Milchkühen ($n=90$) innerhalb des zwölfmonatigen Probenzeitraums, *stx*-Nachweis erfolgte aus Kotproben mittels Screening-PCR nach Karch und Meyer (1989)

Weiterhin wurde die individuelle Ausscheidungsdauer von den mindestens sechsfach beproben, mindestens einmal als *stx*-positiv nachgewiesenen 122 Tieren analysiert (**Abbildung 21**).

Bei 57 Kühen (40,7%) wurde bei sechs bis zwölf aufeinander folgenden Probenahmen eine maximale Ausscheidungsdauer von einer Probenahme ermittelt; direkt nachfolgende Kotproben waren in der Screening-PCR negativ. Von diesen Tieren konnten jedoch 29 der 57 Tiere (50,9%) als intermittierend *stx*-positiv identifiziert werden: 21 Tiere (36,8%) waren bei einer weiteren, nicht direkt nachfolgenden Probenahmen in der Screening-PCR *stx*-positiv. Bei acht Kühen (14,0%) ergab die Screening-PCR sogar bei drei nicht aufeinander folgenden Probenahmen ein positives Ergebnis.

Insgesamt 46 Kühe (32,9%) wurden bei maximal zwei (28 Tiere) bzw. drei (18 Tiere) Probenahmen in Folge als *stx*-positiv nachgewiesen. Dabei waren für nur elf Tiere (23,9%) diese zwei Probenahmen der einzige positive Nachweis, die anderen 35 Kühe wurden auch bei weiteren, wenn auch nicht den direkt darauf folgenden Probenahmen als *stx*-positiv nachgewiesen. So wurde bei 17 Kühen (37,0%) eine weitere Periode positiver Ergebnisse an ein bis zwei aufeinanderfolgenden Probenahmeterminen festgestellt. Bei 14 Tieren (30,4%) wurden sogar zwei und bei vier Kühen (8,7%) sogar drei weitere Ausscheidungsperioden identifiziert.

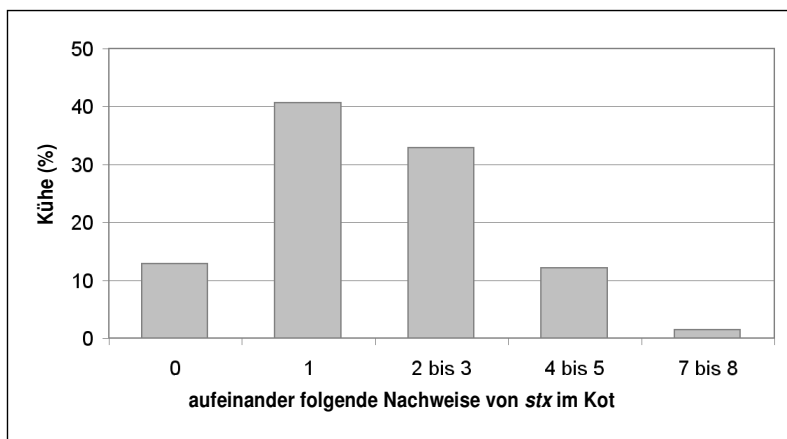


Abbildung 21: Maximale Anzahl der aufeinander folgenden *stx*-positiven Proben in der Screening-PCR für alle mindestens sechsfach beproben, mindestens einmal *stx*-positiven Milchkühe ($n=122$) innerhalb des zwölfmonatigen Probenzeitraums, *stx*-Nachweis erfolgte aus Kotproben mittels Screening-PCR nach Karch und Meyer (1989)

Immerhin 17 Kühe (13,9%) wurden bei vier (zwölf Tiere) oder fünf (fünf Tiere) aufeinander folgenden Probenahmen von der Screening-PCR als *stx*-positiv identifiziert. In dieser Gruppe der länger ausscheidenden Kühe waren 70,6% (12) der Tiere lediglich in der eben erwähnten, vier Probenahmen andauernden Periode (vier Kühe, 23,5%) und einer weiteren, kürzeren Periode (acht Tiere, 47,1%) – meist bei ein bis zwei aufeinander folgenden Beprobungen – *stx*-positiv. Weitere vier Kühe wiesen zusätzlich zur vier- bzw. fünf Beprobungen andauernden Ausscheidungsperiode drei oder vier positive Einzelproben auf.

Zwei Kühe (1,6%) zeichneten sich durch deutlich überdurchschnittlich positive Probenzahlen aus. Bei einer Kuh waren an sieben aufeinanderfolgenden Probenahmen, bei einer anderen an acht Probenahmen in Folge STEC mittels Screening-PCR nachzuweisen. Da das letzte Tier zusätzlich noch eine positive Einzelprobe hatte, waren diese beiden Tiere bei über 75% der Beprobungen *stx*-positiv (Kuh 1: sieben von neun Beprobungen, 77,8%; Kuh 2: neun von zwölf Beprobungen, 75,0%).

Mindestens vier aufeinander folgende positive Kotproben in der Screening-PCR hatten 19 der 140 Probenkühe (13,6%). Die Tiere stammten aus vier Betrieben: vier Tiere von Betrieb A, sieben Kühe von Betrieb B, drei Tiere von Betrieb D und fünf Kühe von Betrieb E. Im Folgenden wurden kontinuierlich ausscheidende Tiere als Kühe mit einem positiven Ergebnis in der Screening-PCR bei vier aufeinander folgenden Probenahmen und in mindestens der Hälfte ihrer gesamten Proben definiert. Nach dieser Definition erwiesen sich 14 Tiere als kontinuierlich ausscheidende Tiere. Alle vier Tiere von Betrieb A, fünf der sieben Tiere von Betrieb B, eines der drei Tiere von Betrieb D, sowie vier der fünf Tiere von Betrieb E wurden somit als kontinuierlich ausscheidende Tiere identifiziert.

Auf den Betrieben C und F wurde kein kontinuierlich ausscheidendes Tier identifiziert. In Betrieben mit kontinuierlich ausscheidenden Tieren wurde mittels Screening-PCR eine durchschnittliche Prävalenz *stx*-positiver Kotproben von 30,2% festgestellt, während die durchschnittliche Prävalenz in Betrieben ohne kontinuierlich ausscheidende Tiere bei 14,6% lag. Dieser Unterschied war bei den Tieren mit STEC-Nachweis im Kot (Modell 2) noch deutlicher zu erkennen. Hier lag die durchschnittliche STEC-Prävalenz bei Betrieben ohne kontinuierlich ausscheidende Tiere bei durchschnittlich 0,78%, die bei Betrieben mit kontinuierlich ausscheidenden Tieren hingegen bei 12,26%.

Bei einer Berücksichtigung des Vorhandenseins eines kontinuierlich ausscheidenden Tieres im Betrieb in der statistischen Auswertung wurde mit beiden Modellen eine höchst signifikante Assoziation (****) identifiziert. Im Vergleich zu Tieren, die in einer Herde ohne ein kontinuierlich ausscheidendes Tier gehalten wurden, haben Tiere, die in einer Herde zusammen mit einem kontinuierlich ausscheidenden Tier gehalten wurden, nach Modell 1 (*stx*-Nachweis mit der Screening-PCR) eine 2,63****-fache OR (95%-KI=1,90-3,64), *stx*-Ausscheider zu sein. Modell 2 (STEC-Nachweis mittels

Kolonie-Hybridisierung) gibt sogar eine 5,78****-fache OR aus (95%-K=2,80-11,94), STEC-Ausscheider zu sein. Der Argumentation folgend, dass die Prävalenzen in den entsprechenden Betrieben durch die vorhandenen kontinuierlich ausscheidenden Tiere erhöht waren, wurde das Modell 1 (*stx*-Nachweis mit der Screening-PCR) testweise unter Entfernung der kontinuierlich ausscheidenden Tiere aus dem Datenmaterial durchgerechnet. Es ergab sich eine immer noch höchst signifikante OR von 2,27**** (95%-KI=1,62-3,19). Modell 2 (STEC-Nachweis mittels Kolonie-Hybridisierung) konnte auf diese Weise nicht ausgewertet werden, da die Kühe, bei denen die Isolierung von STEC gelang, zum Großteil kontinuierlich ausscheidende Tiere waren.

4.3 Weitere Analyse ausgewählter Isolate

Von als kontinuierlich ausscheidend definierten Kühen gewonnene STEC-Isolate wurden aufgrund ihres Virulenzprofils gruppiert und jeweils ein Stamm jeder Virulenzmustergruppe wurde weiteren Untersuchungen unterzogen. Eine Überprüfung der Serovarzugehörigkeit und der Stoffwechselaktivität wurde vorgenommen.

4.3.1 Serotypisierung und Virulenzmuster

Von 70 serotypisierten *E. coli*-Isolaten besaßen 61 ein *stx*-Gen. Die Isolate gehörten 24 verschiedenen Serovaren an, wobei 70,0% der Isolate den sechs am häufigsten vorkommenden Serovaren zuzuordnen waren. Die häufigste Serovare stellte mit 17 Isolaten (24,3%) O113:H- dar, eine beim Durchfall-erkrankten Menschen ebenfalls nachzuweisende Serovare (MicroBioNet, 2008). Etwas weniger häufig wurden die Serovare O22:H8 (10 Isolate, 14,3%) und O8:H19 (3 Isolate, 4,3%) gefunden. Beide werden auch mit der Auslösung von HUS beim Menschen assoziiert (MicroBioNet, 2008). Der bisher lediglich von gesunden Rindern isolierten Serovare O130:H11 gehörten sechs untersuchte STEC (8,6%) an. Des Weiteren wurden sieben STEC der nicht typisierbaren Serovare Ont:H25 zugeordnet. Sechs *E. coli*, die größtenteils kein *stx*-Gen trugen, gehörten der Serovare Ont:H7 an. Die Zugehörigkeit der weiteren Isolate ist in **Tabelle 43** dargestellt.

Auffällig ist das häufig vorkommende Virulenzmuster mit *stx*₂- oder *stx*₁- und *stx*₂-, sowie *EHEC-hly*_A-Nachweis, welches 74,3% aller Isolate zeigen.

4.3.2 Weitere Charakterisierung

Insgesamt 68 der 70 Isolate (97,1%) besaßen die Fähigkeit, Sorbitol eines Sorbitol-MacConkey-Agars innerhalb von 24h zu fermentieren. Lediglich zwei Isolate (2,9%) waren auf dem Sorbitol-MacConkey-Agar als nicht Sorbitol-fermentierend zu identifizieren. **Tabelle 42** stellt die Eigenschaften dieser zwei Isolate dar.

Tabelle 42: Eigenschaften der auf Sorbitol-MacConkey-Agar nicht Sorbitol-fermentierenden STEC-Isolate, gewonnen mittels Kolonie-Hybridisierung aus Kotproben von Kuh B18 von Betrieb B

Serovare	Virulenzprofil	Sorbitol-Fermentation
Ont:H19	<i>stx₂</i> +, <i>EHEC-hly_A</i> +	negativ
O113:H-	<i>stx₁</i> +, <i>stx₂</i> +, <i>EHEC-hly_A</i> +	negativ

Tabelle 43: Serovarzugehörigkeit und Virulenzprofile ausgewählter STEC-Isolate (n=61), gewonnen von als kontinuierlich ausreichend definierten Kühen (Auswahl der Isolate nach Gruppierung aufgrund ihres Virulenzprofils, jeweils ein Stamm jeder Virulenzprofilgruppe wurde serotypisiert)

Serovare	Anzahl Isolate	Virulenzgene			Wirte (MicroBioNet, 2008)
		stx ₂ + EHEC- hly _A +	stx ₁ +, stx ₂ + EHEC- hly _A +	andere Kombination von Virulenzgenen als linksstehend	
O113:H-	17	13	2	1 (stx ₂ +)	Rind, Mensch (Df)
O22:H8	10	4	5	1 (stx ₁ +, EHEC-hly _A +)	Rind, Mensch (Df, HUS)
Ont:H25	7	5	1	1 (stx ₂ +, eae+)	Rind, Mensch (Df)
O130:H11	6	2	4		Rind
O8:H19	3	2			Rind, Mensch (Df, HUS)
O18:H8	2	1		1 (stx ₁ +, EHEC-hly _A +)	-
O113:H21	2	2			Rind, Mensch (Df, HUS, TTP)
O138:H34	2	1		1 (stx ₂ +)	Rind
O5:H7	1		1		Rind
O8:H21	1			1 (stx ₁ +)	Mensch (HUS)
O28:H31	1	1			-
O80:H45	1	1			-

-: bisher nicht bei (MicroBioNet, 2008) eingetragen Rind: gesundes Rind Mensch: gesunder Mensch Mensch (Df): Mensch mit Durchfall
Mensch (TTP): Mensch mit Thrombotisch-Thrombozytopenischer Purpura Mensch (HUS): Mensch mit Hämolytisch-Urämischem Syndrom

Tabelle 43 (Fortsetzung): Serovarzugehörigkeit und Virulenzprofile ausgewählter STEC-Isolate (n=61), gewonnen von als kontinuierlich ausscheidend definierten Kühen (Auswahl der Isolate nach Gruppierung aufgrund ihres Virulenzprofils; jeweils ein Stamm jeder Virulenzprofilgruppe wurde serotypisiert)

Serovare	Anzahl Isolate	Virulenzgene			Wirte (MicroBioNet, 2008)
		<i>stx₂₊</i> <i>EHEC-hly_{A+}</i>	<i>stx₁₊</i> , <i>stx₂₊</i> <i>EHEC-hly_{A+}</i>	andere Kombination von Virulenzgenen als linksstehend	
O91:H7	1	1			Rind
O150:H8	1		1		Rind
Ont:H19	1	1			Rind, Mensch (Df)
Ont:H21	1	1			Rind, Mensch (Df)
Ont:H39	1	1			-
Ont:H42	1	1			Rind
Orauh:H-	1	1			Rind, Mensch (Df, HUS)
Orauh:H2	1			1(<i>stx₁₊</i> , <i>eae+</i> , <i>EHEC-hly_{A+}</i>)	Rind, Mensch
Orauh:Hnt	1	1			Rind, Mensch (Df)
Ont:H7	6			1 (<i>stx₂₊</i>)	Rind, Mensch (Df)
O39:H7	1				Rind
Ont:Hnt	1				Rind, Mensch (Df)

-: bisher nicht bei (MicroBioNet, 2008) eingetragen
 Rind: gesundes Rind Mensch: gesunder Mensch Mensch (Df): Mensch mit Durchfall
 Mensch (TTP): Mensch mit Thrombotisch-Thrombozytopenischer Purpura Mensch (HUS): Mensch mit Hämolytisch-Urämischem Syndrom

4.3.2.1 Ausscheidung verschiedener STEC-Serovaren bei Einzeltieren

Die 61 serotypisierten und weiter charakterisierten STEC stammten von sieben Kühen. Bei vier kontinuierlich ausscheidenden Tieren wurden im Kot auch bei aufeinander folgenden Probenahmen immer verschiedene Serovare identifiziert, die zum Teil humanpathogenes Potential aufwiesen. Bei den übrigen drei kontinuierlich ausscheidenden Tieren, die alle von Betrieb B stammten, scheinen andere Mechanismen relevant zu sein. Hier kann anhand der Ergebnisse der Serotypisierung ein Infektionsverlauf in der Herde skizziert werden. Das Tier B18 gehört zu den ursprünglichen Probestieren und wurde über den gesamten Zeitraum von zwölf Monaten beprobt, wohingegen die Kühe B6 und B15 erst ab Mai bzw. Juni als Ersatztiere für abgegangene Tiere heran gezogen wurden, so dass sie lediglich im Zeitraum Mai bzw. Juni 2007 bis Januar 2008 beprobt werden konnten (**Abbildung 22**).

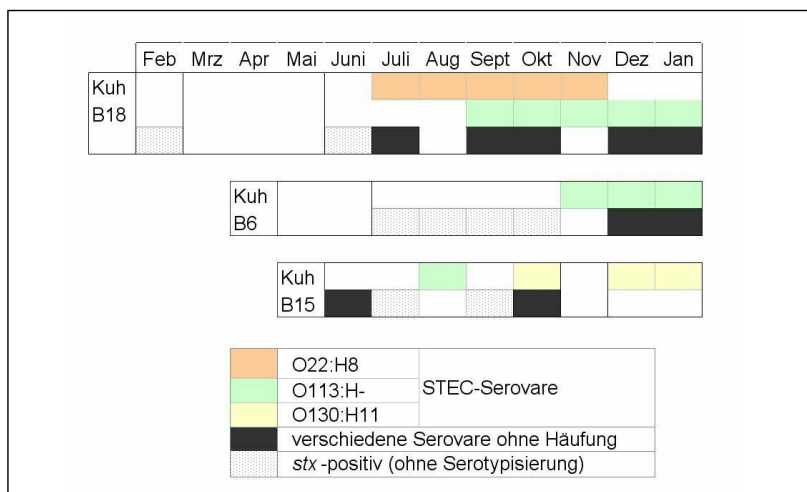


Abbildung 22: *stx*-Ausscheidungsmuster der Kühe von Betrieb B, von denen STEC isoliert und serotypisiert wurden (B18, B6, B15) über den Zeitraum der Probenahme (Kuh B18 von Februar 2007 bis Januar 2008; Kuh B6 von Mai 2007 bis Januar 2008 und Kuh B15 von Juni 2007 bis Januar 2008) unter Angabe von Häufungen derselben Serovaren (O22:H8, O113:H- und O130:H11)

Feb: Februar Mrz: März Apr: April Mai: Mai Juni: Juni Juli: Juli
 Aug: August Sept: September Okt: Oktober Nov: November Dez: Dezember
 verschiedene Serovaren ohne Häufung: beinhaltet Einzelnachweise von O5:H7, O8:H19, O28:H31, O80:H45, O91:H7, O113:H21, O138:H34, O150:H8, Ont:H7, Ont:H21, Ont:H25, Ont:H42 und Orauh:H-

Auffällig ist, dass beispielsweise die Serovare O113:H- im August zunächst einmalig bei Kuh B15 isoliert wurde und im September bei Kuh B18 bzw. im November bei Kuh B6 bei mehreren, aufeinander folgenden Probenahmen nachgewiesen wurden. Zusätzlich wurden auch bei diesen drei Tieren diverse andere Serovare (O5:H7, O8:H19, O28:H31, O80:H45, O91:H7, O113:H21, O138:H34, O150:H8, Ont:H7, Ont:H21, Ont:H25, Ont:H42 und Orauh:H-) ein- oder mehrmalig bei Probenahmen im Kot nachgewiesen (**Tabelle 43**), jedoch waren keine länger andauernden Ausscheidungsperioden dieser Serovare bei den untersuchten Kühen feststellbar.

Weiterhin wurden die Serovare O22:H8 und O130:H11 bei diesen drei Kühen isoliert. Bei anderen Probenahmen wurden die Tiere lediglich als *stx*-positiv nachgewiesen, eine Isolierung von STEC gelang nicht. Diese Serovare wurden ebenfalls bei den Kühen B18 und B15 isoliert, jedoch ohne sich auf andere untersuchte Tiere der Herde zu verbreiten.

5 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, die Entwicklung von STEC-Prävalenzen in verschiedenen Milchvieh-haltenden Betrieben über den Zeitraum eines Jahres zu verfolgen und Risikofaktoren für die STEC-Ausscheidung zu analysieren. Die zu diesem Zweck ausgewählten Probestiere wurden im monatlichen Rhythmus kontinuierlich beprobt. Dies führte zu einer Identifikation von Tieren, die häufiger als andere Kühe als *stx*-positiv nachgewiesen wurden. Weitere Kuh-bedingte Risikofaktoren wurden über eine Analyse der erfassten Daten in Kombination mit Leistungsdaten des Landeskontrollverbandes Schleswig-Holstein sowie ebenfalls erhobenen Tiergesundheitsdaten festgestellt.

5.1 Bewertung der angewandten Methodik

5.1.1 Diskussion der Methoden zur Identifikation der STEC-Ausscheider

Die angewandte Screening-PCR wurde bereits 1989 als adäquate Methode zur Differenzierung positiver und negativer Kotproben eingeführt (Karch und Meyer, 1989). Der Vorteil dieser Methode ist eine Erfassung nahezu aller *Stx*-Typen – lediglich *Stx*_{2f} wird nicht detektiert – in nur einer PCR (Karch und Meyer, 1989; Schmidt et al., 2000). Dies führte zu einer Etablierung der PCR als empfohlene Methode zum Screening von Hackfleischproben (Anonymus, 2002). Infolge der zügigen Identifikation der positiven Proben mit dieser PCR ist ein deutlicher zeitlicher und ökonomischer Nutzen in Hinblick auf eine Weiterbearbeitung der Proben in der Koloniehybridisierung gegeben. Die relative Robustheit der PCR in Kombination mit der Verwendung einer sehr thermostabilen *Thermus brockianus*-Polymerase führt selbst bei größere DNA-Mengen von nontoxinogenen *E. coli* (bis zu 10⁷/μl Bouillon) bei einem Vorhandensein von 10² cfu STEC zu sichtbaren Banden in der PCR, so dass hier nicht von Interferenzen auszugehen ist (Karch und Meyer, 1989). Lediglich die Bandenintensität der einzelnen STEC im Gel unterschied sich trotz gleicher PCR-Rahmenbedingungen, so dass hier von kleineren Sequenzvariationen des Shiga-Toxins zum Primer ausgegangen werden muss (Karch und Meyer, 1989). Auch in der vorliegenden Studie ist nicht auszuschließen, dass undeutliche Banden eventuell fälschlicherweise als negativ gewertet wurden. Trotz der niedrigen Annealing-Temperaturen von 43°C wurden keine unspezifischen Bindungen der Primer an non-Target-Sequenzen beobachtet (Karch und Meyer, 1989). Dieses Ergebnis bestätigt auch eine In-silico-Analyse der Primersequenzen mit BLAST: Passende Nukleotidsequenzen mit einem entsprechenden, etwa 230bp großen PCR-Amplifikat werden nur bei Vorhandensein eines *stx*-Gens synthetisiert. Als problematisch stellte sich jedoch der direkte Einsatz der aus dem Kot gewonnenen Isolate dar, da vermutlich eine Interferenz von Kotinhaltsstoffen mit der zur PCR verwendeten Polymerase bestand (Karch und

Meyer, 1989), so dass in dieser Arbeit auf die etwas aufwendigere Methode des Kotprobenupfers und das mehrmalige Waschen der Bakterienzellen in der DNA-Herstellung zurückgegriffen wurde. Zur Vermeidung einer PCR-Inhibition durch den im Verhältnis häufig wesentlich größeren Anteil der DNA der fäkalen Begleitflora an der Template-DNA wurde – wie von Thomas et al. (1994) empfohlen – ein vorheriger Anreicherungsschritt in Bouillon und eine starke Verdünnung der Template-DNA vorgenommen.

5.1.2 Diskussion der Methoden zur Isolierung der STEC

Zur Isolierung der STEC wurden mit den MK1/2-Primern entwickelte Oligonukleotid-Sonden verwendet. Für diese Sonden gelten im Wesentlichen die bereits erwähnten Vorteile der Primer MK1/2, verbunden mit einer besonderen Relevanz des Nachweises möglichst vieler *Stx*-Varianten, um die Anzahl der Durchgänge der arbeitsintensiven Koloniehybridisierung auf ein Minimum zu reduzieren. Die Koloniehybridisierung ist dabei zur Isolierung von STEC aus tierischen Matrizen eine empfohlene Methode (Anonymus, 2002). Sie zeichnet sich allerdings im Allgemeinen durch eine methodisch bedingte höhere Nachweisgrenze im Vergleich zur PCR aus (Dutta et al., 2001; Jensen et al., 2005), so dass zu erwarten ist, dass nicht alle durch die PCR mit den Primern MK1/2 als *stx*-positiv nachgewiesenen Tiere auch in der Koloniehybridisierung wieder als *stx*-positiv erkannt werden. Ein Nachteil der PCR ist weiterhin der Nachweis aller, also vitaler und non-vitaler Zellen, als *stx*-positiv, wohingegen in der Koloniehybridisierung nur wachstums- und vermehrungsfähige Zellen nachgewiesen werden. Durch die Notwendigkeit eines weiteren Kultivierungsschrittes auf Agarplatten zur Durchführung der Koloniehybridisierung ist durch die hohe Mobilität der *stx*-Phagen zusätzlich die Möglichkeit des *stx*-Genverlustes gegeben, wie er bei aus humanen klinischen Proben gewonnenen STEC beschrieben wurde (Karch et al., 1992; Mellmann et al., 2009; Mellmann et al., 2008). Von 407 in der PCR mit den Primern MK1/2 als *stx*-positiv nachgewiesenen Tieren wurden aus arbeitstechnischen Gründen nur Kotproben von 235 Tieren mit der Koloniehybridisierung untersucht. Bei einem Anteil von 67,2% (158 Tieren) gelang die Isolierung von *E. coli*-Kolonien, die sich bei 134 Tieren (57,0%) als STEC erwiesen. Ähnliche Isolierungsraten erreichten auch Geue et al. (2002), die bei 60,5% der im Screening als *stx*-positiv getesteten Tiere STEC isolierten. Aufgrund eines weiteren Subkultivierungsschrittes nach dem Picken der als STEC identifizierten Einzelkolonie für die PCR zur Charakterisierung der STEC bestand wiederum die mögliche Problematik eines *stx*-Genverlustes, so dass dadurch die eventuell lediglich scheinbar geringen Erfolgsraten bei der Isolierung resultieren.

Eine Einschränkung der Koloniehybridisierungs-Blots resultiert aus der Möglichkeit der Zuordnung der violetten Spots auf der Membran zu den auf dem Agar liegenden, abgeklatschten Kolonien. Bei einer zu hohen Dichte der Kolonien auf der Agarplatte ist die Gefahr der Anzucht falscher Kolonien besonders hoch. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit Agarplatten mit einer Besiedelung von maximal 500 Kolonien für die

Koloniehybridisierung ausgewählt. Von den gepickten Kolonien besaßen 1.105 von 1.146 *E. coli*-Isolaten ein oder mehrere *stx*-Gene; dies entspricht einer korrekten Identifikation von 78,1% der Isolate. Diese Isolierungs- und Erkennungsrate positiver Proben liegt jedoch immer noch weit über der, die bei einer zufälligen Auswahl einiger Kolonien einer vermutlich STEC enthaltenden Agarplatte festgestellt wird. Jensen et al. (2005) verglichen die Ergebnisse der Koloniehybridisierung mit und ohne vorherige Anreicherung, sowie die zufällige Auswahl einiger phänotypisch passender Kolonien mit den Ergebnissen einer RealTime (RT)-PCR für *Campylobacter jejuni*. Dabei wies eine Koloniehybridisierung mit vorheriger Anreicherung – ähnlich wie sie in dieser Studie durchgeführt wurde – eine Nachweisrate von 62,5% zur RT-PCR auf.

Aus 407 in der Screening-PCR *stx*-positiven Proben gelang eine Isolierung von STEC bei 134 Tieren (32,9%). Da aus Labor- und methodisch-bedingten Gründen lediglich die positiven Proben von 235 Kühen einer Koloniehybridisierung unterzogen wurden, liegt die Bestätigungsrate der Koloniehybridisierung durch Isolierung von STEC sogar bei 57,0%. Rogerie et al. (2001) gelang bei einer Prävalenzrate von 18,1% eine Isolierung von STEC bei 43,5% der positiven Proben. In einer weiteren Studie (Blanco et al., 1996) wurden nur bei 20,2% der PCR-positiven Proben STEC gewonnen, eine Rolle könnten auch hier die bereits oben erwähnten Verluste des *stx*-Gens und die Problematik der Ablesbarkeit der Kolonie-Hybridisierung sein.

5.2 Bewertung der erhobenen STEC-Prävalenzen

Zur Erhebung von Prävalenzen von der Serovare O157:H7 und anderen Serovaren bei Rindern im Allgemeinen und bei Milchvieh im Besonderen wurden in den letzten Jahren verschiedene Studien durchgeführt. Der Schwerpunkt der europäischen Studien lag, im Gegensatz zu vielen Arbeiten in den USA, auf den Non O157:H7-Serovaren; die Serovare O157:H7 wurde nur selten speziell untersucht.

Der in dieser Studie detektierte prozentuale Anteil von 24,7% *stx*-positiver Proben in der Screening-PCR befindet sich in einem Bereich von STEC-Prävalenzen, die bereits in mehreren deutschen und europäischen Studien mit ausreichend groß gewählter Probenanzahl bei gesunden Milchkühen (Geue et al., 2002; Messelhäuser, 2005; Zschöck et al., 2000) veröffentlicht wurden, auch wenn allgemein in Europa etwas niedrigere STEC-Prävalenzen von 11,0% bis 21,0% angenommen werden (Caprioli und Tozzi, 1998). In Deutschland wurden bei gesunden Kälbern STEC-Prävalenzen von 4,5% bis 12,9%, bei gesunden Rindern 9,4% bis 21,1% und bei gesunden Milchkühen 12,2% bis 37,4% (Beutin et al., 1993; Bülte et al., 2002; Bülte et al., 1990; Gallien, 1994; Geue et al., 2002; Richter et al., 1997; Wieler et al., 1992; Wieler et al., 2007; Zschöck et al., 2000) ermittelt.

Differenzen in der Höhe der Prävalenzen lassen sich zum Einen auf Unterschiede in der Methodik zurückführen, zum Anderen spielt auch die Art der Probenahme und des Probenumfangs eine entscheidende Rolle. So erfolgte beispielsweise in der Arbeitsgruppe um Zschöck (2000) ein Direktausstrich der Kotprobentupfer auf Gassner-Agar. Nach einem Bebrütungsschritt wurden 16 Laktose-fermentierende *E. coli*-Kolonien selektiert und auf *stx*-Gene untersucht. Dass die Nachweisgrenzen dieser Methode höher und die folglich damit nachzuweisenden Prävalenzen niedriger sind, zeigten bereits Jensen et al. (2005) im Methodenvergleich. Im Gegensatz dazu wurde in einer anderen Studie (Gallien, 1994) eine Koloniehybridisierung ohne vorherige Anreicherung durchgeführt. Andere Arbeitsgruppen schalteten vor die Koloniehybridisierung einen Anreicherungsschritt, der die Nachweisempfindlichkeit aus der ursprünglichen Probe erhöhen sollte (Geue et al., 2002). Aus dieser Kombination von vorheriger Anreicherung mit Screening-PCR und anschließender Koloniehybridisierung mit DIG-markierten Sonden resultierten die höchsten bisher nachgewiesenen Prävalenzen von bis zu 81,5% bei Mastrindern (Geue et al., 2002).

Von Bedeutung sind weiterhin die Art der Kotprobennahme und die Menge des untersuchten Materials. So scheint für einen Nachweis von O157:H7 die Probenentnahme mittels eines rektanalen Tupfers eine höhere Nachweisempfindlichkeit aufzuweisen als der direkte Nachweis des Erregers aus einer Kotprobe (Greenquist et al., 2005; Rice et al., 2003). Dies ist auf die bevorzugte Kolonisierung der Darmschleimhaut durch O157:H7 in der rektanalen Region zurückzuführen (Low et al., 2005; Naylor et al., 2003), welche mittels des rektanalen Tupfers direkt beprobt wird. Vergleichende Studien über den Nachweis und die

Isolierung von Non-O157:H7-Serovaren aus Kotproben und rektotoanalen Tupfern fehlen bislang, eine Kolonisierung des rektotoanalen Überganges des Rindes mit Non-O157:H7-Serovaren wurde bisher nicht nachgewiesen.

Relevant für die nachzuweisende Prävalenz ist ebenfalls auch die Anzahl der genommenen Kotproben. Bei größeren Probenzahlen besteht eine höhere Wahrscheinlichkeit für eine repräsentative Stichprobe. Ergebnisse von Studien mit geringeren Probenumfängen besitzen eine niedrigere Aussagekraft und bergen besonders bei Longitudinalstudien die Gefahr, dass bei mangelnder Beprobung von kontinuierlich ausscheidenden Tieren eine Unterschätzung der Prävalenz vorgenommen wird oder die Ausscheidungsperioden von kurzzeitig oder intermittierenden ausscheidenden Kühen nicht detektiert werden (Heuvelink et al., 1998c). Beim Vergleich der Verteilungen der Nachweis- und Ausscheidungsraten der sechsfach und zwölffach beprobten Tiere wird die Bedeutung einer mehrfachen und langfristigen Beprobung ersichtlich (Kapitel 4.2.4). Durch die eventuell intermittierende und größtenteils lediglich transiente Ausscheidung ist eine einmalige Probenahme zur Ermittlung von Herdenprävalenzen und zur Identifikation von STEC-Ausscheidern unzureichend.

In dieser Arbeit wurden 1.646 Proben untersucht, so dass es sich hierbei um eine Studie mit vergleichsweise großen Probenzahlen handelt und von einer repräsentativen Stichprobe auszugehen ist. Die Anzahl der genommenen Proben bei den deutschen Studien schwankt in den meisten Fällen zwischen 82 und 726 Proben (Beutin et al., 1993; Bülte et al., 1990; Messelhäuber, 2005; Richter et al., 1997; Zschöck et al., 2000), so dass verallgemeinernde Aussagen nur mit Vorsicht getroffen werden können. Lediglich in einer bisher durchgeführten Studie wurde mit 2.163 Tieren eine ausreichend große Stichprobe untersucht (Geue et al., 2002).

5.2.1 Diskussion des Einflusses von Stress auf die STEC-Ausscheidung

Zum Verständnis der Auswirkungen von Umwelt- und Management-bedingten Faktoren ist der Einfluss von Stress auf das Tier zu berücksichtigen. Stress wurde bereits in mehreren Studien als Risikofaktor für Ausscheidung von STEC identifiziert (Chase-Topping et al., 2007; Møller-Nielsen et al., 2002). Das Risiko einer STEC-Ausscheidung bei Stress resultiert aus Interaktionen zwischen dem Tier und den Mikroorganismen. Das enterische Nervensystem des Darmes besitzt verschiedene noradrenerge und dopaminerge Nervenendigungen (Costa et al., 2000). Bis zur Hälfte des im Körper eines Säugetiers synthetisierten Noradrenalin wird im enterischen Nervensystem hergestellt (Lyte, 2004). Bei Stress werden die Transmitter Noradrenalin und Dopamin auch ins Darmlumen abgegeben (Aneman et al., 1996; Eisenhofer et al., 1995). Eine Wirkung von Noradrenalin auf *E. coli* wurde in mehreren Studien untersucht: Noradrenalin fördert die Vermehrung, die Beweglichkeit, die Toxin-Expression, die Eisen-Aquisition von *E. coli* O157:H7 *in vitro* und die Adhäsion von *E. coli* O157:H7 *in vivo* (Chen et al., 2006; Freestone et al., 1999; Freestone et al., 2000;

Green et al., 2004; Lyte et al., 1996; 1997; Vlisidou et al., 2004). Für Noradrenalin, aber auch für Adrenalin ist eine Wirkung auf die bakterielle *Quorum Sensing*-Kommunikation der Bakterienzellen untereinander beschrieben. Unter dem Begriff *Quorum Sensing* werden Zell-zu-Zell-Signalmechanismen verstanden, mit Hilfe derer Bakterien in der Regel untereinander über chemische, Hormon-ähnliche Moleküle kommunizieren (Reading und Sperandio, 2006). Diese Moleküle werden als Autoinducer (AI) bezeichnet. Erreicht die Konzentration eines AI eine bestimmte Grenze, reagieren die Bakterien auf dieses Signal und verändern ihre Genexpression (Reading und Sperandio, 2006). Diese Art von Kommunikation besitzt bei Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien Bedeutung. Findet eine Kommunikation zwischen Bakterien und ihrem Wirt statt, so wird dies als „Interkingdom Signaling“ bezeichnet (Reading und Sperandio, 2006). Im Sinne dieses „Interkingdom Signaling“ besitzt *E. coli* O157:H7 sowohl Rezeptoren für die durch den Wirt in das Darmlumen abgegebene Katecholamine, wie die *Quorum sensing E. coli* Regulatoren (Qse) C und E, ist aber auch in der Lage, das Molekül AI-3 zu synthetisieren, welcher katecholaminerge Eigenschaften besitzt (Hughes und Sperandio, 2008). Über eine Bindung von Noradrenalin, Adrenalin oder AI-3 erfolgt eine Aktivierung der Sensorkinase QseC, welche über eine Phosphorelierung weitere Qse-Regulatoren aktiviert. QseC stimuliert über diese Signalkaskade die Transkription von LEE--kodierten, *stx*- und Flagellen-Genen (Hughes und Sperandio, 2008). Der Rezeptor QseE, der vermutlich ebenfalls über Noradrenalin, Adrenalin oder AI-3 aktiviert wird, ist auch an der Expression der LEE-kodierten Gene beteiligt (Reading et al., 2009). QseE induziert weiterhin die Bildung der Zellausläufer und der Aktin-Transformation bei der Entstehung der A/E-Läsionen (Reading et al., 2009; Reading und Sperandio, 2006; Reading et al., 2007). *Escherichia coli* besitzt zusätzlich das luxR-ähnliche Rezeptorprotein SdiA, der die Steroidhormon-ähnlichen Acyl-Homoserin-Laktone (AHL) binden kann (Reading und Sperandio, 2006). Zur Synthese von AHL ist ein luxI-Gen notwendig, welches *E. coli* und beispielsweise auch *Salmonella* nicht besitzen (Reading und Sperandio, 2006). AHL werden jedoch von verschiedenen anderen Bakterienspezies in der Magen-Darm-Flora hergestellt und sind deshalb im Darmlumen präsent (Reading und Sperandio, 2006). In verschiedenen Säugetierzellen (beispielsweise in neutrophilen Granulozyten und Makrophagen) rufen AHL Apoptose hervor, zudem besitzen sie proinflammatorische Eigenschaften (Hughes und Sperandio, 2008; Reading und Sperandio, 2006). In *E. coli* sind die Effekte einer Aktivierung von *sdiA* noch nicht hinreichend untersucht. Eine Beteiligung an der Zellteilung wurde zunächst vermutet, ist allerdings in neueren Studien widerlegt worden (Reading und Sperandio, 2006). Freestone et al. (2000) zeigten *in vitro* einen Einfluss von Noradrenalin auf die verbesserte Verfügbarkeit des an Laktoferrin und Transferrin gebundenen Eisens für die mikrobielle Flora, wobei das bakterielle Siderophor Enterobactin von besonderer Relevanz für die Eisen-Aquisition ist (Freestone et al., 2003).

Befindet sich eine Kuh in einer Stresssituation, so könnten alle oben erwähnten Interaktionen der vom Tier synthetisierten Katecholamine und Steroidhormone mit der mikrobiellen Flora des Magen-Darm-Traktes auftreten (Hughes und Sperandio, 2008). Es würde eine Steigerung der Virulenz von *E. coli* O157:H7 in Form einer erhöhten Adhäsions- und Kolonisationsfähigkeit folgen, aus der eine vermehrte STEC-Ausscheidung resultieren könnte. Über die Stimulation der Expression vieler Virulenzgene würde zudem das Risiko der Ausscheidung hochvirulenter STEC zunehmen, so dass hier von einem besonderen Risiko im Hinblick auf die Humanpathogenität auszugehen wäre.

5.2.2 Diskussion der Bedeutung der Laktationskennzahlen

Die Anzahl der absolvierten Laktationen und das Alter der Tiere sind eng assoziiert. Die erste Abkalbung erfolgt Management- und Betriebs-abhängig im Alter von 24 bis 30 Monaten. Angestrebt wird eine Zwischenkalbezeit von 365 Tagen, so dass die Tiere im Alter von 36 bis 42 Monaten zur zweiten Kalbung anstehen. Die Einteilung in die Anzahl der absolvierten Laktationen statt des Alters wurde vorgenommen, da sich Änderungen im Leben der Kuh – beispielweise in der Haltung und Fütterung – im Rahmen des Laktationszyklus ergeben. Die Umstallung der kurz vor der ersten Kalbung stehenden Färse in den Milchviehstall in ein bestehendes Herdengefüge, verbunden mit einer Umstellung von Jungviehfutter auf eine Fütterung für laktierende Tiere, stellt eine Belastungssituation dar. Zusätzlich zu den bereits beschriebenen Stress-Effekten wird eine durch den metabolischen und psychischen Stress verminderte Futteraufnahme vermutet, welche mit einer Pansenminderfunktion einhergeht (Buchko et al., 2000b; Wolin, 1969). Bei der Umstellung auf höhere Kraftfutteranteile verändert sich die Pansenflora, wodurch kurzfristig keine ausreichende Inhibition der STEC durch kurzkettige flüchtige Fettsäuren dort gegeben ist (Diez-Gonzalez et al., 1998; Kudva et al., 1995; 1997). Dadurch wird eine Aufnahme von STEC und die darauf möglicherweise folgende Kolonisierung des rektotoanal Übergangs erleichtert (Heuvelink et al., 1998c).

Im Pansen der Kuh könnten unter diesen Bedingungen ebenso Phagentransduktionen von *stx*-Genen auf nicht-Toxin bildende, kommensale *E. coli* stattfinden, wie sie bereits von Sekse et al. (2008) und Cornick et al. (2006) *in vivo* bei Schafen beobachtet wurden. Dies führt zur Entstehung von STEC-Varianten mit neuen Serovaren und würde ebenso die bovine Serovare-Vielfalt erklären. Shiga-Toxin-Bakteriophagen werden regelmässig in Wasser- und Bodenproben nachgewiesen (Creuzburg und Schmidt, 2007) und stellen somit eine potentiell Reservoir mit engem Kontakt zum Rind dar.

Das mit dem Alter der Tiere von Jungrind hin zur adulten Kuh abnehmende Risiko einer STEC-Ausscheidung ist bereits seit einigen Jahren bekannt (Kuhnert et al., 2005; Rugbjerg et al., 2003). Eine Risikogruppe mit deutlich erhöhter Ausscheidung zumindest für die Serovare O157:H7, stellen die zwei bis sechs Monate alten

Jungrinder dar (Moller-Nielsen et al., 2002). Aber auch innerhalb der adulten Milchrinder bestehen Unterschiede in der Ausscheidungshäufigkeit. Nach Moller-Nielsen et al. (2002) wiesen neben den jünger als zwei Monate alten Kälbern die älteren Milchkühe eine erniedrigte Prävalenz von STEC auf. Mehrfach wurde gezeigt, das pluripare Rinder seltener als STEC-Ausscheider identifiziert werden als Erstkalbinnen (Fitzgerald et al., 2003; Gunn et al., 2007; Moller-Nielsen et al., 2002; Stanford et al., 2005a). Diese Aussage wurde in einer Studie von Stanford et al. (2005a) quantifiziert; hier wiesen Erstkalbinnen mit einer OR von 2,6 eine etwas höhere Chance auf STEC-O157:H7-Ausscheidung auf als adulte Milchkühe. Dies ist ein Ergebnis, welches von den Daten dieser Studie untermauert wird. Beide Modelle ergaben zum Großteil signifikant erhöhte OR für eine STEC-Ausscheidung bei Erstkalbinnen, die im Vergleich zu älteren Kühen in Bereichen von 1,38 bis 1,74 lagen.

Aufgrund der oben erwähnten Stress-bedingten und Gruppen-dynamischen Prozesse sind Schwankungen des STEC-Ausscheidungsrisikos auch innerhalb des Laktationszyklus durchaus denkbar. Eine Abkalbung bedeutet für die Kuh, besonders auch für Erstkalbinnen, Stress durch Umstellungen, neue Herdenkonstellationen und umfangreiche Futterumstellungen mit verstärkter Kraffutterfütterung. Frühere Studien ergaben im Allgemeinen für die Serovare O157:H7 eine erhöhte Ausscheidungswahrscheinlichkeit direkt nach der Abkalbung, welche im Anschluss jedoch ab dem zweiten Laktationsmonat wieder deutlich abnahm (Mechie et al., 1997) um dann bis zum 200. Laktationstag erneut anzusteigen (Chase-Topping et al., 2007; Mechie et al., 1997; Syngue et al., 2003). Um den 350. Laktationstag wies die Forschergruppe um Mechie (1997) niedrigste Prävalenzen nach, die bei Tieren, die mit mehr als 350 Laktationstagen noch nicht trocken gestellt wurden, wieder anstiegen.

Über die Entwicklung der Prävalenzen von Non-O157:H7-STECS im Laktationszyklus ist bisher nichts bekannt, vermutet wird ein ähnlicher Verlauf, der jedoch bisher nicht bestätigt wurde. In der hier vorliegenden Arbeit wiesen die frisch abgekalbten Kühe niedrige STEC-Prävalenzen auf. Dies spricht für ein sorgfältiges und vorausschauendes Fütterungsmanagement mit guter Vorbereitungsfütterung bereits in den letzten Wochen der Trockenstehperiode. Weiterhin ist in den untersuchten Betrieben eine separate Haltung dieser Kühe über eine gewisse Zeit üblich, wodurch den Tieren Stress und die Auseinandersetzung mit der Herde zunächst erspart bleibt. Stattdessen ist diese Phase oft etwas nach hinten verschoben, dies wird durch die in dieser Studie nachgewiesenen ansteigenden Prävalenzen ab dem 50. Laktationstag sichtbar. Zudem kommt ein sich je nach Milchleistung allmählich wieder ausgleichendes postpartales Energiedefizit hinzu, welches nach der Kalbung dadurch entsteht, dass die Futteraufnahmekapazität des Tieres nicht in dem gleichen Maße ansteigt wie der Energiebedarf durch die Milchleistung. Diese negative Energiebilanz besteht immer abhängig von der jeweiligen Milchleistung und der Futteraufnahmekapazität des Tieres etwa über die ersten 100 Laktationstage (Butler und Elrod, 1992; Flachowsky et al., 2002). Die kurzfristig einsetzende, schnell ansteigende Milchproduktion nach der Kalbung stellt für die Kuh eine enorme

Stoffwechselbelastung dar und bedingt eine erhöhte Krankheitsanfälligkeit der Kuh in dieser Periode (Collard et al., 1999; Goff, 2006; Logue et al., 1999). Aus den auch bei gesunden Kühen nach der Abkalbung erhöhten Konzentrationen an Ketonkörpern im Blut resultieren inhibierende Effekte auf die Lymphozytenproliferation, ebenso wie eine Verminderung der Chemotaxis und Phagozytose der neutrophilen Granulozyten (Suriyasathaporn et al., 1999). Dies wäre ebenfalls ein Erklärungsansatz für die in dieser Periode nachgewiesenen höchsten Prävalenzen. Im Laufe der Laktation vermindern sich die Stressfaktoren für das Tier, die Milchleistung sinkt, das Tier ist an die Fütterung und Haltung adaptiert. Wie in der vorliegenden Arbeit und auch in anderen Studien nachgewiesen wurde, sinkt in diesem Zeitraum ebenfalls die STEC-Prävalenz. Höhere Prävalenzen treten erst wieder auf, wenn die Tiere sich nach mehr als 350 Tagen noch in Laktation befinden, aber auch bei den trocken stehenden Tieren, wie in der vorliegenden und anderen Arbeiten (Mechie et al., 1997) dargestellt wurde. Um hierfür mögliche Ursachen zu finden, muss geklärt werden, aus welchen Gründen die Tiere nach mehr als 350 Laktationstagen noch nicht trocken gestellt wurden. Gewünscht ist lediglich eine ökonomisch günstige 305-Tage-Leistung (Esslemont und Peeler, 1993), um das Tier im Anschluss für 60 Tage trocken zu stellen, so dass das Intervall zwischen den Kalbungen (Zwischenkalbezeit) 365 Tage beträgt. Denkbar wären hier Fertilitätsprobleme im eigentlichen Sinne ebenso wie die Fruchtbarkeit indirekt beeinflussende Erkrankungen, die mit einem verspäteten Trächtigkeitsbeginn und Beeinträchtigungen des Immunsystems einhergehen und dadurch zu einer längeren Laktationsdauer führen. Erhöhte OR für trocken stehende Kühe ergaben beide Modelle einheitlich, auch wenn in vorangegangenen Studien in den USA für die Serovare O157:H7 eine Reduktion der OR gezeigt wurde (Fitzgerald et al., 2003). Rohfaserreiche Fütterung und andere Faktoren in der Trockenstehperiode wurden bereits in verschiedenen Studien mit erniedrigten Prävalenzen O157:H7-STECS-positiver Rinder assoziiert (Callaway et al., 2003; Diez-Gonzalez et al., 1998). Bei den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Tieren scheinen jedoch andere Effekte zu überwiegen: So ist die Haltung der trocken stehenden Kühe häufig nicht optimal: Aufgrund mangelnder Platzverhältnisse im Winter entstehen Crowding-Effekte mit Stress für die Tiere und einer Anreicherung der STEC in der Umgebung. Im Sommer hingegen ist eine ausschließliche Weidehaltung üblich, wobei in vielen Betrieben dauerhaft beweidete Grünflächen für diese Tiere zur Verfügung stehen und eine Anreicherung der STEC im Boden wahrscheinlich scheint (Mukherjee et al., 2006; Ogden et al., 2002).

Eine Analyse auf statistische Assoziationen der Milchleistung und der Ausscheidung von Non-O157:H7-STECS führten bislang nur Kuhnert et al. (2005) durch. Wie in der vorliegenden Arbeit war bei Kuhnert et al. (2005) kein signifikanter statistischer Zusammenhang zu erkennen. Ein erhöhtes Risiko für eine STEC-Ausscheidung wäre jedoch aufgrund der erhöhten Stoffwechselbelastung, mit der eine hohe Milchleistung besonders in der Frühlaktation einhergeht, denkbar (Collard et al., 1999; Goff, 2006; Logue et al., 1999); dieser Trend war ebenfalls an den Prävalenzzahlen zu erkennen.

Die Studie von Kuhnert et al. (2005) ergab ebenfalls, dass hohe somatische Zellzahlen in der Milch ebenso wie ein andauerndes Leistungsplateau mit einer sich allmählich verringernden Milchleistung während der Laktation mit niedrigen STEC-Prävalenzen assoziiert waren. Die Ergebnisse der hier vorliegenden Studie bestätigten dies ebenfalls. Tiere mit einer niedrigeren Zellzahl als 100.000/mL Milch haben nach Modell 1 (*stx*-Nachweis mit der Screening-PCR) eine 1,57-fache Odds-Ratio als *stx*-positiv nachgewiesen zu werden. Ebenso weisen die beiden Betriebe C und F mit der durchschnittlich längsten Persistenz der Milchleistung die niedrigsten STEC-Prävalenzen auf. Der nach den Daten der vorliegenden Arbeit mit einem *stx*-positiven Ergebnis in der Screening-PCR assoziierte hohe prozentuale Eiweißgehalt in der Milch könnte auf einen Fütterungs-bedingten Überschuss an Energie zurückzuführen, welcher in anderen Studien bereits als die STEC-Ausscheidung fördernd erkannt wurde (Diez-Gonzalez et al., 1998; Rugbjerg et al., 2003; Tkalcic et al., 2000). Hingegen deuten niedrige Harnstoffgehalte in der Milch auf einen Fütterungs-bedingten Mangel an verwertbarem Rohprotein hin. In der vorliegenden Arbeit waren diese niedrigen Harnstoffgehalte der Milch mit einer tendenziellen Verminderung der STEC-Ausscheidungsrate assoziiert. Rohprotein-Mangel ist regelmäßig mit einer energiearmen Fütterung verbunden, für die bereits ein protektiver Zusammenhang mit dem Risiko der STEC-Ausscheidung nachgewiesen wurde (Diez-Gonzalez et al., 1998; Keen et al., 1999).

Zusammenfassen ist festzustellen, dass die Anzahl der absolvierten Laktationen ebenso wie der Laktationsabschnitt einer Kuh eine statistisch signifikante Assoziation mit dem Risiko einer Non-O157:H7-STECAusscheidung besitzt.

5.2.3 Diskussion der Bedeutung der weiteren erhobenen Merkmale

Eine ökologische Bewirtschaftung wird von der Öffentlichkeit in der Regel mit einer tiergerechteren Haltung gesünderer Tiere assoziiert. Das in dieser Arbeit erhobene Datenmaterial ergab bei der Auswertung mit den beiden verwendeten Modellen kontroverse Ergebnisse. Während Modell 1 (*stx*-Nachweis mit der Screening-PCR) keine signifikanten Effekte der Bewirtschaftungsform ausgab, zeigte Modell 2 (STEC-Nachweis mittels Kolonie-Hybridisierung) einen höchst signifikanten Effekt (****) mit einer erhöhten OR für die STEC-Ausscheidung bei Kühen, die auf ökologisch bewirtschafteten Betriebe gehaltenen wurden. Diese Signifikanz wurde jedoch bei Berechnung des Modells mit den einzelnen Variablen für die Milchleistung und -inhaltsstoffe, sowie den Gesundheits- und Ernährungszustand auf einen eben noch signifikanten bis tendenziellen Effekt abgeschwächt. Diese Unterschiede sind durch die Differenzen im Ausscheidungsmuster zu erklären. Die durchschnittliche STEC-Prävalenz in Modell 1 (*stx*-Nachweis mit der Screening-PCR) von 23,5% für ökologisch bewirtschaftete Betriebe reduziert sich für Modell 2 (STEC-Nachweis mittels Kolonie-Hybridisierung) lediglich auf 11,7%, wohingegen für die konventionell bewirtschafteten Betriebe eine Reduktion von 26,5% auf 6,5% erfolgt. Aufgrund fehlender Quantifizierung der STEC-Ausscheidung in dieser Studie ist es jedoch leider nicht

möglich, aus dieser Studie Aussagen über die Anzahl der im Kot vorhandenen STEC zu treffen. Eine Untersuchung auf Unterschiede in der Anzahl der ausgeschiedenen STEC wäre nötig gewesen, um festzustellen, ob die starke Reduktion bei den konventionell bewirtschafteten Betrieben eventuell durch einen großen Anteil nur kurzzeitig, schwach und transient ausscheidender Tiere zu erklären ist, bei denen mit der Koloniehybridisierung aufgrund der niedrigen fäkalen STEC-Zahlen selten eine Isolierung der STEC gelingt. In vorhergegangenen Arbeiten wurde kein Zusammenhang der Bewirtschaftungsform mit der STEC-Ausscheidungsrate nachgewiesen (Kuhnert et al., 2005).

Assoziationen des Ernährungszustandes und der STEC-Ausscheidung sind bisher nicht untersucht worden. In der vorliegenden Arbeit wiesen Tiere mit einem BCS-Score von mehr als 3,25 Punkten ein höheres Risiko auf, als *stx*-positiv erkannt zu werden. Hier besteht möglicherweise ein Zusammenhang mit der Variable Trocken stehen, da die Kühe in der Trockenstehperiode in der Regel über die höchsten BCS-Scores verfügen (Mahlkow-Nerge, 2003). Modell 2 (STEC-Nachweis mittels Kolonie-Hybridisierung) ermöglichte eine genauere Aussage und ergab eine höhere OR für Tiere, die über- oder unterkonditioniert waren, im Vergleich zu optimal konditionierten Tieren. Diese gut konditionierten Tiere weisen optimale BCS-Werte auf, wodurch der metabolische Stress zur Abkalbung und in der Früh lactation minimiert wird (Mahlkow-Nerge, 2003).

Die longitudinale Anordnung der Studie mit einer Beprobung festgelegter Kühe ermöglichte eine Analyse der Ausscheidungsmuster. Für viele Tiere wurde die bereits publizierte lediglich transiente Ausscheidung bestätigt. Bei in dieser Studie nur kurzzeitig ausscheidenden Tieren gelang eine Isolierung der STEC häufig nicht, ein Erklärungsansatz dafür wäre eine geringere Ausscheidungsintensität dieser Tiere. Auch intermittierende Ausscheidungsmuster unterschiedlicher Dauer wurden beobachtet. Auffällig waren jedoch die Ausscheidungsmuster einiger weniger Kühe, die sich durch über mehr als vier Probenahmen andauernde STEC-Ausscheidung auszeichneten. Bei diesen als kontinuierlich ausscheidend definierten Tieren gelang oftmals eine Isolierung von STEC. Auch wenn in dieser Arbeit keine quantitative Bestimmung der STEC erfolgte, gibt der unterschiedliche Erfolg bei der Isolierung von STEC möglicherweise Hinweise auf bei diesen Tieren existierende Differenzen in dem Anteil der fäkal ausgeschiedenen STEC an der Gesamtfloora, so wie es auch für O157:H7-STECS bei „Super Sheddern“ beschrieben wurde (Chase-Topping et al., 2008). Die vorliegende Arbeit liefert also die ersten Hinweise auf eine ebenfalls kontinuierliche Ausscheidung von Non-O157:H7-STECS, sowie Tier-individuelle Differenzen in der Ausscheidung von Non-O157:H7-STECS, wie sie für O157:H7-STECS bereits beschrieben wurden (Chase-Topping et al., 2007; Cobbold et al., 2007; Lim et al., 2007; Low et al., 2005). Bei einer Einbeziehung der Anwesenheit eines der kontinuierlich ausscheidenden Tiere in die beiden statistischen Modelle ergab sich ein höchst signifikanter Zusammenhang (****) mit einer Steigerung des OR für eine

Ausscheidung um das 2,63- beziehungsweise für Modell 2 (STEC-Nachweis mittels Kolonie-Hybridisierung) sogar um das 5,78-fache für Kühe, die mit diesen Tieren zusammen gehalten wurden. Ähnliche Ergebnisse erhielten Cobbold et al. (2007) für O157:H7-STEC, die ein fünffach erhöhtes Risiko für Tiere in Herden mit persistent infizierten Kühen publizierten, für Non-O157:H7-STEC ist in diesem Zusammenhang jedoch bisher nichts bekannt.

Bisher nicht bekannt war eine statistische Assoziation des Ernährungszustandes mit dem Risiko der Non-O157:H7-STEC-Ausscheidung, wohingegen der lediglich phänotypisch festgestellte Gesundheitstatus eventuell aufgrund mangelnder weitergehender Untersuchungen keine Assoziation mit dem Risiko einer Ausscheidung von STEC aufwies.

Da über eine kontinuierliche Ausscheidung von Non-O157:H7-STEC bisher nichts bekannt ist, sollte den aus der vorliegenden Studie resultierenden Hinweisen auf Kühe, die Non-O157:H7-STEC kontinuierlich ausscheiden, nachgegangen werden. In diesem Bereich besteht weiterhin dringender Forschungsbedarf.

5.2.4 Diskussion der Bedeutung saisonaler Faktoren

Die in dieser Studie erhaltene Vielfalt der Saisonalitäts-Schwerpunkte spiegelt die Diversität der bereits veröffentlichten Studien zu diesem Thema wider. Während in den Betrieben B und D der Spätsommer den Zeitraum mit den höchsten Prävalenzen bildet, ähnlich wie in den Studien von Hancock et al. (1997a) und Schouten et al. (2004), weisen die Betriebe C und F –wie bei den Tieren in den Arbeiten von Dopfer et al. (2006), Hancock et al. (1994) und Heuvelink et al. (1998b) beschrieben – die höchsten Prävalenzen in den Frühjahrs- und Frühsommermonaten auf. Diese Ausscheidungshöhepunkte im Frühjahr und Sommer sind vermutlich auf Futterwechsel im Rahmen des Beginns des Weidegangs im Frühjahr zurückzuführen. Zu diesem Zeitpunkt werden die Tiere über einen sehr kurzen Zeitraum von sehr inhaltsreicher Totaler Misch Ration (TMR) auf energie- und nährstoffarmes Weidegras umgestellt und nur noch zwei Mal täglich zum Melken hereingeholt und dabei mit TMR und Kraftfutter zugefüttert. Der Anstieg der Anzahl der STEC-positiven Tiere in dem Zeitraum könnte auf diesen Futterwechsel zurückzuführen sein, dies wurde für Austriebe von Schafen auf magere Weideflächen bereits berichtet (Kudva et al., 1995). Weiterhin werden Shiga-Toxin-Bakteriophagen regelmässig in Wasser- und Bodenproben nachgewiesen (Creuzburg und Schmidt, 2007), eine Aufnahme und Transduktion der Phagen im Pansen ist bei Weidehaltung daher durchaus denkbar (Cornick et al., 2006; Sekse et al., 2008), wenn auch noch nicht im Detail nachgewiesen.

In den Betrieben mit eher in den Spätsommer verlagerten Ausscheidungshöhepunkten wird die Bedeutung einer Anreicherung von STEC im Boden über die Kontamination durch Rinderkot diskutiert (Heuvelink et al., 1998a). Bei Betrieben mit verhältnismäßig wenig Weideflächen und mangelndem Weidemanagement kann dieser Faktor eine Rolle spielen. Bekannt ist, dass die Serovare O157:H7 in gemäßigten Breitengraden im

Kot und der umgebenden Erde bis zu 99 Tage nachzuweisen ist (Bolton et al., 1999). Weiterhin sind verschiedene humane Erkränkungsfälle bekannt, bei denen als Erregerquelle kontaminiertes Gras und Boden identifiziert wurde (Mukherjee et al., 2006; Ogden et al., 2002), so dass davon auszugehen ist, dass diese Infektiosität potentiell auch für Rinder gegeben ist. Dazu kommen in den Sommermonaten Umweltbedingungen, die das Überleben und in einigen Fällen sogar das Wachstum der STEC begünstigen. Auch die Tageslichtlänge und die Umgebungstemperatur sind einigen Studien zufolge relevant: Bei künstlichem Licht mit verlängerter Beleuchtungsdauer behielten die Rinder über 43 Tage hohe Ausscheidungsraten von STEC O157:H7 bei (Edrington et al., 2006). Eine diskutierte Ursache der verlängerten beziehungsweise erhöhten Ausscheidung von STEC O157:H7 sind Einflüsse auf Schilddrüsen- und Epiphysenhormone. Bekannt sind Tageslicht-abhängige Effekte auf Trijodthyronin und Melatonin, die durch Stimulation des Immunsystems (Drazen et al., 2001; Nelson und Drazen, 2000) die Kolonisierung mit und Ausscheidung von STEC verringern könnten (Edrington et al., 2007; Edrington et al., 2008; Schultz et al., 2005). Im Gegensatz zu den berichteten STEC-Prävalenzsteigerungen im Sommer und Herbst stehen die Ergebnisse einer britischen Studie: Hier stellte das Einstellen im Herbst einen Risikofaktor verbunden mit vermehrter STEC-Ausscheidung dar (Syngé et al., 2003). Die in Betrieb A erhobene Entwicklung der Prävalenzen unterstützt diese Daten ebenso wie eine Prävalenzsteigerung in diesen Zeitraum in der Studie von Mechie et al. (1997). Erklärungsansätze für diese Prävalenzschwankungen sind wiederum Futterwechsel- und Stress-bedingte Pansenfunktionsstörungen, aber auch Crowding-Effekte mit erleichterter Anreicherung der STEC durch die erhöhte Tierdichte im Stall (Syngé et al., 2003) und die bereits in Kapitel 5.2.1 erläuterten Effekte von Stress auf das Tier und die Mikroorganismen.

5.2.5 Diskussion des Vergleiches der Risikobewertungen verschiedener Faktoren durch Modell 1 (*stx*-Nachweis mittels Screening-PCR) und Modell 2 (STEC-Nachweis mittels Kolonie-Hybridisierung)

Aufgrund des vorhandenen Datenmaterials war nur die Auswertung in Form der beiden beschriebenen Modelle möglich. Bei der Betrachtung der Ergebnisse sind allerdings folgende Einschränkungen zu beachten: Durch die für statistische Verhältnisse immer noch niedrige Anzahl an Beobachtungen ($n=1.646$) und der suboptimalen Verteilung positiver und negativer Ergebnisse besonders im zweiten Modell (134 *stx*-positive zu 1.512 *stx*-negativen Proben) ist die Aussagekraft beider Modelle begrenzt. Besondere Vorsicht ist bei der Interpretation in Hinsicht auf die zum Modell einzeln hinzugefügten Variablen der Milchleistung und -inhaltsstoffe, sowie des Gesundheits- und Ernährungszustandes geboten, da keine eindeutige Unabhängigkeit der Variablen vom Betrieb, der Anzahl der absolvierten Laktationen und dem Laktationstag besteht. Die Analyse dieser Faktoren dient alleine der Identifikation von potentiellen Trends.

5.3 Bewertung der Prävalenz von Shiga-Toxin-Typen

Bei den in dieser Arbeit isolierten STEC handelte es sich zum Großteil um *stx₂*-positive Isolate (91,6%). Verschiedene Studien ergaben, dass dieser Toxintyp bei Rindern häufiger vorkommt: Eine Arbeit von Zschöck et al. (2000) bezifferte den Anteil an *stx₂*-positiven Isolaten bei Rindern auf 88,5% (Zschöck et al., 2000), eine spanische Arbeit ermittelte einen Anteil von 80,0% (Blanco et al., 2004b). Ein Anteil von 38,1% (34,9% von der Gesamtzahl der STEC) der *stx₂*-positiven STEC besaß zusätzlich noch *stx₁*, wohingegen *stx₁* alleine nur von einem kleinen Anteil von 8,4% der Isolate getragen wird. Dieses Verteilungsmuster der Shiga-Toxin-Typen bei Rindern ist bereits mehrfach in Europa beschrieben worden (Blanco et al., 2004b; Rogerie et al., 2001; Zschöck et al., 2000).

Humanpathogene STEC-Isolate wiesen in verschiedenen Untersuchungen zwischen 94,0% und 92,0% die Virulenzfaktoren Intimin und EHEC-Hämolysin in Kombination auf (Gyles et al., 1998; Karch et al., 1997). Der Besitz von EHEC-Hämolysin wurde in einigen Studien mit schweren Erkrankungen beim Menschen assoziiert (Sandhu et al., 1997; Schmidt und Karch, 1996). Eine Assoziation von *stx₂* und *EHEC-hly_A* war in den vorliegenden Daten bei 78,0% der Isolate zu beobachten, so dass wie bereits belegt (Wieler, 1997), *EHEC-hly_A* ein hinweisender, aber kein zuverlässiger Indikator für das Vorhandensein von *stx₂* zu sein scheint. In statistischen Analysen wurde das Vorhandensein von *stx₂* oder *eae* als Risikofaktor für eine schwere humane Erkrankung identifiziert; ein noch höheres Risiko ergab sich beim Vorhandensein der beiden eben genannten Virulenzfaktoren (Boerlin et al., 1999). Im Rahmen dieser Arbeit wurden 62 STEC-Isolate (5,6%) gewonnen, die diese beiden Virulenzfaktoren und zusätzlich noch *EHEC-hly_A* besaßen; 1012 Isolate besaßen *stx₂* und immerhin 91 STEC (8,2%) trugen *eae*. Rogerie et al. (2001) wiesen lediglich bei 1,3% der STEC-Isolate *eae* nach. Diese niedrige Prävalenz *eae*-positiver STEC bei Rindern wurde in weiteren Studien bestätigt, so dass bei der Adhäsion von STEC im Rinderdarm vermutlich andere Adhäsionsfaktoren relevant sind (Fantelli und Stephan, 2001; Toma et al., 2004; Toma et al., 2008).

Einige innerhalb dieser Studie gewonnenen bovinen STEC weisen aufgrund ihres Virulenzmusters eindeutig ein humanpathogenes Potential auf.

Insgesamt stellen STEC mit unterschiedlichen Serovaren und Virulenzfaktoren eine sehr heterogene Gruppe dar. Es scheint eine unterschiedliche Wirtsspezifität einiger Stämme zu geben (Beutin et al., 1997), wobei viele Serovaren beim Menschen aber auch beim Tier sowie in von Tieren stammenden Lebensmitteln nachgewiesen werden.

Bei der Untersuchung von 70 ausgewählten Isolaten auf ihre Serovaren wurden in vorliegender Arbeit 24 Serovare identifiziert, von denen 18 bereits bei gesunden Rindern isoliert wurden (MicroBioNet, 2008). Einige Rinder trugen dabei bis zu vier verschiedenen Serovaren an einem Probenahmetermin. Diese hohe Diversität innerhalb der bovinen STEC-Serovaren auch einzelner Rinder ist jedoch bereits bekannt, so

isolierten beispielweise Schurmann et al. (2000) von einigen Rindern bis zu 26 verschiedene Serovaren. Fünf der isolierten Serovaren (O8:H19, O8:H21; O22:H8, O113:H21 und Orauh:H-) wurden bereits bei Patienten mit HUS isoliert; für sieben weitere Serovare (O113:H-, Ont:H7, Ont:H19, Ont:H21, Ont:H25; Ont:Hnt; Orauh:Hnt) ist eine Assoziation mit Diarrhöe beim Menschen bekannt (MicroBioNet, 2008). Eine ähnliche Heterogenität innerhalb der Serovarverteilung wurde auch von anderen Autoren publiziert. So gelang Blanco et al. (1996) bei der Beprobung von 328 Rindern die Isolierung von 66 STEC, die insgesamt 25 Serovaren angehörten. Drei (O8, O22, O113) der sieben häufigsten Serogruppen aus dieser Veröffentlichung wurden auch bei den Serovaren dieser Arbeit identifiziert. Die Serovare O157:H7 und die klassischen non-O157:H7-EHEC-Serovaren O26, O103, O111 und O145 (Bockemühl et al., 1998) wurden bei den gewonnenen bovinen STEC nicht detektiert. Die in einer französischen Studie bei Rindern dominierende Serogruppen O113 und O22 (Pradel et al., 2000) wurden in dieser Arbeit auch für Rinder in Deutschland bestätigt.

Interessant stellt sich zusätzlich der Fund von zwei Non-O157:H7-STECS dar, die, wie eigentlich nur für die Serovare O157:H7 bekannt, kein Sorbitol fermentierten. Eine ähnliche Beobachtung machten bereits Bettelheim et al. (2005), die nicht Sorbitol-fermentierende STEC in geringer Zahl vor allem bei Stärke-reich gefütterten Tieren sporadisch nachwiesen.

5.4 Konsequenzen für die Bewertung der humanen Gefährdung

Aus den vorliegenden Ergebnissen ist in Hinblick auf die potentiell humanpathogenen Virulenzmuster der isolierten bovinen STEC im Zusammenspiel mit zum Teil als humanpathogen bekannten Non-O157:H7-Serovaren von einer erheblichen Gesundheitsgefährdung durch Kühe und von ihnen hergestellte Produkte für den Menschen auszugehen. Eine Bestätigung der Bedeutung des Rindes als Infektionsquelle für STEC wird durch mehrfach nachgewiesene erhöhte Antikörpertiter gegen STEC in der landwirtschaftlich und im Schlachtgewerbe tätigen Bevölkerung bestätigt (Reymond et al., 1997; Stephan et al., 2000).

5.5 Prophylaxemöglichkeiten und Ausblick

In mehreren Studien wurde bereits die Bedeutung von Hygienemaßnahmen, der Fütterung und der Haltung der Tiere eruiert. Einige Studien ergaben verschiedene Risikofaktoren für die STEC-Ausscheidung, wie beispielsweise die Reinigung mit Hochdruckreinigern, das Vorhandensein feuchter Einstreu und verschmutzter Tränkebecken, die Haltung in großen Gruppen und eine energiereiche Fütterung (Ellis-Iversen et al., 2007; Garber et al., 1999; Kuhnert et al., 2005), die jedoch vielfach in weiteren Studien nicht bestätigt werden konnten. Der Vergleich von Effekten verschiedener Hygienemaßnahmen für Junggrinder ergab jedoch eine eindeutige Risikominderung bei einer sauberen Haltung mit trockener Einstreu und einer geschlossenen Herde ohne Zukauf von Tieren (Ellis-Iversen et al., 2008). Zusätzlich sollte bei Weidehaltung die Anreicherung von STEC im Boden nicht unterschätzt werden (Mukherjee et al., 2006; Ogden et al., 2002) und daher Wert auf ein sorgfältiges Weidemanagement mit ausreichend langer Beweidungspause gelegt werden. Eine Vermeidung von Fütterungs-bedingtem Stress für die Kühe kann durch allmähliche Fütterungsumstellung und vorsichtiges Anweiden beziehungsweise die vorherige Zufütterung von Schnittgras erfolgen. Haltungs-bedingtem Stress sollte durch die optimale Konzipierung des Stalls mit ausreichend Ausweichflächen bei Rangstreitigkeiten und stabiler Gruppenzusammensetzung begegnet werden. Als erfolgsversprechendste präventive Maßnahme wurde in einem Simulationsmodell das Verbringungsverbot für STEC-ausscheidende Rinder bewertet (Liu et al., 2007), wodurch bei Beibehaltung aller hygienischen Maßnahmen eine allgemeine Reduktion der Prävalenz der Serovare O157:H7 resultieren würde.

Der vorliegenden Arbeit und neuesten Publikationen zufolge, scheinen vor allem Tier-individuelle Unterschiede die größte Bedeutung hinsichtlich der STEC-Ausscheidung von Non-O157:H7- und O157:H7-STECS zu besitzen (Chase-Topping et al., 2007; Cobbold et al., 2007; Lim et al., 2007; Low et al., 2005). Eine Besiedelung des rektotoanalen Übergangs im Darm mit O157:H7-STECS weist auf bisher unbekanntem Ursachen Tier-spezifische Unterschiede auf (Cobbold et al., 2007): Die Untersuchung hereditär beziehungsweise genetisch bedingter Ursachen scheint aussichtsreich und sinnvoll zu sein.

6 Schlussfolgerungen

Kühe, die Shiga-Toxin bildende *Escherichia coli* (STEC) ausscheiden, stellen aufgrund des typischen Virulenzmusters der bovinen STEC ein Gefahrenpotential für den Menschen dar. Eine Verringerung der STEC-Prävalenz bei Rindern muss das primäre Ziel zum Schutz der humanen Gesundheit sein, so dass der Kontakt zu Rindern und der Verzehr der von ihnen abstammender Lebensmittel für den Verbraucher sicher sind.

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Risikofaktoren identifiziert, die zu einer vermehrten Ausscheidung von Non-O157:H7-STECS im Kot bei Rindern führen. Die im Laktationszyklus der Kuh auftretenden Ausscheidungs-Schwankungen deuten auf einen Einfluss von metabolischem und psychischem Stress hin, dem durch optimale Fütterung mit allmählichen und frühzeitigen Futterumstellungen sowie konstanten geschlossenen Herden und ausreichendem Platzangebot für die Tiere begegnet werden kann. Besonders wichtig ist auch eine gute und rechtzeitige Eingliederung von Färsen bereits vor der ersten Kalbung in die laktierende Herde, um die Eingewöhnung dieser Tiere in einer stabilen metabolischen Situation durchzuführen und eine Ausscheidung von STEC zu verhindern.

Die untersuchten sechs Betriebe wiesen große Unterschiede in den STEC-Prävalenzen und in der putativen Humanpathogenität ihrer STEC bei den Milchkühen auf, so dass hier eine klare Assoziation des Betriebsmanagements, der Haltung und der Fütterung mit dem Risiko einer Ausscheidung von STEC zu erkennen ist. Eine gute Betriebsführung ist von entscheidender Bedeutung und führt durch optimales Weidemanagement mit regelmäßigen Umtrieben zu Verringerungen der saisonalen Prävalenzerhöhungen im Spätsommer und durch allmähliches Anweiden zur Verringerung der Ausscheidung in den Frühjahrsmonaten. Die Bewirtschaftungsform hatte trotz der öffentlichen Vorstellung gesünderer Kühe auf ökologischen Betrieben keinen Einfluss auf die Ausscheidung von *stx*, es ergaben sich sogar Hinweise auf eine vermehrte Anwesenheit von kontinuierlich STEC-ausscheidenden Rindern in dieser Bewirtschaftungsform.

Auch für Non-O157:H7-STECS existieren kontinuierlich ausscheidende Tiere. Zur Bekämpfung des Erregers sollten besonders diese Tiere identifiziert, behandelt oder ausgesiekt werden, so dass die Infektionsgefahr für andere Tiere und für Menschen gesenkt wird. Verschiedene Ansätze sind dabei die Immunisierung der Kühe mit Oberflächenantigenen der STECS, aber auch die Fütterung von Probiotika und antimikrobiell wirkenden Bestandteilen, wie beispielsweise Orangenschalen. Langfristig sollte jedoch versucht werden, Ursachen für die individuellen Differenzen in der Anfälligkeit für STECS-Infektionen zu identifizieren. Dabei wäre zunächst eine Identifizierung von SNP (Single Nukleotide Polymorphism)‘s im Genom des Rindes sinnvoll, die im Zusammenhang mit der Anfälligkeit einer Kolonisierung durch STECS stehen.

Von Bedeutung ist aber trotz aller Reduktionsmaßnahmen der STECS-Prävalenz auf der Ebene des Betriebes weiterhin auch die Aufklärung des Verbrauchers über die von nicht erhitzten tierischen Nahrungsmitteln ausgehende Gesundheitsgefährdung, welche durch eine hygienische Gesichtspunkte beachtende Zubereitung und den ausschließlichen Verzehr von durcherhitzten Produkten einfach reduziert werden kann.

7 Zusammenfassung

Die Bedeutung von Erkrankungen des Menschen durch Shiga-Toxin bildende *Escherichia coli* (STEC) hat in den letzten beiden Jahrzehnten zugenommen. Die sehr niedrige Infektionsdosis in Kombination mit den möglichen Komplikationen einer STEC-Infektion bedingen die hohe gesundheitsökonomische Relevanz der Erreger. Das stark zytotoxisch wirkende Shiga-Toxin verursacht im Zusammenspiel mit anderen Virulenzfaktoren in der Regel Gastroenteritiden, die sich jedoch auch zu schwerwiegenden extraintestinalen Krankheitsbildern – besonders bei Kindern – entwickeln können. Wiederkäuer, und hier in besonderem Maße Rinder, die oft in engem Kontakt zum Menschen gehalten werden und deren Produkte dem Verzehr dienen, sind die natürliche Ansteckungsquelle der STEC. Shiga-Toxin bildende *Escherichia coli*-ausscheidende Rinder zeigen keine Krankheitssymptome; von ihnen stammende Lebensmittel können kontaminiert sein. Das regelmäßige Vorkommen von STEC in den Faeces der Rinder und ihrer Umgebung wurde bereits in verschiedenen Studien bestätigt. Verschiedene Faktoren hinsichtlich der Haltung, der Fütterung und des Herdenmanagements wurden als Risiken identifiziert. Große Bedeutung besitzen allerdings auch individuelle Eigenschaften des einzelnen Tieres.

Das Ziel dieser Studie war die Untersuchung der fäkalen Ausscheidung von STEC durch Milchkühe über den Lauf eines Jahres. Das longitudinale Design der Studie erlaubte es, die STEC-Ausscheidung von ausgewählten Probestieren über den gesamten Zeitraum von zwölf Monaten zu verfolgen und Aussagen über die Ausscheidungsmuster dieser Tiere zu treffen. Zusätzlich war eine Analyse der Ergebnisse auf Herdenebene, sowie eine Bewertung verschiedener Risikofaktoren möglich. Zur Verfügung standen Informationen über das Herdenmanagement, den Ernährungs- und Gesundheitszustand der Tiere, sowie über die Milchleistung und die Milchhaltsstoffe, die Anzahl der absolvierten Laktationen und den Laktationstag. Die Daten wurden mit dem Programm „Excel[®]“ und der Prozedur „Logistic“ des Programmes „SAS[®]“ statistisch in Form von zwei Modellen ausgewertet. Im ersten Modell wurden alle in der Screening-PCR *stx*-positiven Tiere als positiv gewertet, wohingegen in das zweite Modell alle Tiere als positiv eingingen, bei denen eine Isolierung von STEC gelang.

Auf insgesamt sechs Milchvieh-haltenden Betrieben in Schleswig-Holstein wurden im Zeitraum von Februar 2007 bis Januar 2008 insgesamt 1.646 Kotproben von 140 Kühen mit unterschiedlichen Anzahlen absolvierter Laktationen durch monatliche Beprobungen gewonnen. Nach einem Anreicherungs-schritt wurden *stx*-positive Tiere per PCR identifiziert, von diesen Tieren wurden STEC isoliert und mittels PCR charakterisiert. Bei ausgewählten Isolaten erfolgte zusätzlich eine Überprüfung des Serovares und der Fähigkeit auf Sorbitol-Fermentation.

Insgesamt waren 24,7% (407) aller Proben *stx*-positiv in der Screening PCR. Zwischen den sechs Betrieben traten mit prozentualen Anteilen von 11,1% bis 32,3% *stx*-positive Tiere in der Screening-PCR deutliche Unterschiede bei den Prävalenzen innerhalb der einzelnen Herden auf. Als signifikante Einflüsse für eine STEC-Ausscheidung erwiesen sich der Zeitpunkt der Probenahme, die Anzahl der absolvierten Laktationen, der Laktationstag, die Körperkondition, der Eiweißgehalt der Milch sowie die Anwesenheit eines kontinuierlich ausscheidenden Tieres in der Herde. Die Prävalenz in den Monaten August, September und Oktober war mit Werten von 27,9%, 28,8% und 35,0% am höchsten, ähnliche Ergebnisse ergaben auch weitere Studien. Erstkalbinnen wiesen ebenso wie trocken stehende Tiere und Kühe innerhalb des Abschnittes vom 51. bis 150. Laktationstag ein signifikant erhöhtes Risiko für eine STEC-Ausscheidung auf.

Lediglich 12,9% (18) der Tiere wurden während der gesamten Probenahme dauerhaft als negativ nachgewiesen. Von 140 Kühen wurden 122 (87,1%) mit der Screening-PCR zumindest einmalig als *stx*-ausscheidend detektiert. Insgesamt 24 Kühe (17,1%) wiesen in mehr als der Hälfte ihrer Kotproben *stx* auf. Vierzehn Tiere (10,0%) schieden *stx* zusätzlich noch über mindestens vier aufeinander folgende positive Beprobungen aus und wurden als kontinuierliche Ausscheider definiert. Ausgewählte, von diesen Tieren isolierte STEC (n=61), gehörten 24 Sorbitol-fermentierenden Non-O157:H7-Serovaren an, wobei bisher eine längerfristige Ausscheidung von Rindern nur für die Serovare O157:H7 beschrieben wurde. Zwölf der isolierten STEC-Serovare wurden bereits mit Erkrankungen beim Menschen assoziiert. Zwei Isolate fermentierten kein Sorbitol. In der Reihenfolge absteigender Häufigkeiten waren die fünf dominierenden Serovare O113:H-, O22:H8, Ont:H25, O130:H11 und O8:H19.

Insgesamt gelang die Isolierung von 1.105 STEC; dominierende Virulenzprofile waren *stx*₂ *EHEC-hly*_A (434 Isolate, 39,3%) und *stx*₁ *stx*₂ *EHEC-hly*_A (311 Isolate, 28,1%). Intimin wurde bei 91 Isolaten nachgewiesen.

Von humanpathogenen STEC bekannte Virulenzmuster werden regelmäßig auch bei bovinen STEC detektiert, so dass die Ansteckungsquelle Rind ein bedeutendes Gefahrenpotential für den Menschen darstellt. Auch wenn die Evaluierung von Risikofaktoren für die bovine STEC-Ausscheidung bereits Gegenstand etlicher Studien war, ist es bis heute nur unvollständig gelungen, die bedeutendsten Faktoren aufzudecken. Es ist davon auszugehen, dass die Ursache dieser Schwankungen in Tier-individuellen Charakteristika begründet ist. Daher sollten zukünftige Studien mögliche Unterschiede, beispielsweise solche genetischer Natur, verstärkt berücksichtigen. Die vorliegende Studie zeigte klar die Bedeutung kontinuierlich ausscheidender Tiere für die Prävalenz innerhalb einer Herde. Diese Tiere stellen eine dauernde Ausscheidungsquelle für STEC dar und halten den Infektionszyklus innerhalb des Bestands aufrecht. Maßnahmen auf der Ebene des Einzeltieres könnten die Grundlage für eine effektive Kontrolle dieses Erregers sein.

8 Summary

Shiga-Toxin producing *Escherichia coli* (STEC) are an emerging human health issue with special regard to their low infectious dose combined with serious sequelae of disease. The highly cytotoxic Shiga-Toxin enhanced of other virulence factors causes gastroenteritides and severe disease patterns in children.

Ruminants and especially cattle, often kept in close contact to humans and with products frequently consumed, are known to be the natural source of infection for STEC. Cattle are infected often, but without clinical signs of disease; hence, cattle derived foods could be contaminated. The common occurrence of STEC in faecal and environmental samples of cattle and its surroundings are confirmed by several studies. Different factors like the kind of husbandry, the diet and the herd management were identified as risk for shedding of STEC. However, the individual characteristics of the single animal seem to have a major impact.

The aim of this study was to investigate the faecal excretion of STEC by dairy cattle over the course of one year. The design of the study was longitudinal to follow selected dairy cows over a period of twelve months to reveal their shedding patterns. Furthermore, the data was analyzed at herd level to detect and evaluate different risk factors. Additional information about herd management, nutritional and health status were available as well as data about the amount and contents of milk, the number of passed lactations and the days in milk. The data was statistically analyzed in two different models using the program 'Excel[®]' and the procedure 'logistic' in 'SAS[®]'. In the first model, all positive samples in the screening-PCR were classified as positive; in the second model, only animals from which STEC were isolated were considered as positive.

On six dairy farms in Northern Germany, 1,646 faecal samples from 140 cows in different lactation numbers were examined once per month in the period between 02/2007 and 01/2008. Following cultural isolation, *stx*-positive cows were identified by PCR. STEC of these cows were isolated by colony-hybridization and characterized by PCR. Furthermore, selected STEC-isolates were tested for their biochemical reaction and their serotype.

In 24.7% (407) of all samples, *stx* were detected by the screening-PCR. Within the herds, prevalence varied between 11.1% and 32.3%. The month of sampling, the number of passed lactations and days in milk, the nutritional condition as well as the content of protein in milk and the presence of a continuously positive cow in herd were shown as significant factors on shedding of STEC. As described in literature, the prevalence was highest in the late summer months (August, September and October)

with 27.9%, 28.8% and 35.0%. First calvers, dry cows, and cows with 51 to 150 days in milk showed a significant higher risk for shedding STEC.

Over the whole sampling period, only 12.9% (18) of the cows were detected as constantly negative. Most of the 140 investigated animals excreted *stx* at least once (87.1% 122 cows), and 17.1% (24) were detected as *stx*-positive by the screening-PCR in more than 50% of their samples. Cows with at least four consecutive positive samplings (10.0%, 14 cows) were classified as continuously shedding cows. Isolated Shiga-toxin producing *E. coli* from these cows were selected (n=61). They belonged to 24 Sorbitol-fermenting non-O157:H7-STECSerovares, although long term shedding by cattle is only known for the STEC-serovare O157:H7. Twelve of these serovares have already been associated with disease in human. Only two isolates did not ferment Sorbitol. The five most predominant serovares, in descending order, were serovares O113:H-, O22:H8, Ont:H25, O130:H11 and O8:H19.

In this study, 1,105 STEC were isolated. Dominating combinations of virulence genes were *stx*₂ and *EHEC-hly*_A (434 isolates, 39.3%), and *stx*₁, *stx*₂ and *EHEC-hly*_A (311 isolates, 28.1%). Intimin was detected in 91 isolates.

Pathogen virulence profiles, common in human isolates, are frequently found in bovine STEC. Consequently, cattle represent an important source of infection and might act as potential human health risk. Even though risk factors for the excretion of STEC have been examined before, the main influencing factors still remain unknown. It could be assumed that the reasons of these differences are based on individual characteristics. Future studies should consider possible genetic individual varieties. This study confirms the importance of continuously shedding cows as a major source of STEC. These cows maintain the infectious cycle of STEC in the herd; therefore, interventions on individual animal might serve as the base for an effective pathogen control.

9 verwendete Literatur

Acheson, D. W. K.; Donohuerolfe, A. (1989):

Cancer associated hemolytic uremic syndrome - a possible role of Mitomycin in relation to Shiga-Like Toxins.

Am J Clin Oncol. 7(12), 1943.

Akashi, S.; Joh, K.; Tsuji, A.; Ito, H.; Hoshi, H.; Hayakawa, T.; Ihara, J.; Abe, T.; Hatori, M.; Mori, T.; et al. (1994):

A severe outbreak of haemorrhagic colitis and haemolytic uraemic syndrome associated with *Escherichia coli* O157:H7 in Japan.

Eur J Pediatr. 153(9), 650-5.

Al-Jader, L.; Salmon, R. L.; Walker, A. M.; Williams, H. M.; Willshaw, G. A.; Cheasty, T. (1999):

Outbreak of *Escherichia coli* O157 in a nursery: lessons for prevention.

Arch Dis Child. 81(1), 60-3.

Al-Jumaili, I.; Burke, D. A.; Scotland, S. M.; al-Mardini, H.; Record, C. O. (1992):

A method of enhancing verocytotoxin production by *Escherichia coli*.

FEMS Microbiol Lett. 72(2), 121-5.

Albihn, A.; Eriksson, E.; Wallen, C.; Aspan, A. (2003):

Verotoxinogenic *Escherichia coli* (VTEC) O157:H7--a nationwide Swedish survey of bovine faeces.

Acta Vet Scand. 44(1-2), 43-52.

Aldick, T.; Bielaszewska, M.; Zhang, W.; Brockmeyer, J.; Schmidt, H.; Friedrich, A. W.; Kim, K. S.; Schmidt, M. A.; Karch, H. (2007):

Hemolysin from Shiga toxin-negative *Escherichia coli* O26 strains injures microvascular endothelium.

Microbes Infect. 9(3), 282-90.

Alpers, K.; Werber, D.; Frank, C.; Koch, J.; Friedrich, A. W.; Karch, H.; An, D. E. R. H. M.; Prager, R.; Fruth, A.; Bielaszewska, M.; Morlock, G.; Heissenhuber, A.; Diedler, A.; Gerber, A.; Ammon, A. (1996):

Unpasteurised apple juice causes outbreak of haemolytic uraemic syndrome in North America.

Commun Dis Rep CDR Wkly. 6(46), 399.

Ammon, A.; Petersen, L. R.; Karch, H. (1999):

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

J Infect Dis. 179(5), 1274-7.

Amorosi, E. L.; Ultmann, J. E. (1966):

Thrombotic thrombocytopenic purpura - report of 16 cases and review of literature.
Medicine, 45(2), 139-159.

Aneman, A.; Eisenhofer, G.; Olbe, L.; Dalenback, J.; Nitescu, P.; Fandriks, L.; Friberg, P. (1996):

Sympathetic discharge to mesenteric organs and the liver - Evidence for substantial mesenteric organ norepinephrine spillover.
J Clin Invest. 97(7), 1640-6.

Anonymus (1998):

Verordnung über die Ausdehnung der Meldepflicht nach §3 des Bundes-Seuchengesetzes auf das enteropathische hämolytisch-urämische Syndrom (HUS) und die Infektion durch enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC).
Bundesgesetzblatt, Teil I, Nr. 76, 3425.

Anonymus (2000):

Verordnung über Hygiene- und Qualitätsanforderungen an Milch und Erzeugnisse auf Milchbasis (Milchverordnung), zuletzt geändert am 09.11.2004.
Bundesgesetzblatt, Teil I, 1178.

Anonymus (2002):

Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB (vormals § 35 LMBG): Untersuchung von Lebensmitteln - Nachweis, Isolierung und Charakterisierung Verotoxin-bildender *Escherichia coli* (VTEC) in Hackfleisch mittels PCR und DNA-Hybridisierungstechnik. L 01.18.1, Beuth, Berlin.

Anonymus (2004):

Verordnung zur Änderung tierseuchen- und lebensmittelrechtlicher Vorschriften zur Überwachung von Zoonosen und Zoonosenerregern.
Bundesgesetzblatt, Teil I, 2791.

Avery, S. M.; Walters, L. D.; Hutchison, M. L. (2005):

Fate of *Escherichia coli* O157 and detection of *stx* phage during fermentation of maize, an animal feedstuff.
Lett Appl Microbiol. 40(2), 99-105.

Banatvala, N.; Debeukelaer, M. M.; Griffin, P. M.; Barrett, T. J.; Greene, K. D.; Green, J. H.; Wells, J. G. (1996):

Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* O111 and associated hemolytic-uremic syndrome: a family outbreak.
Pediatr Infect Dis J. 15(11), 1008-11.

Banatvala, N.; Griffin, P. M.; Greene, K. D.; Barrett, T. J.; Bibb, W. F.; Green, J. H.; Wells, J. G. (2001):

The United States national prospective hemolytic uremic syndrome study: Microbiologic, serologic, clinical, and epidemiologic findings.
J Infect Dis. 183(7), 1063-70.

Barba, J.; Bustamante, V. H.; Flores-Valdez, M. A.; Deng, W. Y.; Finlay, B. B.; Puente, J. L. (2005):

A positive regulatory loop controls expression of the locus of enterocyte effacement-encoded regulators Ler and GrlA.
J Bacteriol. 187(23), 7918-30.

Bauer, M. E.; Welch, R. A. (1996):

Characterization of an RTX toxin from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7.
Infect Immun. 64(1), 167-75.

Bell, B. P.; Goldoft, M.; Griffin, P. M.; Davis, M. A.; Gordon, D. C.; Tarr, P. I.; Bartleson, C. A.; Lewis, J. H.; Barrett, T. J.; Wells, J. G.; et al. (1994):

A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7-associated bloody diarrhea and hemolytic uremic syndrome from hamburgers. The Washington experience.
JAMA. 272(17), 1349-53.

Benz, I.; Schmidt, M. A. (1992):

Isolation and serologic characterization of Aida-I, the adhesin mediating the diffuse adherence phenotype of the diarrhea-associated *Escherichia coli* strain-2787 (O126-H27).
Infect Immun. 60(1), 13-8.

Bergholz, T. M.; Whittam, T. S. (2007):

Variation in acid resistance among enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in a simulated gastric environment.
J Appl Microbiol. 102(2), 352-62.

Besser, T. E.; Richards, B. L.; Rice, D. H.; Hancock, D. D. (2001):

Escherichia coli O157 : H7 infection of calves: infectious dose and direct contact transmission.
Epidemiol Infect. 127(3), 555-60.

Bettelheim, K. A.; Kuzevski, A.; Gilbert, R. A.; Krause, D. O.; McSweeney, C. S. (2005):

The diversity of *Escherichia coli* serotypes and biotypes in cattle faeces.
J Appl Microbiol. 98(3), 699-709.

Beutin, L.; Bulte, M.; Weber, A.; Zimmermann, S.; Gleier, K. (2000):

Investigation of human infections with verocytotoxin-producing strains of *Escherichia coli* (VTEC) belonging to serogroup O118 with evidence for zoonotic transmission.
Epidemiol Infect. 125(1), 47-54.

Beutin, L.; Geier, D.; Steinruck, H.; Zimmermann, S.; Scheutz, F. (1993):

Prevalence and some properties of verotoxin (Shiga-like toxin)-producing *Escherichia coli* in seven different species of healthy domestic animals.

J Clin Microbiol. 31(9), 2483-8.

Beutin, L.; Geier, D.; Zimmermann, S.; Aleksic, S.; Gillespie, H. A.; Whittam, T. S. (1997):

Epidemiological relatedness and clonal types of natural populations of *Escherichia coli* strains producing shiga toxins in separate populations of cattle and sheep.

Appl Environ Microbiol. 63(6), 2175-80.

Beutin, L.; Geier, D.; Zimmermann, S.; Karch, H. (1995):

Virulence markers of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* strains originating from healthy domestic animals of different species.

J Clin Microbiol. 33(3), 631-5.

Beutin, L.; Zimmermann, S.; Gleier, K. (1998):

Human infections with Shiga toxin-producing *Escherichia coli* other than serogroup O157 in Germany.

Emerg Infect Dis. 4(4), 635-9.

Bielaszewska, M. (2009):

Detection of STEC/VTEC in human samples.

7th International Symposium on Shiga Toxin (Verocytotoxin)-Producing *Escherichia coli* Infections, Buenos Aires, Argentinien, 10.-13. Mai 2009.

Bielaszewska, M.; Janda, J.; Blahova, K.; Minarikova, H.; Jikova, E.; Karmali, M. A.; Laubova, J.; Sikulova, J.; Preston, M. A.; Khakhria, R.; Karch, H.; Klazarova, H.; Nyc, O. (1997):

Human *Escherichia coli* O157:H7 infection associated with the consumption of unpasteurized goat's milk.

Epidemiol Infect. 119(3), 299-305.

Bielaszewska, M.; Schmidt, H.; Liesegang, A.; Prager, R.; Rabsch, W.; Tschape, H.; Cizek, A.; Janda, J.; Blahova, K.; Karch, H. (2000):

Cattle can be a reservoir of sorbitol-fermenting shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H(-) strains and a source of human diseases.

J Clin Microbiol. 38(9), 3470-3.

Blanco, J.; Blanco, M.; Blanco, J. E.; Mora, A.; Alonso, M. P.; A., G. E.; Bernárdez, M. I. (2002):

O:H Serotypes of Bovine Verocytotoxic *E. coli* (VTEC). abgerufen am 15.03.2009

<http://www.lugo.usc.es/ecoli/SEROTIPOSBOV.htm>.

Blanco, J.; Gonzalez, E. A.; Bernardez, I.; Regueiro, B. (1983):

Differentiated biological-activity of Vero cytotoxins (Vt) released by human and porcine *Escherichia coli* strains.

FEMS Microbiol Lett. 20(2), 167-70.

Blanco, J. E.; Blanco, M.; Alonso, M. P.; Mora, A.; Dahbi, G.; Coira, M. A.; Blanco, J. (2004a):

Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from human patients: prevalence in Lugo, Spain, from 1992 through 1999.

J Clin Microbiol. 42(1), 311-9.

Blanco, M.; Blanco, J. E.; Blanco, J.; Gonzalez, E. A.; Mora, A.; Prado, C.; Fernandez, L.; Rio, M.; Ramos, J.; Alonso, M. P. (1996):

Prevalence and characteristics of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and other verotoxin-producing *E. coli* in healthy cattle.

Epidemiol Infect. 117(2), 251-7.

Blanco, M.; Blanco, J. E.; Mora, A.; Dahbi, G.; Alonso, M. P.; Gonzalez, E. A.; Bernardez, M. I.; Blanco, J. (2004b):

Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from cattle in Spain and identification of a new intimin variant gene (eae-xi).

J Clin Microbiol. 42(2), 645-51.

Blanco, M.; Blanco, J. E.; Mora, A.; Rey, J.; Alonso, J. M.; Hermoso, M.; Hermoso, J.; Alonso, M. P.; Dahbi, G.; Gonzalez, E. A.; Bernardez, M. I.; Blanco, J. (2003):

Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from healthy sheep in Spain.

J Clin Microbiol. 41(4), 1351-6.

Blanco, M.; Schumacher, S.; Tasara, T.; Zweifel, C.; Blanco, J. E.; Dahbi, G.; Blanco, J.; Stephan, R. (2005):

Serotypes, intimin variants and other virulence factors of eae positive *Escherichia coli* strains isolated from healthy cattle in Switzerland. Identification of a new intimin variant gene (eae-eta2).

BMC Microbiol. 5, 23.

Bockemühl, J.; Karch, H. (1996):

Zur aktuellen Bedeutung der enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC) in Deutschland (1994-1995).

Bundesgesundheitsblatt, 8, 290-6.

Bockemühl, J.; Karch, H.; Russmann, H.; Aleksic, S.; Wiss, R.; Emmrich, W. (1990):

Shiga-like toxin (verotoxin)-produzierende *Escherichia coli* 022:H8.

Bundesgesundheitsblatt 1/90, 3-6.

Bockemühl, J.; Karch, H.; Tschäpe, H. (1998):

Zur Situation der Infektionen des Menschen durch enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC) in Deutschland 1997.

Bundesgesundheitsblatt, 41, 2-5.

Boerlin, P.; McEwen, S. A.; Boerlin-Petzold, F.; Wilson, J. B.; Johnson, R. P.; Gyles, C. L. (1999):

Associations between virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and disease in humans.

J Clin Microbiol. 37(3), 497-503.

Bolton, D. J.; Byrne, C. M.; Sheridan, J. J.; McDowell, D. A.; Blair, I. S. (1999):

The survival characteristics of a non-toxigenic strain of *Escherichia coli* O157 : H7.

J Appl Microbiol. 86(3), 407-11.

Bonardi, S.; Foni, E.; Chiapponi, C.; Salsi, A.; Brindani, F. (2007):

Detection of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* serogroups O157 and O26 in the cecal content and lymphatic tissue of cattle at slaughter in Italy.

J Food Prot. 70(6), 1493-7.

Bonardi, S.; Maggi, E.; Pizzin, G.; Morabito, S.; Caprioli, A. (2001):

Faecal carriage of Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 and carcass contamination in cattle at slaughter in northern Italy.

Int J Food Microbiol. 66(1-2), 47-53.

Boyd, B.; Lingwood, C. (1989):

Verotoxin receptor glycolipid in human renal tissue.

Nephron. 51(2), 207-10.

Brooks, J. T.; Bergmire-Sweat, D.; Kennedy, M.; Hendricks, K.; Garcia, M.; Marengo, L.; Wells, J.; Ying, M.; Bibb, W.; Griffin, P. M.; Hoekstra, R. M.; Friedman, C. R. (2004):

Outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O111:H8 infections among attendees of a high school cheerleading camp.

Clin Infect Dis. 38(2), 190-8.

Brooks, J. T.; Sowers, E. G.; Wells, J. G.; Greene, K. D.; Griffin, P. M.; Hoekstra, R. M.; Strockbine, N. A. (2005):

Non-O157 shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in the United States, 1983-2002.

J Infect Dis. 192(8), 1422-9.

Brown, C. A.; Harmon, B. G.; Zhao, T.; Doyle, M. P. (1997):

Experimental *Escherichia coli* O157:H7 carriage in calves.

Appl Environ Microbiol. 63(1), 27-32.

Brunder, W.; Khan, A. S.; Hacker, J.; Karch, H. (2001):

Novel type of fimbriae encoded by the large plasmid of sorbitol-fermenting enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 : H.

Infect Immun. 69(7), 4447-57.

Buchko, S. J.; Holley, R. A.; Olson, W. O.; Gannon, V. P. J.; Veira, D. M. (2000a):

The effect of different grain diets on fecal shedding of *Escherichia coli* O157 : H7 by steers.
J Food Prot. 63(11), 1467-74.

Buchko, S. J.; Holley, R. A.; Olson, W. O.; Gannon, V. P. J.; Veira, D. M. (2000b):

The effect of fasting and diet on fecal shedding of *Escherichia coli* O157 : H7 by cattle.
Can J Anim Sci. 80(4), 741-4.

Bujoczek, G.; Reiners, R. S.; Olaszkiewicz, J. A. (2001):

Abiotic factors affecting inactivation of pathogens in sludge.
Water Sci Technol. 44(10), 79-84.

Bülte, M. (1991):

Dot Blot-technique with Digoxigenin-labeled gene probes for the detection of Verocytotoxinogenic *Escherichia coli* strains (VTEC) in mixed cultures and food samples.
Arch Lebensmittelhyg. 42(4), 83-6.

Bülte, M. (1997):

Infektionen durch enterohaemorrhagische *E. coli* (EHEC): Gefährdung des Verbrauchers.
Münch Med Wschr. 139(9), 109.

Bülte, M. (2000):

Versuch einer lebensmittelrechtlichen Bewertung von Verotoxin-bildenden *E. coli* (VTEC) und enterohämorrhagischen *E. coli* (EHEC).

53. Arbeitstagung des Arbeitskreises Lebensmittelhygienischer Tierärztlicher Sachverständiger (ALTS), Berlin, 18.-20.06.2002

Bülte, M. (2001):

Incidence and characterization of verocytotoxin producing *Escherichia coli* (VTEC) from different sources.

Berl Münch Tierärztl Wochenschr. 114(11-12), 473-7.

Bülte, M. (2002):

Veterinärmedizinische Aspekte der Infektionen durch enterohämorrhagische *E.-coli*-Stämme (EHEC).

Bundesgesundheitsblatt, 45, 484- 90.

Bülte, M.; Goll, M.; Stahl, A. (2002):

Nachweis von non-O157 VTEC und O157-Stämmen in einer Mutterkuhherde in Weidehaltung.
Gießen: Eigenverlag der DVG. 190-5.

Bülte, M.; Montenegro, M. A.; Helmuth, R.; Trumpf, T.; Reuter, G. (1990):

The Occurrence of Verocytotoxin-producing strains of *Escherichia coli* from healthy cattle and pigs Using DNA-DNA-Colony Hybridization Assay.

Berl Münch Tierärztl Wochenschr. 103(11), 380-4.

Bundesinstitut für Risikobewertung (2007):

Wildfleisch als Quelle für EHEC-Infektionen unterschätzt. 16/2007 vom 21.08.2007
<http://www.bfr.bund.de/cd/9785>.

Bürk, C.; Dietrich, R.; Acar, G.; Moravek, M.; Bulte, M.; Martlbauer, E. (2003):

Identification and characterization of a new variant of Shiga toxin 1 in *Escherichia coli* O157:H19 of bovine origin.

J Clin Microbiol. 41(5), 2106-12.

Burnens, A. P.; Frey, A.; Lior, H.; Nicolet, J. (1995):

Prevalence and clinical significance of vero-cytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) isolated from cattle in herds with and without calf diarrhoea.

Zentralbl Veterinärmed B. 42(5), 311-8.

Butler, W. R.; Elrod, C. C. (1992):

Reproduction in high-yielding dairy cows as related to energy balance and protein intake.

8th International Conference on Production Diseases in Farm Animals, Bern, Schweiz.

Byrne, C. M.; Erol, I.; Call, J. E.; Kaspar, C. W.; Buege, D. R.; Hiemke, C. J.; Fedorka-Cray, P. J.; Benson, A. K.; Wallace, F. M.; Luchansky, J. B. (2003):

Characterization of *Escherichia coli* O157:H7 from downer and healthy dairy cattle in the upper Midwest region of the United States.

Appl Environ Microbiol. 69(8), 4683-8.

Calderwood, S. B.; Acheson, D. W. K.; Keusch, G. T.; Barrett, T. J.; Griffin, P. M.; Strockbine, N. A.; Swaminathan, B.; Kaper, J. B.; Levine, M. M.; Kaplan, B. S.; Karch, H.; O'Brien, A. D.; Ohrig, T. G.; Takeda, Y.; Tarr, P. I.; Wachsmuth, I. K. (1996):

Proposed new nomenclature for SLT (VT) family.

ASM News, 62(3), 118-9.

Callaway, T. R.; Carr, M. A.; Edrington, T. S.; Anderson, R. C.; Nisbet, D. J. (2009):

Diet, *Escherichia coli* O157:H7, and cattle: A review after 10 years.

Curr. Issues Mol. Biol. 11, 67-79.

Callaway, T. R.; Elder, R. O.; Keen, J. E.; Anderson, R. C.; Nisbet, D. J. (2003):

Forage feeding to reduce preharvest *Escherichia coli* populations in cattle, a review.

J Dairy Sci. 86(3), 852-60.

Cannon, R. M.; Roe, R. T. (1982):

Livestock Disease Surveys: A Field Manual for Veterinarians.

Australian Government Publishing Service, 35pp.

Caprioli, A.; Morabito, S.; Brugere, H.; Oswald, E. (2005):

Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. Vet Res. 36(3), 289-311.

Caprioli, A.; Tozzi, A. E. (1998):

Epidemiology of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* Infections in Continental Europe. In: *Escherichia coli* O157:H7 and Other Shiga Toxin-producing *E. coli* Strains. / Hrsg. J. B. Kaper and A. D. O'Brien. - Washington, DC: American Society for Microbiology. pp. 38-48.

Carter, A. O.; Borczyk, A. A.; Carlson, J. A.; Harvey, B.; Hockin, J. C.; Karmali, M. A.; Krishnan, C.; Korn, D. A.; Lior, H. (1987):

A severe outbreak of *Escherichia coli* O157:H7-associated hemorrhagic colitis in a nursing home. N Engl J Med. 317(24), 1496-500.

Cebula, T. A.; Payne, W. L.; Feng, P. (1995):

Simultaneous identification of strains of *Escherichia coli* serotype O157-H7 and their Shiga-Like Toxin type by mismatch amplification mutation assay-multiplex Pcr. J Clin Microbiol. 33(4), 1048-50.

Centers for Disease Control and Prevention (1999):

Community outbreak of hemolytic uremic syndrome attributable to *Escherichia coli* O111:NM -- South Australia, 1995. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 44(29), 550-1,7-8

Centers for Disease Control and Prevention (2005):

Outbreaks of *Escherichia coli* O157:H7 associated with petting zoos - North Carolina, Florida, and Arizona, 2004 and 2005. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 54(50), 1277-80.

Centers for Disease Control and Prevention (2006):

Update on multi-state outbreak of *E. coli* O157:H7 infections from fresh spinach, october 6, 2006. abgerufen am 01.11.2009. <http://www.cdc.gov/foodborne/ecolispinach/100606.htm>.

Centers for Disease Control and Prevention (2007a):

Compendium of measures to prevent disease associated with animals in public settings, 2007. MMWR Recomm Rep. 56(RR05), 1-13.

Centers for Disease Control and Prevention (2007b):

Escherichia coli O157:H7 infection associated with drinking raw milk--Washington and Oregon, November-December 2005. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 56(8), 165-7.

Centers for Disease Control and Prevention (2007c):

Investigation of Outbreak of Human Infections Caused by *E. coli* O157:H7. abgerufen am 01.11.2009.

<http://www.cdc.gov/ecoli/2007/october/103107.html>.

Centers for Disease Control and Prevention (2007d):

Multistate outbreak of *E. coli* O157 infections linked to Topp's Brand ground beef patties. abgerufen am 01.11.2009.

<http://www.cdc.gov/ecoli/2007/october/100207.html>.

Centers for Disease Control and Prevention (2008):

Investigation of multistate outbreak of *E. coli* O157:H7 infections. abgerufen am 01.11.2009.

http://www.cdc.gov/ecoli/june2008outbreak/index_071608.html.

Chalmers, R. M.; Salmon, R. L.; Willshaw, G. A.; Cheasty, T.; Looker, N.; Davies, I.; Wray, C. (1997):

Vero-cytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in a farmer handling horses.

Lancet, 349(9068), 1816.

Chapman, P. A.; Siddons, C. A.; Malo, A. T. C.; Harkin, M. A. (1997):

A 1-year study of *Escherichia coli* O157 in cattle, sheep, pigs and poultry.

Epidemiol Infect. 119(2), 245-50.

Chase-Topping, M.; Gally, D.; Low, C.; Matthews, L.; Woolhouse, M. (2008):

Super-shedding and the link between human infection and livestock carriage of *Escherichia coli* O157.

Nat Rev Microbiol. 6(12), 904-12.

Chase-Topping, M. E.; McKendrick, I. J.; Pearce, M. C.; MacDonald, P.; Matthews, L.; Halliday, J.; Allison, L.; Fenlon, D.; Low, J. C.; Gunn, G.; Woolhouse, M. E. J. (2007):

Risk factors for the presence of high-level shedders of *Escherichia coli* O157 on Scottish farms.

J Clin Microbiol. 45(5), 1594-603.

Chen, C. S.; Lyte, M.; Stevens, M. P.; Vulchanova, L.; Brown, D. R. (2006):

Mucosally-directed adrenergic nerves and sympathomimetic drugs enhance non-intimate adherence of *Escherichia coli* O157 : H7 to porcine cecum and colon.

Eur J Pharmacol. 539(1-2), 116-24.

Ciftcioglu, G.; Arun, O. O.; Vural, A.; Aydin, A.; Aksu, H. (2008):

Survival of *Escherichia coli* O157 : H7 in minced meat and hamburger patties.

Journal of Food, Agriculture & Environment, 6(1), 24-7.

Civera, T.; Decastelli, L.; Martorana, M.; Dalmasso, A.; Nucera, D.; Bottero, M. T. (2007):

Survey on the presence of enterovirulent *Escherichia coli*, including *E. coli* O157, in cheese manufactured in the Italian alpine region.

Ital J Food Sci. 19(2), 229-38.

Cobbold, R.; Desmarchelier, P. (2002):

Horizontal transmission of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* within groups of dairy calves.
Appl Environ Microbiol. 68(8), 4148-52.

Cobbold, R. N.; Desmarchelier, P. M. (2004):

In vitro studies on the colonization of bovine colonic mucosa by Shiga-toxigenic *Escherichia coli* (STEC).

Epidemiol Infect. 132(1), 87-94.

Cobbold, R. N.; Hancock, D. D.; Rice, D. H.; Berg, J.; Stilborn, R.; Hovde, C. J.; Besser, T. E. (2007):

Rectoanal junction colonization of feedlot cattle by *Escherichia coli* O157 : H7 and its association with supershedders and excretion dynamics.

Appl Environ Microbiol. 73(5), 1563-8.

Cobbold, R. N.; Rice, D. H.; Szymanski, M.; Call, D. R.; Hancock, D. D. (2004):

Comparison of shiga-toxigenic *Escherichia coli* prevalences among dairy, feedlot, and cow-calf herds in Washington State.

Appl Environ Microbiol. 70(7), 4375-8.

Collard, B. L.; Boettcher, P. J.; Dekkers, J. C. M.; Schaeffer, L. R.; Petitclerc, D. (1999):

Relationships between Energy Balance and Health Traits of Dairy Cattle in Early Lactation.
In: Metabolic stress in dairy cows, British Society of Animal Science.

Conedera, G.; Chapman, P. A.; Marangon, S.; Tisato, E.; Dalvit, P.; Zuin, A. (2001):

A field survey of *Escherichia coli* O157 ecology on a cattle farm in Italy.

Int J Food Microbiol. 66(1-2), 85-93.

Cornick, N. A.; Helgerson, A. F.; Mai, V.; Ritchie, J. M.; Acheson, D. W. K. (2006):

In vivo transduction of an Stx-encoding phage in ruminants.

Appl Environ Microbiol. 72(7), 5086-8.

Costa, M.; Brookes, S. J. H.; Hening, G. W. (2000):

Anatomy and physiology of the enteric nervous system.

Gut., 47, 15-9.

Creuzburg, K.; Schmidt, H. (2007):

Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and their bacteriophages as a model for the analysis of virulence and stress response of a food-borne pathogen.

Berl Münch Tierärztl Wochenschr. 120(7-8), 288-95.

De Rycke, J.; Milon, A.; Oswald, E. (1999):

Necrotoxic *Escherichia coli* (NTEC): two emerging categories of human and animal pathogens. Vet Res. 30(2-3), 221-33.

De Schrijver, K.; Buvens, G.; Possé, B.; Van den Branden, D.; Oosterlynck, O.; De Zutter, L.; Eilers, K.; Piérard, D.; Dierick, K.; Van Damme-Lombaerts, R.; Lauwers, C.; Jacobs, R. (2008):

Outbreak of verocytotoxin-producing *E.coli* O145 and O26 infections associated with the consumption of ice cream produced at a farm, Belgium, 2007.

Euro Surveill. 13(1-3), 1-4.

Dean-Nystrom, E. A.; Bosworth, B. T.; Cray, W. C., Jr.; Moon, H. W. (1997):

Pathogenicity of *Escherichia coli* O157:H7 in the intestines of neonatal calves.

Infect Immun. 65(5), 1842-8.

Degradandis, S.; Law, H.; Brunton, J.; Gyles, C.; Lingwood, C. A. (1989):

Globotetraosylceramide Is Recognized by the Pig Edema Disease Toxin.

J Biol Chem. 264(21), 12520-5.

Denny, J.; Bhat, M.; Eckmann, K. (2008):

Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 associated with raw milk consumption in the Pacific Northwest.

Foodborne Pathog Dis. 5(3), 321-8.

Dewell, G. A.; Ransom, J. R.; Dewell, R. D.; McCurdy, K.; Gardner, I. A.; Hill, A. E.; Sofos, J. N.; Belk, K. E.; Smith, G. C.; Salman, M. D. (2005):

Prevalence of and risk factors for *Escherichia coli* O157 in market-ready beef cattle from 12 US feedlots.

Foodborne Pathog Dis. 2(1), 70-6.

Diez-Gonzalez, F.; Callaway, T. R.; Kizoulis, M. G.; Russell, J. B. (1998):

Grain feeding and the dissemination of acid-resistant *Escherichia coli* from cattle.

Science, 281(5383), 1666-8.

Dodd, C. C.; Sanderson, M. W.; Sargeant, J. M.; Nagaraja, T. G.; Oberst, R. D.; Smith, R. A.; Griffin, D. D. (2003):

Prevalence of *Escherichia coli* O157 in cattle feeds in midwestern feedlots.

Appl Environ Microbiol. 69(9), 5243-7.

Dopfer, D.; Geue, L.; de Bree, J.; de Jong, M. C. M. (2006):

Dynamics of verotoxin-producing *Escherichia coli* isolated from German beef cattle between birth and slaughter.

Prev Vet Med. 73(4), 229-40.

Doughty, S.; Sloan, J.; Bennett-Wood, V.; Robertson, M.; Robins-Browne, R. M.; Hartland, E. L. (2002):

Identification of a novel fimbrial gene cluster related to long polar fimbriae in locus of enterocyte effacement-negative strains of enterohemorrhagic *Escherichia coli*.
Infect Immun. 70(12), 6761-9.

Drazen, D. L.; Bilu, D.; Bilbo, S. D.; Nelson, R. J. (2001):

Melatonin enhancement of splenocyte proliferation is attenuated by luzindole, a melatonin receptor antagonist.

Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 280(5), R1476-R82.

Dunn, J. R.; Keen, J. E.; Del Vecchio, R.; Wittum, T. E.; Thompson, R. A. (2004a):

Escherichia coli O157:H7 in a cohort of weaned, preconditioned range beef calves.

J Food Prot. 67(11), 2391-6.

Dunn, J. R.; Keen, J. E.; Moreland, D.; Alex, T. (2004b):

Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 in white-tailed deer from Louisiana.

J Wildl Dis. 40(2), 361-5.

Durso, L. M.; Reynolds, K.; Bauer, N.; Keen, J. E. (2005):

Shiga-toxigenic *Escherichia coli* O157 : H7 infections among livestock exhibitors and visitors at a Texas County fair.

Vector Borne Zoonotic Dis. 5(2), 193-201.

Dutta, S.; Chatterjee, A.; Dutta, P.; Rajendran, K.; Roy, S.; Pramanik, K. C.; Bhattacharya, S. K. (2001):

Sensitivity and performance characteristics of a direct PCR with stool samples in comparison to conventional techniques for diagnosis of Shigella and enteroinvasive *Escherichia coli* infection in children with acute diarrhoea in Calcutta, India.

J Med Microbiol. 50(8), 667-74.

Dytoc, M. T.; Ismaili, A.; Philpott, D. J.; Soni, R.; Brunton, J. L.; Sherman, P. M. (1994):

Distinct binding properties of eaeA-negative verocytotoxin-producing *Escherichia coli* of serotype O113:H21.

Infect Immun. 62(8), 3494-505.

Dziva, F.; van Diemen, P. M.; Stevens, M. P.; Smith, A. J.; Wallis, T. S. (2004):

Identification of *Escherichia coli* O157 : H7 genes influencing colonization of the bovine gastrointestinal tract using signature-tagged mutagenesis.

Microbiology, 150(Pt 11), 3631-45.

Edrington, T. S.; Callaway, T. R.; Hallford, D. M.; Anderson, R. C.; Nisbet, D. J. (2007):

Influence of exogenous triiodothyronine (T-3) on fecal shedding of *Escherichia coli* O157 in cattle.

Microb. Ecol. 53(4), 664-9.

Edrington, T. S.; Callaway, T. R.; Hallford, D. M.; Chen, L.; Anderson, R. C.; Nisbet, D. J. (2008):

Effects of exogenous melatonin and tryptophan on fecal shedding of *E. coli* O157 : H7 in cattle. Microb. Ecol. 55(3), 553-60.

Edrington, T. S.; Callaway, T. R.; Ives, S. E.; Engler, M. J.; Looper, M. L.; Anderson, R. C.; Nisbet, D. J. (2006):

Seasonal shedding ruminants of *Escherichia coli* O157 : H7 in a new hypothesis. Foodborne Pathog Dis. 3(4), 413-21.

Eisenhofer, G.; Aneman, A.; Hooper, D.; Holmes, C.; Goldstein, D. S.; Friberg, P. (1995):

Production and metabolism of Dopamine and Norepinephrine in mesenteric organs and liver of Swine.

Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 31(4), G641-G9.

Ellis-Iversen, J.; Smith, R. P.; Snow, L. C.; Watson, E.; Millar, M. F.; Pritchard, G. C.; Sayers, A. R.; Cook, A. J. C.; Evans, S. J.; Paiba, G. A. (2007):

Identification of management risk factors for VTEC O157 in young-stock in England and Wales. Prev Vet Med. 82(1-2), 29-41.

Ellis-Iversen, J.; Smith, R. P.; Van Winden, S.; Paiba, G. A.; Watson, E.; Snow, L. C.; Cook, A. J. C. (2008):

Farm practices to control *E. coli* O157 in young cattle - A randomised controlled trial. Vet Res. 39(1). 03

Endo, Y.; Tsurugi, K.; Yutsudo, T.; Takeda, Y.; Ogasawara, T.; Igarashi, K. (1988):

Site of action of a Vero Toxin (Vt2) from *Escherichia coli* O157-H7 and of Shiga Toxin on eukaryotic ribosomes - rna n-glycosidase activity of the toxins.

Eur J Biochem. 171(1-2), 45-50.

Ergonul, Z.; Clayton, F.; Fogo, A. B.; Kohan, D. E. (2003):

Shigatoxin-1 binding and receptor expression in human kidneys do not change with age. Pediatr Nephrol. 18(3), 246-53.

Esslemont, R. J.; Peeler, E. J. (1993):

The scope for raising margins in dairy herds by improving fertility and health. Br Vet J. 149(6), 537-47.

Ethelberg, S.; Olsen, K. E. P.; Scheutz, F.; Jensen, C.; Schiellerup, P.; Engberg, J.; Petersen, A. M.; Olesen, B.; Gerner-Smidt, P.; Molbak, K. (2004):

Virulence factors for hemolytic uremic syndrome, Denmark. Emerg Infect Dis. 10(5), 842-7.

- Ethelberg, S.; Smith, B.; Torpdahl, M.; Lisby, M.; Boel, J.; Jensen, T.; Mølbak, K. (2007):**
An outbreak of Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O26:H11 caused by beef sausage, Denmark 2007.
Euro Surveill. 12(22), pii=3208.
- Ezawa, A.; Gocho, F.; Saitoh, M.; Tamura, T.; Kawata, K.; Takahashi, T.; Kikuchi, N. (2004):**
A three-year study of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 on a farm in Japan.
J Vet Med Sci. 66(7), 779-84.
- Faith, N. G.; Shere, J. A.; Brosch, R.; Arnold, K. W.; Ansay, S. E.; Lee, M. S.; Luchansky, J. B.; Kaspar, C. W. (1996):**
Prevalence and clonal nature of *Escherichia coli* O157:H7 on dairy farms in Wisconsin.
Appl Environ Microbiol. 62(5), 1519-25.
- Fantelli, K.; Stephan, R. (2001):**
Prevalence and characteristics of Shigatoxin-producing *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* strains isolated from minced meat in Switzerland.
Int J Food Microbiol. 70(1-2), 63-9.
- Farmer, J. J., 3rd; Davis, B. R.; Hickman-Brenner, F. W.; McWhorter, A.; Huntley-Carter, G. P.; Asbury, M. A.; Riddle, C.; Wathen-Grady, H. G.; Elias, C.; Fanning, G. R.; et al. (1985):**
Biochemical identification of new species and biogroups of Enterobacteriaceae isolated from clinical specimens.
J Clin Microbiol. 21(1), 46-76.
- Fehlhaber, K. (2004):**
Verderb.
In: Einführung in die Lebensmittelhygiene. / Hrsg. H.-J. Sinell. - Stuttgart: Parey Verlag. S. 107-32.
- Fenlon, D. R.; Wilson, J. (2000):**
Growth of *Escherichia coli* O157 in poorly fermented laboratory silage: a possible environmental dimension in the epidemiology of *E. coli* O157.
Lett Appl Microbiol. 30(2), 118-21.
- Finlay, B. B.; Ruschkowski, S.; Kenny, B.; Stein, M.; Reinscheid, D. J.; Stein, M. A.; Rosenshine, I. (1996):**
Enteropathogenic *E. coli* exploitation of host epithelial cells.
Ann N Y Acad Sci. 797, 26-31.
- Fitzgerald, A. C.; Edrington, T. S.; Loofer, M. L.; Callaway, T. R.; Genovese, K. J.; Bischoff, K. M.; McReynolds, J. L.; Thomas, J. D.; Anderson, R. C.; Nisbet, D. J. (2003):**
Antimicrobial susceptibility and factors affecting the shedding of *E. coli* O157 : H7 and Salmonella in dairy cattle.
Lett Appl Microbiol. 37(5), 392-8.

Fitzhenry, R. J.; Pickard, D. J.; Hartland, E. L.; Reece, S.; Dougan, G.; Phillips, A. D.; Frankel, G. (2002):

Intimin type influences the site of human intestinal mucosal colonisation by enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7.

Gut, 50(2), 180-5.

Flachowsky, G.; Lebzien, P.; Meyer, U. (2002):

Benefits and limitations of high milk yields from the view of animal nutrition.

Züchtungskunde, 74(2), 85-103.

Franz, E.; van Diepeningen, A. D.; de Vos, O. J.; van Bruggen, A. H. C. (2005):

Effects of cattle feeding regimen and soil management type on the fate of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* serovar typhimurium in manure, manure-amended soil, and lettuce.

Appl Environ Microbiol. 71(10), 6165-74.

Freestone, P. P. E.; Haigh, R. D.; Williams, P. H.; Lyte, M. (1999):

Stimulation of bacterial growth by heat-stable, norepinephrine-induced autoinducers.

FEMS Microbiol Lett. 172(1), 53-60.

Freestone, P. P. E.; Haigh, R. D.; Williams, P. H.; Lyte, M. (2003):

Involvement of enterobactin in norepinephrine-mediated iron supply from transferrin to enterohaemorrhagic *Escherichia coli*.

FEMS Microbiol Lett. 222(1), 39-43.

Freestone, P. P. E.; Lyte, M.; Neal, C. P.; Maggs, A. F.; Haigh, R. D.; Williams, P. H. (2000):

The mammalian neuroendocrine hormone norepinephrine supplies iron for bacterial growth in the presence of transferrin or lactoferrin.

J Bacteriol. 182(21), 6091-8.

Fremaux, B.; Raynaud, S.; Beutin, L.; Rozand, C. V. (2006):

Dissemination and persistence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains on French dairy farms.

Vet Microbiol. 117(2-4), 180-91.

French multi-agency outbreak investigation team (2005):

Outbreak of *E. coli* O157:H7 infections associated with a brand of beefburgers in France.

Euro Surveill. 10(44), pii=2825.

Fritze, H.-J. (2003):

Einfluss der Körperkondition von Milchkühen zu verschiedenen Zeitpunkten während des Reproduktionszyklus auf das Fruchtbarkeitsgeschehen.

Berlin, Freie Universität, Dissertation.

Fuchs, S.; Muhldorfer, I.; Donohue-Rolfe, A.; Kerenyi, M.; Emody, L.; Alexiev, R.; Nenkov, P.; Hacker, J. (1999):

Influence of RecA on in vivo virulence and Shiga toxin 2 production in *Escherichia coli* pathogens.

Microb Pathog. 27(1), 13-23.

Fukushima, H.; Hoshina, K.; Gomyoda, M. (1999):

Long-term survival of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26, O113, and O157 in bovine feces.

Appl Environ Microbiol. 65(11), 5177-81.

Fukushima, H.; Seki, R. (2004):

High numbers of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* found in bovine faeces collected at slaughter in Japan.

FEMS Microbiol Lett. 238(1), 189-97.

Gallien, P.; Klie, H.; Perlberg, K. W.; Protz, D. (1996):

Utilization of nylon membranes for the specified isolation and characterization of verotoxin-producing *Escherichia coli* by using DNA-probes.

Berl Münch Tierärztl Wochenschr. 109(11-12), 431-3.

Gallien, P.; Much, C.; Perlberg, K. W.; Protz, D. (1999):

Utilization of Nylon membranes for the specific isolation of *Escherichia coli* O157 by using DNA-probes and checking the isolates of belonging to the group of shigatoxin-producing *Escherichia coli* (STEC).

Berl Münch Tierärztl Wochenschr. 112(2), 58-63.

Gallien, P.; Richter, H.; Klie, H.; Timm, M.; Karch, H.; Perlberg, K. W.; Steinruck, H.; Riemer, S.; Djuren, M.; Protz, D. (1997):

Detection of STEC and epidemiological investigations in surrounding of a HUS patient.

Berl Münch Tierärztl Wochenschr. 110(9), 342-6.

Gallien, P. K., H.; Lehmann, S.; Protz, D.; Helmuth, R.; Schäfer, R.; Ehrler, M. (1994):

Nachweis verotoxinbildender *E. coli* in Feldisolaten von Haus- und landwirtschaftlichen Nutztieren in Sachsen- Anhalt.

Berl Münch Tierärztl Wochenschr. 107, 331-4.

Garber, L.; Wells, S.; Schroeder-Tucker, L.; Ferris, K. (1999):

Factors associated with fecal shedding of verotoxin-producing *Escherichia coli* O157 on dairy farms.

J. Food Prot. 62(4), 307-12.

Garber, L. P.; Wells, S. J.; Hancock, D. D.; Doyle, M. P.; Tuttle, J.; Shere, J. A.; Zhao, T. (1995):

Risk-factors for fecal shedding of *Escherichia coli* O157-H7 in dairy calves.

J Am Vet Med Assoc. 207(1), 46-9.

Garrido, P.; Blanco, M.; Moreno-Paz, M.; Briones, C.; Dahbi, G.; Blanco, J.; Blanco, J.; Parro, V. (2006):

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

Clin Chem. 52(2), 192-201.

Gasser, C.; Gautier, E.; Steck, A.; Siebenmann, R. E.; Oechslin, R. (1955):

Hemolytic-uremic syndrome: bilateral necrosis of the renal cortex in acute acquired hemolytic anemia.

Schweiz Med Wochenschr. 85(38-39), 905-9.

Gerber, A.; Karch, H.; Allerberger, F.; Verweyen, H. M.; Zimmerhackl, L. B. (2002):

Clinical course and the role of shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection in the hemolytic-uremic syndrome in pediatric patients, 1997-2000, in Germany and Austria: a prospective study.

J Infect Dis. 186(4), 493-500.

Geue, L.; Segura-Alvarez, M.; Conraths, F. J.; Kuczius, T.; Bockemuhl, J.; Karch, H.; Gallien, P. (2002):

A long-term study on the prevalence of shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) on four German cattle farms.

Epidemiol Infect. 129(1), 173-85.

Gianviti, A.; Tozzi, A. E.; De Petris, L.; Caprioli, A.; Rava, L.; Edefonti, A.; Ardissino, G.; Montini, G.; Zacchello, G.; Ferretti, A.; Pecoraro, C.; De Palo, T.; Caringella, A.; Gaido, M.; Coppo, R.; Perfumo, F.; Miglietti, N.; Ratsche, I.; Penza, R.; Capasso, G.; Maringhini, S.; Li Volti, S.; Setzu, C.; Pennesi, M.; Bettinelli, A.; Peratoner, L.; Pela, I.; Salvaggio, E.; Lama, G.; Maffei, S.; Rizzoni, G. (2003):

Risk factors for poor renal prognosis in children with hemolytic uremic syndrome.

Pediatr Nephrol. 18(12), 1229-35.

Gibson, A. M.; Roberts, T. A. (1986):

The effect of pH, water activity, sodium nitrite and storage temperature on the growth of enteropathogenic *Escherichia coli* and salmonellae in a laboratory medium.

Int J Food Microbiol. 3, 183-94.

Glass, K. A.; Loeffelholz, J. M.; Ford, J. P.; Doyle, M. P. (1992):

Fate of *Escherichia coli* O157:H7 as affected by pH or sodium chloride and in fermented, dry sausage.

Appl Environ Microbiol. 58(8), 2513-6.

Goff, J. P. (2006):

Major advances in our understanding of nutritional influences on bovine health.

J Dairy Sci. 89(4), 1292-301.

Goncalves, V. P.; Morin, J. M. (2007):

Fate of non O157 Shiga toxicogenic *Escherichia coli* in composted cattle manure.
Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia, 59(4), 825-31.

Gorden, J.; Small, P. L. (1993):

Acid resistance in enteric bacteria.
Infect Immun. 61(1), 364-7.

Grabowski, N. (2000):

Körpergewichtsentwicklung, Milchinhaltsstoffe und Milchmengenleistung als Kriterien zur laktationsbegleitenden Beurteilung des Gesundheitszustandes hochleistender DSB – Kühe in Laufstallhaltung.

Hannover, Tierärztliche Hochschule, Dissertation.

Green, B. T.; Lyte, M.; Chen, C. S.; Xie, Y. H.; Casey, M. A.; Kulkarni-Narla, A.; Vulchanova, L.; Brown, D. R. (2004):

Adrenergic modulation of *Escherichia coli* O157 : H7 adherence to the colonic mucosa.
Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 287(6), G1238-G46.

Greenquist, M. A.; Drouillard, J. S.; Sargeant, J. M.; Depenbusch, B. E.; Shi, X. R.; Lechtenberg, K. F.; Nagaraja, T. G. (2005):

Comparison of rectoanal mucosal swab cultures and fecal cultures for determining prevalence of *Escherichia coli* O157 : H7 in feedlot cattle.

Appl Environ Microbiol. 71(10), 6431-3.

Griffin, P. M.; Tauxe, R. V. (1991):

The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157-H7, other enterohemorrhagic *Escherichia coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome.

Epidemiol Rev. 13, 60-98.

Gunn, G. J.; McKendrick, I. J.; Ternent, H. E.; Thomson-Carter, F.; Foster, G.; Synge, B. A. (2007):

An investigation of factors associated with the prevalence of verocytotoxin producing *Escherichia coli* O157 shedding in Scottish beef cattle.

Br Vet J. 174(3), 554-64.

Gunning, R. F.; Wales, A. D.; Pearson, G. R.; Done, E.; Cookson, A. L.; Woodward, M. J. (2001):

Attaching and effacing lesions in the intestines of two calves associated with natural infection with *Escherichia coli* O26:H11.

Vet Rec. 148(25), 780-2.

Gyles, C.; Johnson, R.; Gao, A. L.; Ziebell, K.; Pierard, D.; Aleksic, S.; Boerlin, P. (1998):

Association of enterohemorrhagic *Escherichia coli* hemolysin with serotypes of Shiga-like-toxin-producing *Escherichia coli* of human and bovine origins.

Appl Environ Microbiol. 64(11), 4134-41.

Gyles, C. L. (2007):

Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview.
J Anim Sci. 85(13 Suppl), E45-62.

Hahn, H.; Falke, D.; Kaufmann, S. H. E.; Ullmann, U. (1999):

Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. 3. Auflage.
Berlin-Heidelberg-New York: Springer-Verlag.

Hall, G. A.; Reynolds, D. J.; Chanter, N.; Morgan, J. H.; Parsons, K. R.; Debney, T. G.; Bland, A. P.; Bridger, J. C. (1985):

Dysentery caused by *Escherichia coli* (S102-9) in calves: natural and experimental disease.
Vet Pathol. 22(2), 156-63.

Hancock, D.; Besser, T.; Lejeune, J.; Davis, M.; Rice, D. (2001):

The control of VTEC in the animal reservoir.
Int J Food Microbiol. 66(1-2), 71-8.

Hancock, D. D.; Besser, T. E.; Kinsel, M. L.; Tarr, P. I.; Rice, D. H.; Paros, M. G. (1994):

The Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 in dairy and beef-cattle in Washington-State.
Epidemiol Infect. 113(2), 199-207.

Hancock, D. D.; Besser, T. E.; Rice, D. H. (1998a):

Ecology of *Escherichia coli* O157:H7 in Cattle and the Impact of Management Practices.
In: *Escherichia coli* O157:H7 and Other Shiga Toxin-Producing *E. coli* Strains. / Hrsg. J. B. Kaper and A. D. O'Brien. - Washington, DC: ASM Press. S. 85-91.

Hancock, D. D.; Besser, T. E.; Rice, D. H.; Ebel, E. D.; Herriott, D. E.; Carpenter, L. V. (1998b):

Multiple sources of *Escherichia coli* O157 in feedlots and dairy farms in the northwestern USA.
Prev Vet Med. 35(1), 11-9.

Hancock, D. D.; Besser, T. E.; Rice, D. H.; Herriott, D. E.; Tarr, P. I. (1997a):

A longitudinal study of *Escherichia coli* O157 in fourteen cattle herds.
Epidemiol Infect. 118(2), 193-5.

Hancock, D. D.; Rice, D. H.; Herriott, D. E.; Besser, T. E.; Ebel, E. D.; Carpenter, L. V. (1997b):

Effects of farm manure-handling practices on *Escherichia coli* O157 prevalence in cattle.
J Food Prot. 60(4), 363-6.

Hancock, D. D.; Rice, D. H.; Thomas, L. A.; Dargatz, D. A.; Besser, T. E. (1997c):

Epidemiology of *Escherichia coli* O157 in feedlot cattle.
J Food Prot. 60(5), 462-5.

Herriott, D. E.; Hancock, D. D.; Ebel, E. D.; Carpenter, L. V.; Rice, D. H.; Besser, T. E. (1998):

Association of herd management factors with colonization of dairy cattle by shiga toxin-positive *Escherichia coli* O157.

J Food Prot. 61(7), 802-7.

Heuvelink, A. E.; Bleumink, B.; van den Biggelaar, F. L. A. M.; Giffel, M. C. T.; Beumer, R. R.; de Boer, E. (1998a):

Occurrence and survival of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in raw cow's milk in the Netherlands.

J Food Prot. 61(12), 1597-601.

Heuvelink, A. E.; van den Biggelaar, F. L. A. M.; de Boer, E.; Herbes, R. G.; Melchers, W. J. G.; Huis In 'T Veld, J. H. J.; Monnens, L. A. H. (1998b):

Isolation and characterization of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 strains from Dutch cattle and sheep.

J Clin Microbiol. 36(4), 878-82.

Heuvelink, A. E.; van den Biggelaar, F. L. A. M.; Zwartkruis-Nahuis, J. T. M.; Herbes, R. G.; Huyben, R.; Nagelkerke, N.; Melchers, W. J. G.; Monnens, L. A. H.; de Boer, E. (1998c):

Occurrence of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 on Dutch daily farms.

J Clin Microbiol. 36(12), 3480-7.

Hilborn, E. D.; Mshar, P. A.; Fiorentino, T. R.; Dembek, Z. F.; Barrett, T. J.; Howard, R. T.; Cartter, M. L. (2000):

An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections and haemolytic uraemic syndrome associated with consumption of unpasteurized apple cider.

Epidemiol Infect. 124(1), 31-6.

Holt, J. G.; Krieg, N. R.; Sneath, P. H. A.; Staley, J. T.; Williams, S. T. (1994):

Genus *Escherichia*.

In: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.

Baltimore: Williams & Wilkins Verlag, S. 179-80.

Hörzer, J.; Awad-Masalmeh, M. (2000):

Prevalence of shigatoxinogenic *Escherichia coli* (STEC) in several species of carnivoras and poultry as well as some other species.

Wien Tierärztl Monatsschr. 87(5), 154-8.

Hovde, C. J.; Austin, P. R.; Cloud, K. A.; Williams, C. J.; Hunt, C. W. (1999):

Effect of cattle diet on *Escherichia coli* O157 : H7 acid resistance.

Appl Environ Microbiol. 65(7), 3233-5.

Hughes, D. T.; Sperandio, V. (2008):

Inter-kingdom signalling: communication between bacteria and their hosts.
Nat Rev Microbiol. 6(2), 111-20.

Hussein, H. S.; Sakuma, T. (2005):

Invited review: Prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in dairy cattle and their products.
J Dairy Sci. 88(2), 450-65.

Hussein, H. S.; Thran, B. H.; Hall, M. R.; Kvasnicka, W. G.; Torell, R. C. (2003):

Verotoxin-producing *Escherichia coli* in culled beef cows grazing rangeland forages.
Exp Biol Med. 228(4), 352-7.

Hutchison, M. L.; Thomas, D. J. I.; Avery, S. M. (2007):

Thermal death of *Escherichia coli* O157 : H7 in cattle feeds.
Lett Appl Microbiol. 44(4), 357-63.

Hutchison, M. L.; Thomas, D. J. I.; Walters, L. D.; Avery, S. M. (2006):

Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, faecal coliforms and coliphage in animal feeds.
Lett Appl Microbiol. 43(2), 205-10.

Huth, F. W. (1995):

Die Laktation des Rindes. Analyse, Einfluß, Korrektur.
Stuttgart: Ulmer -Verlag.

Janke, B. H.; Francis, D. H.; Collins, J. E.; Libal, M. C.; Zeman, D. H.; Johnson, D. D. (1989):

Attaching and effacing *Escherichia coli* infections in calves, pigs, lambs, and dogs.
J Vet Diagn Invest. 1(1), 6-11.

Jensen, A. N.; Andersen, M. T.; Dalsgaard, A.; Baggesen, D. L.; Nielsen, E. M. (2005):

Development of real-time PCR and hybridization methods for detection and identification of thermophilic *Campylobacter* spp. in pig faecal samples.
J Appl Microbiol. 99(2), 292-300.

Johnsen, G.; Wasteson, Y.; Heir, E.; Berget, O. I.; Herikstad, H. (2001):

Escherichia coli O157:H7 in faeces from cattle, sheep and pigs in the southwest part of Norway during 1998 and 1999.
Int J Food Microbiol. 65(3), 193-200.

Kaddu-Mulindwa, D. H.; Aisu, T.; Gleier, K.; Zimmermann, S.; Beutin, L. (2001):

Occurrence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in fecal samples from children with diarrhea and from healthy zebu cattle in Uganda.
Int J Food Microbiol. 66(1-2), 95-101.

Kang, S. J.; Ryu, S. J.; Chae, J. S.; Eo, S. K.; Woo, G. J.; Lee, J. H. (2004):

Occurrence and characteristics of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 in calves associated with diarrhoea.

Vet Microbiol. 98(3-4), 323-8.

Kaper, J. B. (1996):

Defining EPEC.

Revista De Microbiologia, 27, 130-3.

Kaper, J. B. (1998):

The locus of enterocyte effacement pathogenicity island of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 and other attaching and effacing *E. coli*.

Jpn J Med Sci Biol. 51 Suppl, S101-7.

Karch, H.; Bielaszewska, M. (2001):

Sorbitol-fermenting Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H(-) strains: epidemiology, phenotypic and molecular characteristics, and microbiological diagnosis.

J Clin Microbiol. 39(6), 2043-9.

Karch, H.; Goroncy-Bermes, P.; Opferkuch, W.; Kroll, H. P.; O'Brien, A. (1985):

Subinhibitory Concentrations of Antibiotics Modulate Amount of Shiga-like Toxins Produced by *Escherichia coli*.

In: The Influence of Antibiotics on the Host-Parasite Relationship. / Hrsg. D. Adam, H. Hahn und W. Opferkuch. – Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag. S. 239-45.

Karch, H.; Huppertz, H. I.; Bockemuhl, J.; Schmidt, H.; Schwarzkopf, A.; Lissner, R. (1997):

Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in Germany.

J Food Prot. 60(11), 1454-7.

Karch, H.; Köhler, B. (1999):

Neue Erkenntnisse zur Molekularbiologie der enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC) O157.

Gesundheitswesen, 61(Supplement 1), S46-S51.

Karch, H.; Meyer, T. (1989):

Single primer pair for amplifying segments of distinct shiga-like-toxin genes by polymerase chain-reaction.

J Clin Microbiol. 27(12), 2751-7.

Karch, H.; Meyer, T.; Russmann, H.; Heesemann, J. (1992):

Frequent loss of shiga-like toxin genes in clinical isolates of *Escherichia coli* upon subcultivation.

Infect Immun. 60(8), 3464-7.

Karmali, M. A. (1989):

Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*.
Clin Microbiol Rev. 2(1), 15-38.

Karmali, M. A.; Lingwood, C. A.; Petric, M.; Brunton, J.; Gyles, C. (1996):

Maintaining the existing phenotype nomenclatures for *E. coli* cytotoxins.
ASM News, 62(4), 167-9.

Karmali, M. A.; Petric, M.; Lim, C.; Cheung, R.; Arbus, G. S. (1985):

Sensitive method for detecting low numbers of verotoxin-producing *Escherichia coli* in mixed cultures by use of colony sweeps and polymyxin extraction of verotoxin.
J Clin Microbiol. 22(4), 614-9.

Karmali, M. A.; Petric, M.; Louie, S.; Cheung, R. (1986):

Antigenic heterogeneity of *Escherichia coli* Verotoxins.
Lancet, 1(8473), 164-5.

Karmali, M. A.; Steele, B. T.; Petric, M.; Lim, C. (1983):

Sporadic cases of haemolytic-uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools.
Lancet, 1(8325), 619-20.

Karns, J. S.; Van Kessel, J. S.; McClusky, B. J.; Perdue, M. L. (2007):

Incidence of *Escherichia coli* O157:H7 and *E. coli* virulence factors in US bulk tank milk as determined by polymerase chain reaction.
J Dairy Sci. 90(7), 3212-9.

Kashiwazaki, M.; Ogawa, T.; Nakamura, K.; Isayama, Y.; Tamura, K.; Sakazaki, R. (1981):

Vero Cyto-Toxin Produced by *Escherichia coli* Strains of Animal Origin.
Natl Inst Anim Health Q (Tokyo). 21(2), 68-72.

Kaye, S. A.; Louise, C. B.; Boyd, B.; Lingwood, C. A.; Obrig, T. G. (1993):

Shiga Toxin-associated hemolytic-uremic syndrome - interleukin-1-beta enhancement of Shiga Toxin cytotoxicity toward human vascular endothelial-cells *in vitro*.
Infect Immun. 61(9), 3886-91.

Keen, J. E.; Elder, R. O. (2002):

Isolation of shiga-toxicogenic *Escherichia coli* O157 from hide surfaces and the oral cavity of finished beef feedlot cattle.
J Am Vet Med Assoc. 220(6), 756-63.

Keen, J. E.; Uhlich, G. A.; Elder, R. O. (1999):

Effects of hay- and grain-based diets on fecal shedding in naturally-acquired enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 in beef feedlot cattle.
80th conference Research Workers in animal Diseases, Chicago/USA, 7.-9.11.1999

Keene, W. E.; Hedberg, K.; Herriott, D. E.; Hancock, D. D.; McKay, R. W.; Barrett, T. J.; Fleming, D. W. (1997):

A prolonged outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections caused by commercially distributed raw milk.

J Infect Dis. 176(3), 815-8.

Kemper, N. (2007):

Teilprojekt C: Tierhaltung: Tiergesundheit und Antibiotikarückstände in der Milchviehhaltung.

In: Ergebnisse des Projektes „COMPASS“. / Hrsg. F. Taube, M. Kelm und J.-A. Verreet. Kiel. S. 62-6.

Keusch, G. T.; Jacewicz, M.; Acheson, D. W.; Donohue-Rolfe, A.; Kane, A. V.; McCluer, R. H. (1995):

Globotriaosylceramide, Gb3, is an alternative functional receptor for Shiga-like toxin 2e.

Infect Immun. 63(3), 1138-41.

Kielwein, G. (1994):

Leitfaden der Milchkunde und Milchhygiene. 3. Auflage

Berlin: Blackwell Wissenschafts-Verlag.

Kimmit, P. T.; Harwood, C. R.; Barer, M. R. (2000):

Toxin gene expression by shiga toxin-producing *Escherichia coli*: the role of antibiotics and the bacterial SOS response.

Emerg Infect Dis. 6(5), 458-65.

Klie, H.; Timm, M.; Richter, H.; Gallien, P.; Perlberg, K. W.; Steinruck, H. (1997):

Detection and occurrence of verotoxin-forming and/or shigatoxin producing *Escherichia coli* (VTEC and/or STEC) in milk.

Berl Münch Tierärztl Wochenschr. 110(9), 337-41.

Kobayashi, Y.; El-Sawy, H. B. I. (2007):

Year-round monitoring of verotoxin-producing *Escherichia coli* from feces of dairy cattle.

Asian-Australas J Anim Sci. 20(5), 789-94.

Köhler, B.; Karch, H.; Schmidt, H. (2000):

Antibacterials that are used as growth promoters in animal husbandry can affect the release of Shiga-toxin-2-converting bacteriophages and Shiga toxin 2 from *Escherichia coli* strains.

Microbiology, 146 (Pt 5), 1085-90.

Köhler, W.; Eggers, H. J.; Fleischer, B.; Marre, R.; Pfister, H.; Pulverer, G. (2001):

Medizinische Mikrobiologie. 8. Auflage.

München-Jena: Urban & Fischer.

Kokai-Kun, J. F.; Melton-Celsa, A. R.; O'Brien, A. D. (2000):

Elastase in intestinal mucus enhances the cytotoxicity of Shiga toxin type 2d.

J Biol Chem. 275(5), 3713-21.

Konowalchuk, J.; Speirs, J. I. (1979):

Response of various cell-lines to *Escherichia coli* toxic products.
Can J Microbiol. 25(3), 335-9.

Konowalchuk, J.; Speirs, J. I.; Stavric, S. (1977):

Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*.
Infect Immun. 18(3), 775-9.

Krause, G.; Zimmermann, S.; Beutin, L. (2005):

Investigation of domestic animals and pets as a reservoir for intimin- (eae) gene positive *Escherichia coli* types.
Vet Microbiol. 106(1-2), 87-95.

Kudva, I. T.; Hatfield, P. G.; Hovde, C. J. (1995):

Effect of diet on the shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in a sheep model.
Appl Environ Microbiol. 61(4), 1363-70.

Kudva, I. T.; Hunt, C. W.; Williams, C. J.; Nance, U. M.; Hovde, C. J. (1997):

Evaluation of dietary influences on *Escherichia coli* O157:H7 shedding by sheep.
Appl Environ Microbiol. 63(10), 3878-86.

Kuhnert, P.; Dubosson, C. R.; Roesch, M.; Homfeld, E.; Doherr, M. G.; Blum, J. W. (2005):

Prevalence and risk-factor analysis of Shiga toxigenic *Escherichia coli* in faecal samples of organically and conventionally farmed dairy cattle.
Vet Microbiol. 109(1-2), 37-45.

La Ragione, R. M.; Best, A.; Woodward, M. J.; Wales, A. D. (2009):

Escherichia coli O157:H7 colonization in small domestic ruminants.
Fems Microbiol Rev. 33(2), 394-410.

Lahti, E.; Ruoho, O.; Rantala, L.; Hanninen, M. L.; Honkanen-Buzalski, T. (2003):

Longitudinal study of *Escherichia coli* O157 in a cattle finishing unit.
Appl Environ Microbiol. 69(1), 554-61.

Large, T. M.; Walk, S. T.; Whittam, T. S. (2005):

Variation in acid resistance among shiga toxin-producing clones of pathogenic *Escherichia coli*.
Appl Environ Microbiol. 71(5), 2493-500.

LeJeune, J. T.; Besser, T. E.; Hancock, D. D. (2001a):

Cattle water troughs as reservoirs of *Escherichia coli* O157.
Appl Environ Microbiol. 67(7), 3053-7.

LeJeune, J. T.; Besser, T. E.; Merrill, N. L.; Rice, D. H.; Hancock, D. D. (2001b):

Livestock drinking water microbiology and the factors influencing the quality of drinking water offered to cattle.

J Dairy Sci. 84(8), 1856-62.

LeJeune, J. T.; Besser, T. E.; Rice, D. H.; Berg, J. L.; Stilborn, R. P.; Hancock, D. D. (2004):

Longitudinal study of fecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in feedlot cattle: Predominance and persistence of specific clonal types despite massive cattle population turnover.

Appl Environ Microbiol. 70(1), 377-84.

LeJeune, J. T.; Hancock, D.; Wasteson, Y.; Skjerve, E.; Urdahl, A. M. (2006):

Comparison of *E. coli* O157 and Shiga toxin-encoding genes (*stx*) prevalence between Ohio, USA and Norwegian dairy cattle.

Int J Food Microbiol. 109(1-2), 19-24.

Leomil, L.; Aidar-Ugrinovich, L.; Guth, B. E.; Irino, K.; Vettorato, M. P.; Onuma, D. L.; de Castro, A. F. (2003):

Frequency of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolates among diarrheic and non-diarrheic calves in Brazil.

Vet Microbiol. 97(1-2), 103-9.

Leung, P. H. M.; Peiris, J. S. M.; Ng, W. W. S.; Robins-Browne, R. M.; Bettelheim, K. A.; Yam, W. C. (2003):

A newly discovered verotoxin variant, VT2g, produced by bovine verocytotoxigenic *Escherichia coli*.

Appl Environ Microbiol. 69(12), 7549-53.

Leung, P. H. M.; Yam, W. C.; Ng, W. W. S.; Peiris, J. S. M. (2001):

The prevalence and characterization of verotoxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle and pigs in an abattoir in Hong Kong.

Epidemiol Infect. 126(2), 173-9.

Levine, M. M. (1987):

Escherichia coli that cause diarrhea - enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent.

J Infect Dis. 155(3), 377-89.

Levine, M. M.; Ferreccio, C.; Prado, V.; Cayazzo, M.; Abrego, P.; Martinez, J.; Maggi, L.; Baldini, M. M.; Martin, W.; Maneval, D.; Kay, B.; Guers, L.; Lior, H.; Wasserman, S. S.; Nataro, J. P. (1993):

Epidemiologic studies of *Escherichia coli* diarrheal infections in a low socioeconomic level periurban community in Santiago, Chile.

Am J Epidemiol. 138(10), 849-69.

Lim, J. Y.; Li, J.; Sheng, H.; Besser, T. E.; Potter, K.; Hovde, C. J. (2007):

Escherichia coli O157:H7 colonization at the rectoanal junction of long-duration culture-positive cattle.

Appl Environ Microbiol. 73(4), 1380-2.

Lin, J.; Smith, M. P.; Chapin, K. C.; Baik, H. S.; Bennett, G. N.; Foster, J. W. (1996):

Mechanisms of acid resistance in enterohemorrhagic *Escherichia coli*.

Appl Environ Microbiol. 62(9), 3094-100.

Lindgren, S. W.; Samuel, J. E.; Schmitt, C. K.; O'Brien, A. D. (1994):

The Specific Activities of Shiga-Like Toxin Type-II (Stx-II) and Stx-II-Related Toxins of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Differ When Measured by Vero Cell Cytotoxicity but Not by Mouse Lethality.

Infect Immun. 62(2), 623-31.

Lingwood, C. A. (1993):

Verotoxins and their glycolipid receptors.

Adv Lipid Res. 25, 189-211.

Lingwood, C. A. (1994):

Verotoxin-binding in human renal sections.

Nephron, 66(1), 21-8.

Liptakova, A.; Siegfried, L.; Rosocha, J.; Podracka, L.; Bogyiova, E.; Kotulova, D. (2004):

A family outbreak of haemolytic uraemic syndrome and haemorrhagic colitis caused by verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157 from unpasteurised cow's milk in Slovakia.

Clin Microbiol Infect. 10(6), 576-8.

Liu, W. C.; Matthews, L.; Chase-Topping, M.; Savill, N. J.; Shaw, D. J.; Woolhouse, M. E. J. (2007):

Metapopulation dynamics of *Escherichia coli* O157 in cattle: an exploratory model.

J R Soc Interface. 4(16), 917-24.

Logue, D. N.; Berry, R. J.; Offer, J. E.; Chaplin, S. J.; Crawshaw, W. M.; Leach, K. A.; Ball, P. J. H.; Bax, J. (1999):

Consequences of 'metabolic load' for lameness and disease.

In: Metabolic stress in dairy cows. / Hrsg. J. D. Oldham. - British Society of Animal Science. Penicuik, Midlothian, Scotland, Occasional Publication 24, 83-98.

Lopez, E. L.; Contrini, M. M.; De Rosa, M. F. (1998):

Epidemiology of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Infections in South America.

In: *Escherichia coli* O157:H7 and other shiga toxin-producing *E. coli* strains. / Hrsg. J. B. Kaper und A. D. O'Brien. - Washington D.C.: ASM Press, 30-7.

Louise, C. B.; Obrig, T. G. (1995):

Specific Interaction of *Escherichia coli* O157/H7-Derived Shiga-Like Toxin-II with Human Renal Endothelial-Cells.

J Infect Dis. 172(5), 1397-401.

Low, J. C.; McKendrick, L. J.; McKechnie, C.; Fenlon, D.; Naylor, S. W.; Currie, C.; Smith, D. G. E.; Allison, L.; Galy, D. L. (2005):

Rectal carriage of enterohemorrhagic *Escherichia coli* 0157 in slaughtered cattle.

Appl Environ Microbiol. 71(1), 93-7.

Lu, Y.; Iyoda, S.; Satou, H.; Satou, H.; Itoh, K.; Saitoh, T.; Watanabe, H. (2006):

A new immunoglobulin-binding protein, EibG, is responsible for the chain-like adhesion phenotype of locus of enterocyte effacement-negative, shiga toxin-producing *Escherichia coli*.

Infect Immun. 74(10), 5747-55.

Lynn, T. V.; Hancock, D. D.; Besser, T. E.; Harrison, J. H.; Rice, D. H.; Stewart, N. T.; Rowan, L. L. (1998):

The occurrence and replication of *Escherichia coli* in cattle feeds.

J Dairy Sci. 81(4), 1102-8.

Lyte, M. (2004):

Microbial endocrinology and infectious disease in the 21st century.

Trends Microbiol. 12(1), 14-20.

Lyte, M.; Arulanandam, B. P.; Frank, C. D. (1996):

Production of Shiga-like toxins by *Escherichia coli* O157:H7 can be influenced by the neuroendocrine hormone norepinephrine.

J Lab Clin Med. 128(4), 392-8.

Lyte, M.; Bailey, M. T. (1997):

Neuroendocrine-bacterial interactions in a neurotoxin-induced model of trauma.

J Surg Res. 70(2), 195-201.

Magnuson, B. A.; Davis, M.; Hubele, S.; Austin, P. R.; Kudva, I. T.; Williams, C. J.; Hunt, C. W.; Hovde, C. J. (2000):

Ruminant gastrointestinal cell proliferation and clearance of *Escherichia coli* O157 : H7.

Infect Immun. 68(7), 3808-14.

Mahlkow-Nerge, K. (2003):

Was die Kühe dem Tierarzt »sagen«- Beurteilung von Fütterung und Haltung im Rinderstall. Nutztierpraxis aktuell, 5. abgerufen am 18.05.2009.

www.ava1.de/pdf/artikel/rinder/5_mahlkownerge.pdf

Mainil, J. (1999):

Shiga verocytotoxins and Shiga verotoxigenic *Escherichia coli* in animals.
Vet Res. 30(2-3), 235-57.

Mainil, J. G.; Duchesnes, C. J.; Whipp, S. C.; Marques, L. R.; O'Brien, A. D.; Casey, T. A.; Moon, H. W. (1987):

Shiga-like toxin production and attaching effacing activity of *Escherichia coli* associated with calf diarrhea.
Am J Vet Res. 48(5), 743-8.

Marches, O.; Covarelli, V.; Dahan, S.; Cougoule, C.; Bhatta, P.; Frankel, G.; Caron, E. (2008):

EspJ of enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* inhibits opsonophagocytosis.
Cell Microbiol. 10(5), 1104-15.

Matthews, L.; Low, J. C.; Gally, D. L.; Pearce, M. C.; Mellor, D. J.; Heesterbeek, J. A. P.; Chase-Topping, M.; Naylor, S. W.; Shaw, D. J.; Reid, S. W. J.; Gunn, G. J.; Woolhouse, M. E. J. (2006a):

Heterogeneous shedding of *Escherichia coli* O157 in cattle and its implications for control.
Proc Natl Acad Sci U S A. 103(3), 547-52.

Matthews, L.; McKendrick, I. J.; Ternent, H.; Gunn, G. J.; Syngde, B.; Woolhouse, M. E. J. (2006b):

Super-shedding cattle and the transmission dynamics of *Escherichia coli* O157.
Epidemiol Infect. 134(1), 131-42.

McKee, R.; Madden, R. H.; Gilmour, A. (2003):

Occurrence of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* in dairy and meat processing environments.
J Food Prot. 66(9), 1576-80.

McSweeney, C. S.; Gilbert, R. A.; Krause, D. O.; Padmanabha, J.; Denman, S. E. (2004):

Effect of diet on *E. coli* populations in the faeces of cattle.
Asia Pac J Clin Nutr. 13(S27).

Mechie, S. C.; Chapman, P. A.; Siddons, C. A. (1997):

A fifteen month study of *Escherichia coli* O157:H7 in a dairy herd.
Epidemiol Infect. 118(1), 17-25.

Mellmann, A.; Bielaszewska, M.; Karch, H. (2009):

Intrahost Genome Alterations in Enterohemorrhagic *Escherichia coli*.
Gastroenterology, 136(6), 1925-38.

Mellmann, A.; Lu, S.; Karch, H.; Xu, J. G.; Harmsen, D.; Schmidt, M. A.; Bielaszewska, M. (2008):

Recycling of Shiga toxin 2 genes in sorbitol-fermenting enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 : NM.

Appl. Environ. Microbiol. 74(1), 67-72.

Melton-Celsa, A. R.; Darnell, S. C.; O'Brien, A. D. (1996):

Activation of Shiga-like toxins by mouse and human intestinal mucus correlates with virulence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O91:H21 isolates in orally infected, streptomycin-treated mice.

Infect Immun. 64(5), 1569-76.

Melton-Celsa, A. R.; Kokai-Kun, J. F.; O'Brien, A. D. (2002):

Activation of Shiga toxin type 2d (Stx2d) by elastase involves cleavage of the C-terminal two amino acids of the A(2) peptide in the context of the appropriate B pentamer.

Mol Microbiol. 43(1), 207-15.

Melton-Celsa, A. R.; O'Brien, A. D. (1998):

Structure, Biology, and Relative Toxicity of Shiga Toxin Family Members for Cells and Animals.

In: *Escherichia coli* O157:H7 and Other Shiga Toxin- Producing *E. coli* Strains /Hrsg. J. B. Kaper and A. D. O'Brien. - Washington, D.C.: ASM Press. S. 121-8.

Menge, C.; Stamm, I.; Blessenohl, M.; Wieler, L. H.; Baljer, G. (2003):

Verotoxin 1 from *Escherichia coli* affects Gb(3)/CD77(+) bovine lymphocytes independent of interleukin-2, tumor necrosis factor-alpha, and interferon-alpha.

Exp Biol Med. 228(4), 377-86.

Messelhäußer, U. (2005):

Nachweis von Shiga Toxin-bildenden *Escherichia coli* und thermophilen *Campylobacter* species bei Almkühen und in auf Almen produzierten Lebensmitteln.

München, Ludwig-Maximilian-Universität, Dissertation.

MicroBioNet. (2008):

Serotypes of VTEC-The VTEC Table.

Scienenet Multimedia Publishing -Abgerufen am: 01.11.2008.

Moller-Nielsen, E. M.; Tegtmeyer, C.; Andersen, H. J.; Gronbaek, C.; Andersen, J. S. (2002):

Influence of age, sex and herd characteristics on the occurrence of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in Danish dairy farms.

Vet Microbiol. 88(3), 245-57.

Moon, H. W.; Whipp, S. C.; Argenzio, R. A.; Levine, M. M.; Giannella, R. A. (1983):

Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbit intestines.

Infect Immun. 41(3), 1340-51.

Moore, W. E.; Holdeman, L. V. (1974):

Human fecal flora: the normal flora of 20 Japanese-Hawaiians.
Appl Microbiol. 27(5), 961-79.

Moschcowitz, E. (2003):

An acute febrile pleiochromic anemia with hyaline thrombosis of the terminal arterioles and capillaries: An undescribed disease.
Mt Sinai J Med. 70(5), 353-5.

Mühldorfer, I.; Hacker, J.; Keusch, G. T.; Acheson, D. W.; Tschape, H.; Kane, A. V.; Ritter, A.; Olschlager, T.; DonohueRoife, A. (1996):

Regulation of the Shiga-like toxin II operon in *Escherichia coli*.
Infect Immun. 64(2), 495-502.

Mukherjee, A.; Cho, S.; Scheftel, J.; Jawahir, S.; Smith, K.; Diez-Gonzalez, F. (2006):

Soil survival of *Escherichia coli* O157 : H7 acquired by a child from garden soil recently fertilized with cattle manure.
J Appl Microbiol. 101(2), 429-36.

Murinda, S. E.; Nguyen, L. T.; Ivey, S. J.; Gillespie, B. E.; Almeida, R. A.; Draughon, F. A.; Oliver, S. P. (2002):

Prevalence and molecular characterization of *Escherichia coli* O157:H7 in bulk tank milk and fecal samples from cull cows: a 12-month survey of dairy farms in east Tennessee.
J Food Prot. 65(5), 752-9.

Murinda, S. E.; Nguyen, L. T.; Landers, T. L.; Draughon, F. A.; Mathew, A. G.; Hogan, J. S.; Smith, K. L.; Hancock, D. D.; Oliver, S. P. (2004):

Comparison of *Escherichia coli* Isolates from humans, food, and farm and companion animals for presence of Shiga toxin-producing *E. coli* virulence markers.
Foodborne Pathog Dis. 1(3), 178-84.

N.N. (1999):

Escherichia coli: Ursprung war Ziegenmilch.
Food & Hygiene, 3, 6.

Nagy, B.; Fekete, P. Z. (1999):

Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in farm animals.
Vet Res. 30(2-3), 259-84.

Nart, P.; Naylor, S. W.; Huntley, J. F.; McKendrick, I. J.; Gally, D. L.; Low, J. C. (2008):

Responses of cattle to gastrointestinal colonization by *Escherichia coli* O157:H7.
Infect Immun. 76(11), 5366-72.

Nataro, J. P.; Kaper, J. B. (1998):

Diarrheagenic *Escherichia coli*.
Clin Microbiol Rev. 11(1), 142-201.

Nataro, J. P.; Kaper, J. B.; Robinsbrowne, R.; Prado, V.; Vial, P.; Levine, M. M. (1987):

Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to Hep-2 cells.
Pediatr Infect Dis J. 6(9), 829-31.

Nataro, J. P.; Scaletsky, I. C.; Kaper, J. B.; Levine, M. M.; Trabulsi, L. R. (1985):

Plasmid-mediated factors conferring diffuse and localized adherence of enteropathogenic *Escherichia coli*.
Infect Immun. 48(2), 378-83.

Naylor, S. W.; Gally, D. L.; Low, J. C. (2005a):

Enterohaemorrhagic *E. coli* in veterinary medicine.
Int J Med Microbiol. 295(6-7), 419-41.

Naylor, S. W.; Low, J. C.; Besser, T. E.; Mahajan, A.; Gunn, G. J.; Pearce, M. C.; McKendrick, I. J.; Smith, D. G. E.; Gally, D. L. (2003):

Lymphoid follicle-dense mucosa at the terminal rectum is the principal site of colonization of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 : H7 in the bovine host.
Infect Immun. 71(3), 1505-12.

Naylor, S. W.; Nart, P.; Sales, J.; Flockhart, A.; Gally, D. L.; Low, J. C. (2007):

Impact of the direct application of therapeutic agents to the terminal recta of experimentally colonized calves on *Escherichia coli* O157:H7 shedding.
Appl Environ Microbiol. 73(5), 1493-500.

Naylor, S. W.; Roe, A. J.; Nart, P.; Spears, K.; Smith, D. G. E.; Low, J. C.; Gally, D. L. (2005b):

Escherichia coli O157 : H7 forms attaching and effacing lesions at the terminal rectum of cattle and colonization requires the LEE4 operon.
Microbiology, 151, 2773-81.

Nelson, R. J.; Drazen, D. L. (2000):

Melatonin mediates seasonal changes in immune function.
Neuroimmunomodulation, 917, 404-15.

Nielsen, E. M.; Scheutz, F.; Torpdahl, M. (2006):

Continuous surveillance of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections by pulsed-field gel electrophoresis shows that most infections are sporadic.
Foodborne Pathog Dis. 3(1), 81-7.

O'Brien, A. D.; LaVeck, G. D. (1983):

Purification and characterization of a *Shigella dysenteriae* 1-like toxin produced by *Escherichia coli*.

Infect Immun. 40(2), 675-83.

O'Brien, A. D.; LaVeck, G. D.; Thompson, M. R.; Formal, S. B. (1982):

Production of *Shigella dysenteriae* type 1-like cytotoxin by *Escherichia coli*.

J Infect Dis. 146(6), 763-9.

O'Loughlin, E. V.; Robins-Browne, R. M. (2001):

Effect of Shiga toxin and Shiga-like toxins on eukaryotic cells.

Microbes Infect. 3(6), 493-507.

Obrig, T. G.; Louise, C. B.; Lingwood, C. A.; Boyd, B.; Barley-Maloney, L.; Daniel, T. O. (1993):

Endothelial heterogeneity in Shiga toxin receptors and responses.

J Biol Chem. 268(21), 15484-8.

Ogden, I. D.; Hepburn, N. F.; MacRae, M.; Strachan, N. J.; Fenlon, D. R.; Rusbridge, S. M.; Pennington, T. H. (2002):

Long-term survival of *Escherichia coli* O157 on pasture following an outbreak associated with sheep at a scout camp.

Lett Appl Microbiol. 34(2), 100-4.

Ogden, I. D.; MacRae, M.; Strachan, N. J. C. (2004):

Is the prevalence and shedding concentrations of *E. coli* O157 in beef cattle in Scotland seasonal?

FEMS Microbiol Lett. 233(2), 297-300.

Oliveira, M. G.; Brito, J. R. F.; Carvalho, R. R.; Guth, B. E. C.; Gomes, T. A. T.; Vieira, M. A. M.; Kato, M.; Ramos, II; Vaz, T. M. I.; Irino, K. (2007):

Water buffaloes (*Bubalus bubalis*) identified as an important reservoir of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Brazil.

Appl Environ Microbiol. 73(18), 5945-8.

Orden, J. A.; Cid, D.; Ruiz-Santa-Quiteria, J. A.; Garcia, S.; Martinez, S.; de la Fuente, R. (2002):

Verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC), enteropathogenic *E. coli* (EPEC) and necrotoxicogenic *E. coli* (NTEC) isolated from healthy cattle in Spain.

J Appl Microbiol. 93(1), 29-35.

Orden, J. A.; Ruiz-Santa-Quiteria, J. A.; Blanco, M.; Blanco, J. E.; Mora, A.; Cid, D.; Gonzalez, E. A.; Blanco, J.; de la Fuente, R. (2003):

Prevalence and characterization of Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* isolated from diarrhoeic and healthy sheep and goats.

Epidemiol Infect. 130(2), 313-21.

Orden, J. A.; Ruiz-Santa-Quiteria, J. A.; Cid, D.; Garcia, S.; Sanz, R.; de la Fuente, R. (1998):

Verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) and eae-positive non-VTEC in 1-30-days-old diarrhoeic dairy calves.

Vet Microbiol. 63(2-4), 239-48.

Ørskov, F.; Ørskov, I. (1984):

Serotyping of *Escherichia coli*.

J Microbiol Methods. 14, 43-112.

Orth, D.; Grif, K.; Dierich, M. P.; Wurzner, R. (2006):

Sorbitol-fermenting Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157: indications for an animal reservoir.

Epidemiol Infect. 134(4), 719-23.

Orth, D.; Grif, K.; Khan, A. B.; Naim, A.; Dierich, M. P.; Würzner, R. (2007):

The Shiga toxin genotype rather than the amount of Shiga toxin or the cytotoxicity of Shiga toxin in vitro correlates with the appearance of the hemolytic uremic syndrome.

Diagn Microbiol Infect Dis. 59(3), 235-42.

Ostroff, S. M.; Tarr, P. I.; Neill, M. A.; Lewis, J. H.; Hargrett-Bean, N.; Kobayashi, J. M. (1989):

Toxin genotypes and plasmid profiles as determinants of systemic sequelae in *Escherichia coli* O157:H7 infections.

J Infect Dis. 160(6), 994-8.

Pai, C. H.; Ahmed, N.; Lior, H.; Johnson, W. M.; Sims, H. V.; Woods, D. E. (1988):

Epidemiology of sporadic diarrhea due to Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* - a 2-year prospective study.

J Infect Dis. 157(5), 1054-7.

Paton, A. W.; Paton, J. C.; Goldwater, P. N.; Heuzenroeder, M. W.; Manning, P. A. (1993):

Sequence of a variant Shiga-Like Toxin type-I operon of *Escherichia coli* O111:H-.

Gene, 129(1), 87-92.

Paton, A. W.; Beutin, L.; Paton, J. C. (1995):

Heterogeneity of the amino-acid-sequences of *Escherichia coli* Shiga-Like Toxin type-I operons.

Gene, 153(1), 71-4.

Paton, A. W.; Ratcliff, R. M.; Doyle, R. M.; Seymour-Murray, J.; Davos, D.; Lanser, J. A.; Paton, J. C. (1996):

Molecular microbiological investigation of an outbreak of hemolytic-uremic syndrome caused by dry fermented sausage contaminated with Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli*.

J Clin Microbiol. 34(7), 1622-7.

Paton, A. W.; Voss, E.; Manning, P. A.; Paton, J. C. (1997):

Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from cases of human disease show enhanced adherence to intestinal epithelial (Henle 407) cells.

Infect Immun. 65(9), 3799-805.

Paton, J. C.; Paton, A. W. (1998):

Pathogenesis and diagnosis of shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections.

Clin Microbiol Rev. 11(3), 450-79.

Paton, A. W.; Srimanote, P.; Woodrow, M. C.; Paton, J. C. (2001):

Characterization of Saa, a novel autoagglutinating adhesin produced by locus of enterocyte effacement-negative shiga-toxigenic *Escherichia coli* strains that are virulent for humans.

Infect Immun. 69(11), 6999-7009.

Pavia, A. T.; Nichols, C. R.; Green, D. P.; Tauxe, R. V.; Mottice, S.; Greene, K. D.; Wells, J. G.; Siegler, R. L.; Brewer, E. D.; Hannon, D.; et al. (1990):

Hemolytic-uremic syndrome during an outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections in institutions for mentally retarded persons: clinical and epidemiologic observations.

J Pediatr. 116(4), 544-51.

Pearson, G. R.; Watson, C. A.; Hall, G. A.; Wray, C. (1989):

Natural infection with an attaching and effacing *Escherichia coli* in the small and large intestines of a calf with diarrhea.

Vet Rec. 124(12), 297-9.

Pearson, G. R.; Bazeley, K. J.; Jones, J. R.; Gunning, R. F.; Green, M. J.; Cookson, A.; Woodward, M. J. (1999):

Attaching and effacing lesions in the large intestine of an eight-month-old heifer associated with *Escherichia coli* O26 infection in a group of animals with dysentery.

Vet Rec. 145(13), 370-3.

Petric, M.; Karmali, M. A.; Arbus, G. S.; Roscoe, M.; Louie, S.; Cheung, R. (1987):

Effects of cycloheximide and puromycin on cytotoxic activity of *Escherichia coli* Verocytotoxin (Shiga-Like Toxin).

J Clin Microbiol. 25(7), 1265-8.

Pohl, P.; Daube, G.; Lintermans, P.; Kaeckenbeeck, A.; Mainil, J. (1991):

Description of 70 bovine verotoxigenic *E. coli* strains.

Ann Med Vet. 135(4), 267-74.

Pohl, P.; Cleenwerck, I.; Imberechts, H.; Jacquemin, E.; Marin, M.; China, B.; Mainil, J. (1997):

Differences between pathotypes and sero-groups of verotoxin producing *Escherichia coli* strains (VTEC) isolated from diarrhoeic or healthy calves.

Ann Med Vet. 141(2), 155-9

Poitrineau, P.; Forestier, C.; Meyer, M.; Jallat, C.; Rich, C.; Malpuech, G.; De Champs, C. (1995):

Retrospective case-control study of diffusely adhering *Escherichia coli* and clinical features in children with diarrhea.

J Clin Microbiol. 33(7), 1961-2.

Potter, A. A.; Klashinsky, S.; Li, Y.; Frey, E.; Townsend, H.; Rogan, D.; Erickson, G.; Hinkley, S.; Klopfenstein, T.; Moxley, R. A.; Smith, D. R.; Finlay, B. B. (2004):

Decreased shedding of *Escherichia coli* O157:H7 by cattle following vaccination with type III secreted proteins.

Vaccine, 22(3-4), 362-9.

Pradel, N.; V., L.; DeChamps, C.; Reynaud, J.-B.; Scheutz, F.; Sirot, J.; Joly, B.; C., F. (2000):

Prevalence and Characterization of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolated from Cattle, Food, and Children during a One-Year Prospective Study in France.

J Clin Microbiol. 38 (3), 1023-31.

Prager, R.; Reissbrodt, R.; Holler, H.; Gericke, B.; Aleksic, S.; Claus, H.; Wagner, H.; Tschäpe, H. (1998):

Isolierung und Charakterisierung von Shigatoxin-produzierenden *E. coli*-Stämmen aus Stuhlproben: Ergebnisse einer Sentinel-Studie.

Bundesgesundheitsblatt, 41, 6-13.

Prager, R.; Strutz, U.; Fruth, A.; Tschape, H. (2003):

Subtyping of pathogenic *Escherichia coli* strains using flagellar (H)-antigens: serotyping versus fliC polymorphisms.

Int J Med Microbiol. 292(7-8), 477-86.

Rahn, K.; Renwick, S. A.; Johnson, R. P.; Wilson, J. B.; Clarke, R. C.; Alves, D.; McEwen, S.; Lior, H.; Spika, J. (1997):

Persistence of *Escherichia coli* O157:H7 in dairy cattle and the dairy farm environment.

Epidemiol Infect. 119(2), 251-9.

Reading, N. C.; Sperandio, V. (2006):

Quorum sensing: the many languages of bacteria.

FEMS Microbiol Lett. 254(1), 1-11.

Reading, N. C.; Torres, A. G.; Kendall, M. M.; Hughes, D. T.; Yamamoto, K.; Sperandio, V. (2007):

A novel two-component signaling system that activates transcription of an enterohemorrhagic *Escherichia coli* effector involved in remodeling of host actin.

J Bacteriol. 189(6), 2468-76.

Reading, N. C.; Rasko, D. A.; Torres, A. G.; Sperandio, V. (2009):

The two-component system QseEF and the membrane protein QseG link adrenergic and stress sensing to bacterial pathogenesis.

Proc Natl Acad Sci U S A. 106(14), 5889-94.

Redford, P.; Welch, R. A. (2002):

Extraintestinal *Escherichia coli* as a Model System for the Study of Pathogenicity Islands.

In: Pathogenicity Islands and the Evolution of Pathogenic Microbes. / Hrsg. J. B. Kaper, J. Hacker, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, Vol 1. S. 15-30.

Reida, P.; Wolff, M.; Pohls, H. W.; Kuhlmann, W.; Lehmacher, A.; Aleksic, S.; Karch, H.; Bockemuhl, J. (1994):

An outbreak due to enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in a children day care centre characterized by person-to-person transmission and environmental contamination.

Zentralbl Bakteriol. 281(4), 534-43.

Renter, D. G.; Sargeant, J. M.; Oberst, R. D.; Samadpour, M. (2003):

Diversity, frequency, and persistence of *Escherichia coli* O157 strains from range cattle environments.

Appl Environ Microbiol. 69(1), 542-7.

Reymond, D.; Karmali, M. A.; Clarke, I.; Winkler, M.; Petric, M. (1997):

Comparison of the Western blot assay with the neutralizing-antibody and enzyme-linked immunosorbent assays for measuring antibody to Verocytotoxin 1.

J Clin Microbiol. 35(3), 609-13.

Ribeiro, M. G.; Costa, E. O.; Leite, D. S.; Langoni, H.; Garino, F.; Victoria, C.; Listoni, F. J. P. (2006):

Virulence factors in *Escherichia coli* strains isolated from bovine mastitis.

Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia, 58(5), 724-31.

Rice, D. H.; Ebel, E. D.; Hancock, D. D.; Besser, T. E.; Herriott, D. E.; Carpenter, L. V. (1997):

Escherichia coli O157 in cull dairy cows on farm and at slaughter.

J Food Prot. 60(11), 1386-7.

Rice, D. H.; Sheng, H. Q. Q.; Wynia, S. A.; Hovde, C. J. (2003):

Rectoanal mucosal swab culture is more sensitive than fecal culture and distinguishes *Escherichia coli* O157 : H7-colonized cattle and those transiently shedding the same organism.

J Clin Microbiol. 41(11), 4924-9.

Richter, H.; Klie, H.; Timm, M.; Gallien, P.; Steinruck, H.; Perlberg, K. W.; Protz, D. (1997):

Verotoxin-producing *E. coli* (VTEC) in faeces from cattle slaughtered in Germany.

Berl Münch Tierärztl Wochenschr. 110(4), 121-7.

Riley, D. G.; Gray, J. T.; Loneragan, G. H.; Barling, K. S.; Chase, C. C., Jr. (2003):

Escherichia coli O157:H7 prevalence in fecal samples of cattle from a southeastern beef cow-calf herd.

J Food Prot. 66(10), 1778-82.

Riley, L. W.; Remis, R. S.; Helgerson, S. D.; McGee, H. B.; Wells, J. G.; Davis, B. R.; Hebert, R. J.; Olcott, E. S.; Johnson, L. M.; Hargrett, N. T.; Blake, P. A.; Cohen, M. L. (1983):

Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype.

N Engl J Med. 308(12), 681-5.

Rivas, M.; Miliwebsky, E.; Chinen, I.; Roldan, C. D.; Balbi, L.; Garcia, B.; Fiorilli, G.; Sosa-Estani, S.; Kincaid, J.; Rangel, J.; Griffin, P. M. (2006):

Characterization and epidemiologic subtyping of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from hemolytic uremic syndrome and diarrhea cases in Argentina.

Foodborne Pathog Dis. 3(1), 88-96.

Robert Koch-Institut (1996a):

E.-coli-Pathovare beim Menschen.

Epidemiologisches Bulletin, 30/96.

Robert Koch-Institut (1996b):

Häufung von EHEC-Erkrankungen in Bayern.

Epidemiologisches Bulletin, 20/96, 137-8.

Robert Koch-Institut (1997a):

Zum Aufbau einer Surveillance für enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC) in Deutschland.

Epidemiologisches Bulletin, 39/97, 269-73.

Robert Koch-Institut (1997b):

Zum Auftreten von EHEC-Infektionen in Niedersachsen.

Epidemiologisches Bulletin, 46/97, 319-22.

Robert Koch-Institut (1999a):

Fallbericht: EHEC-Infektion im Ausland erworben.

Epidemiologisches Bulletin, 16/99, 114.

Robert Koch-Institut (1999b):

Fallbericht: Inkomplettes HUS bei EHEC-Enteritis, übertragen durch Minipferde.

Epidemiologisches Bulletin, 31/99, 276.

Robert Koch-Institut (1999c):

Ratgeber Infektionskrankheiten 6. Folge: Infektionen durch Enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC).

Epidemiologisches Bulletin, 31/99, 227-30.

Robert Koch-Institut (2001):

Überregionaler Ausbruch durch EHEC des EC-Serovars O26.
Epidemiologisches Bulletin, 7/01, 47-9.

Robert Koch-Institut (2002a):

Häufung Sorbitol-fermentierender *E. coli* O157:H- in mehreren Bundesländern.
Epidemiologisches Bulletin, 15/02, 123.

Robert Koch-Institut. (2002b):

Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2001.

Robert Koch-Institut (2003a):

Ein HUS-Ausbruch durch Sorbitol-fermentierende EHEC des Serovars O157:H-: Untersuchungsergebnisse und Lehren für die Surveillance.
Epidemiologisches Bulletin, 22/03, 171-8.

Robert Koch-Institut. (2003b):

Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2002.

Robert Koch-Institut. (2004a):

Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2003.

Robert Koch-Institut (2004b):

Risikofaktoren für sporadische STEC(EHEC)-Erkrankungen- Ergebnisse einer bundesweiten Fall-Kontroll-Studie.
Epidemiologisches Bulletin, 50/04, 433-9.

Robert Koch-Institut (2004c):

Standardarbeitsanweisung: Serotypisierung von *Escherichia coli*-Isolaten.
Nationales Referenzzentrum für Salmonella und andere bakterielle Enteritiserreger, Wernigerode.

Robert Koch-Institut. (2005a):

Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2004.

Robert Koch-Institut (2005b):

Risikofaktoren für sporadische STEC-Erkrankungen: Empfehlungen für die Prävention.
Epidemiologisches Bulletin, 01/05, 1-3.

Robert Koch-Institut (2006a):

Aktuelle Statistik meldepflichtiger Infektionskrankheiten.
Epidemiologisches Bulletin, 29/06, 232-4.

Robert Koch-Institut (2006b):

Hämolytisch-urämisches Syndrom (HUS) – Hinweis auf eine Häufung in Norddeutschland.
Epidemiologisches Bulletin, 24/06, 190.

Robert Koch-Institut. (2006c):

Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2005.

Robert Koch-Institut. (2007):

Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2006.

Robert Koch-Institut (2008a):

Erkrankungen durch Enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC).

RKI-Ratgeber Infektionskrankheiten – Merkblätter für Ärzte. abgerufen am 11.01.2008

http://www.rki.de/cln_100/nn_196878/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber__Mbl__EHEC.html.

Robert Koch-Institut. (2008b):

Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2007.

Robert Koch-Institut (2009):

Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2008.

Robert Koch-Institut; Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (2001):

EHEC-Infektionen - Erkennung, Verhütung und Bekämpfung.

Bundesgesundheitsblatt, 44, 1146-8.

Robins-Browne, R. M.; Still, C. S.; Miliotis, M. D.; Richardson, N. J.; Koornhof, H. J.; Freiman, I.; Schoub, B. D.; Lecatsas, G.; Hartman, E. (1980):

Summer Diarrhea in African Infants and Children.

Arch Dis Child. 55(12), 923-8.

Robinson, C. M.; Sinclair, J. F.; Smith, M. J.; O'Brien, A. D. (2006):

Shiga toxin of enterohemorrhagic *Escherichia coli* type O157 : H7 promotes intestinal colonization.

Proc Natl Acad Sci U S A. 103(25), 9667-72.

Robinson, S. E.; Wright, E. J.; Hart, C. A.; Bennett, M.; French, N. P. (2004):

Intermittent and persistent shedding of *Escherichia coli* O157 in cohorts of naturally infected calves.

J Appl Microbiol. 97(5), 1045-53.

Rodríguez, D. C.; Mast, E. E.; Greene, K. D.; Davis, J. P.; Hutchinson, M. A.; Wells, J. G.; Barrett, T. J.; Griffin, P. M. (1995):

A university outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with roast beef and an unusually benign clinical course.

J Infect Dis. 172(4), 1122-5.

Rogerie, F.; Marecat, A.; Gambade, S.; Dupond, F.; Beaubois, P.; Lange, M. (2001):

Characterization of Shiga toxin producing *E. coli* and O157 serotype *E. coli* isolated in France from healthy domestic cattle.

Int J Food Microbiol. 63(3), 217-23.

Rolle, M.; Mayr, A. (2007):

Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. 8. Auflage. Enke-Verlag.

Rossen, L.; Norskov, P.; Holmstrom, K.; Rasmussen, O. F. (1992):

Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions.

Int J Food Microbiol. 17(1), 37-45.

Rugbjerg, H.; Nielsen, E. M.; Andersen, J. S. (2003):

Risk factors associated with faecal shedding of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in eight known-infected Danish dairy herds.

Prev Vet Med. 58(3-4), 101-13.

Ruggenti, P.; Aros, C.; Remuzzi, G. (2001):

Thrombotic microangiopathies in the intensive care unit: many questions, some answers.

Contrib Nephrol. (132), 53-67.

Russmann, H.; Kothe, E.; Schmidt, H.; Franke, S.; Harmsen, D.; Caprioli, A.; Karch, H. (1995):

Genotyping of Shiga-like toxin genes in non-O157 *Escherichia coli* strains associated with haemolytic uraemic syndrome.

J Med Microbiol. 42(6), 404-10.

Russo, T. A.; Johnson, J. R. (2003):

Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: focus on an increasingly important endemic problem.

Microbes Infect. 5(5), 449-56.

Ryan, C. A.; Tauxe, R. V.; Hisek, G. W.; Wells, J. G.; Stoesz, P. A.; McFadden, H. W., Jr.; Smith, P. W.; Wright, G. F.; Blake, P. A. (1986):

Escherichia coli O157:H7 diarrhea in a nursing home: clinical, epidemiological, and pathological findings.

J Infect Dis. 154(4), 631-8.

Sanchez, S.; Garcia-Sanchez, A.; Martinez, R.; Blanco, J.; Blanco, J. E.; Blanco, M.; Dahbi, G.; Mora, A.; Hermoso de Mendoza, J.; Alonso, J. M.; Rey, J. (2008):

Detection and characterisation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* other than *Escherichia coli* O157:H7 in wild ruminants.

Br Vet J. 180, 384-8

Sanderson, M. W.; Besser, T. E.; Gay, J. M.; Gay, C. C.; Hancock, D. D. (1999):

Fecal *Escherichia coli* O157 : H7 shedding patterns of orally inoculated calves.

Vet Microbiol. 69(3), 199-205.

Sandhu, K. S.; Clarke, R. C.; Gyles, C. L. (1997):

Hemolysin phenotypes and genotypes of *eaeA*-positive and *eaeA*-negative bovine verotoxigenic *Escherichia coli*.

Mechanisms in the Pathogenesis of Enteric Diseases, 412, 295-302.

Sanz, M. E.; Vinas, M. R.; Parma, A. E. (1998):

Prevalence of bovine verotoxin-producing *Escherichia coli* in Argentina.

Eur J Epidemiol. 14(4), 399-403.

Sargeant, J. M.; Gillespie, J. R.; Oberst, R. D.; Phebus, R. K.; Hyatt, D. R.; Bohra, L. K.; Galland, J. C. (2000):

Results of a longitudinal study of the prevalence of *Escherichia coli* O157 : H7 on cow-calf farms.

Am J Vet Res. 61(11), 1375-9.

Schimmer, B.; Nygard, K.; Eriksen, H. M.; Lassen, J.; Lindstedt, B. A.; Brandal, L. T.; Kapperud, G.; Aavitsland, P. (2008):

Outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Norway caused by *stx2*-positive *Escherichia coli* O103:H25 traced to cured mutton sausages.

BMC Infect Dis. 8, 41.

Schlesser, J. E.; Gerdes, R.; Ravishankar, S.; Madsen, K.; Mowbray, J.; Teo, A. Y. (2006):

Survival of a five-strain cocktail of *Escherichia coli* O157:H7 during the 60-day aging period of cheddar cheese made from unpasteurized milk.

J Food Prot. 69(5), 990-8.

Schmidt, H.; Karch, H.; Beutin, L. (1994a):

The large-sized plasmids of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 strains encode hemolysins which are presumably members of the *Escherichia coli* alpha-hemolysin family.

FEMS Microbiol Lett. 117(2), 189-96.

Schmidt, H.; Plaschke, B.; Franke, S.; Russmann, H.; Schwarzkopf, A.; Heesemann, J.; Karch, H. (1994b):

Differentiation in virulence patterns of *Escherichia coli* possessing *eae* genes.

Med Microbiol Immunol. 183(1), 23-31.

Schmidt, H.; Beutin, L.; Karch, H. (1995):

Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933.

Infect Immun. 63(3), 1055-61.

Schmidt, H.; Karch, H. (1996):

Enterohemolytic phenotypes and genotypes of shiga toxin-producing *Escherichia coli* O111 strains from patients with diarrhea and hemolytic-uremic syndrome.

J Clin Microbiol. 34(10), 2364-7.

Schmidt, H.; Kernbach, C.; Karch, H. (1996a):

Analysis of the EHEC hly operon and its location in the physical map of the large plasmid of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:h7.

Microbiology, 142 (Pt 4), 907-14.

Schmidt, H.; Maier, E.; Karch, H.; Benz, R. (1996b):

Pore-forming properties of the plasmid-encoded hemolysin of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7.

Eur J Biochem. 241(2), 594-601.

Schmidt, H.; Scheef, J.; Morabito, S.; Caprioli, A.; Wieler, L. H.; Karch, H. (2000):

A new Shiga toxin 2 variant (Stx2f) from *Escherichia coli* isolated from pigeons.

Appl Environ Microbiol. 66(3), 1205-8.

Schoonderwoerd, M.; Clarke, R. C.; van Dreumel, A. A.; Rawluk, S. A. (1988):

Colitis in calves: natural and experimental infection with a verotoxin-producing strain of *Escherichia coli* O111:NM.

Can J Vet Res. 52(4), 484-7.

Schouten, J. M.; Bouwknecht, M.; van de Giessen, A. W.; Frankena, K.; De Jong, M. C. M.; Graat, E. A. M. (2004):

Prevalence estimation and risk factors for *Escherichia coli* O157 on Dutch dairy farms.

Prev Vet Med. 64(1), 49-61.

Schouten, J. M.; Graat, E. A. M.; Frankena, K.; Giessen, A. W. V. D.; Zwaluw, W. K. V. D.; Jong, M. C. M. D. (2005):

A longitudinal study of *Escherichia coli* O157 in cattle of a Dutch dairy farm and in the farm environment.

Vet Microbiol. 107, 193-204.

Schranner, S.; Hörmansdorfer, S.; Boger, K.-H.; Busch, U.; Sing, A. (2007):

Fallbericht: Eine Hauskatze als Ausscheider von EHEC.

EHEC-Workshop 2007, Wildbad Kreuth: 9.-11.05.2007

Schultz, C. L.; Edrington, T. S.; Schroeder, S. B.; Hallford, D. M.; Genovese, K. J.; Callaway, T. R.; Anderson, R. C.; Nisbet, D. J. (2005):

Effect of the thyroid on faecal shedding of *E. coli* O157 : H7 and *Escherichia coli* in naturally infected yearling beef cattle.

J Appl Microbiol. 99(5), 1176-80.

Schurman, R. D.; Hariharan, H.; Heaney, S. B.; Rahn, K. (2000):

Prevalence and characteristics of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef cattle slaughtered on Prince Edward Island.

J Food Prot. 63(11), 1583-6.

Scotland, S. M.; Smith, H. R.; Rowe, B. (1985):

Two distinct toxins active on Vero cells from *Escherichia coli* O157.

Lancet, 2(8460), 885-6.

Scotland, S. M.; Willshaw, G. A.; Smith, H. R.; Rowe, B. (1987):

Properties of strains of *Escherichia coli* belonging to serogroup O157 with special reference to production of Vero cytotoxins VT1 and VT2.

Epidemiol Infect. 99(3), 613-24.

Sekse, C.; Solheim, H.; Urdahl, A. M.; Wasteson, Y. (2008):

Is lack of susceptible recipients in the intestinal environment the limiting factor for transduction of Shiga toxin-encoding phages?

J Appl Microbiol. 105(4), 1114-20.

Shepherd, M. W.; Liang, P. F.; Jiang, X. P.; Doyle, M. P.; Erickson, M. C. (2007):

Fate of *Escherichia coli* O157 : H7 during on-farm dairy manure-based composting.

J Food Prot. 70(12), 2708-16.

Silvestro, L.; Caputo, M.; Blancato, S.; Decastelli, L.; Fioravanti, A.; Tozzoli, R.; Morabito, S.; Caprioli, A. (2004):

Asymptomatic carriage of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in farm workers in Northern Italy.

Epidemiol Infect. 132(5), 915-9.

Sjogren, R.; Neill, R.; Rachmilewitz, D.; Fritz, D.; Newland, J.; Sharpnack, D.; Colleton, C.; Fondacaro, J.; Gemski, P.; Boedeker, E. (1994):

Role of Shiga-Like Toxin-I in bacterial enteritis - comparison between isogenic *Escherichia coli* strains induced in rabbits.

Gastroenterology, 106(2), 306-17.

Smith, D.; Blackford, M.; Younts, S.; Moxley, R.; Gray, J.; Hungerford, L.; Milton, T.; Klopfenstein, T. (2001):

Ecological relationships between the prevalence of cattle shedding *Escherichia coli* O157:H7 and characteristics of the cattle or conditions of the feedlot pen.

J Food Prot. 64(12), 1899-903.

Smith, H. W.; Green, P.; Parsell, Z. (1983):

Verotoxins in *Escherichia coli* and related bacteria: transfer by phage and conjugation and toxic action in laboratory animals, chickens and pigs.

J Gen Microbiol. 129(10), 3121-37.

Smith, R. P.; Paiba, G. A.; Ellis-Iversen, J. (2008):

Short communication: Turbidity as an indicator of *Escherichia coli* presence in water troughs on cattle farms.

J Dairy Sci. 91(5), 2082-5.

Soderstrom, A.; Lindberg, A.; Andersson, Y. (2005):

EHEC O157 outbreak in Sweden from locally produced lettuce, August-September 2005.

Euro Surveill. 10(38), pii=2794.

Spears, K. J.; Roe, A. J.; Gally, D. L. (2006):

A comparison of enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* pathogenesis.

FEMS Microbiol Lett. 255(2), 187-202.

Spika, J. S.; Parsons, J. E.; Nordenberg, D.; Wells, J. G.; Gunn, R. A.; Blake, P. A. (1986):

Hemolytic uremic syndrome and diarrhea associated with *Escherichia coli* O157:H7 in a day care center.

J Pediatr. 109(2), 287-91.

Stanford, K.; Bach, S. J.; Marx, T. H.; Jones, S.; Hansen, J. R.; Wallins, G. L.; Zahiroddini, H.; McAllister, T. A. (2005a):

Monitoring *Escherichia coli* O157:H7 in inoculated and naturally colonized feedlot cattle and their environment.

J Food Prot. 68(1), 26-33.

Stanford, K.; Croy, D.; Bach, S. J.; Wallins, G. L.; Zahiroddini, H.; McAllister, T. A. (2005b):

Ecology of *Escherichia coli* O157 : H7 in commercial dairies in southern Alberta.

J Dairy Sci. 88(12), 4441-51.

Stephan, R.; Kuhn, K. (1999):

Prevalence of verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) in bovine coliform mastitis and their antibiotic resistance patterns.

Zentralbl Veterinärmed B. 46(6), 423-7.

Stephan, R.; Ragetti, S.; Untermann, F. (2000):

Prevalence and characteristics of verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) in stool samples from asymptomatic human carriers working in the meat processing industry in Switzerland.

J Appl Microbiol. 88(2), 335-41.

Stevens, M. P.; van Diemen, P. M.; Frankel, G.; Phillips, A. D.; Wallis, T. S. (2002):

Efa1 influences colonization of the bovine intestine by shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotypes O5 and O111.

Infect Immun. 70(9), 5158-66.

Stiebing, A.; Vogt, N.; Baumgart, J.; Putzfeld, K. (2000a):

Surviving ability of EHEC in raw sausages - .1 Spreadable raw sausage.

Fleischwirtschaft, 80(3), 87-90.

Stiebing, A.; Vogt, N.; Baumgart, J.; Putzfeld, K.; Bergt, J. (2000b):

Surviving ability of EHEC in raw sausages - II. Sliceable raw sausage.

Fleischwirtschaft, 80(6), 107-10.

Stordeur, P.; China, B.; Charlier, G.; Roels, S.; Mainil, J. (2000):

Clinical signs, reproduction of attaching/effacing lesions, and enterocyte invasion after oral inoculation of an O118 enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in neonatal calves.

Microbes Infect. 2(1), 17-24.

Strockbine, N. A.; Marques, L. R. M.; Holmes, R. K.; O'Brien, A. D. (1985):

Characterization of monoclonal-antibodies against Shiga-Like Toxin from *Escherichia coli*.

Infect Immun. 50(3), 695-700.

Suriyasathaporn, W.; Daemen, A.; Noordhuizen-Stassen, E. N.; Dieleman, S. J.; Nielen, M.; Schukken, Y. H. (1999):

Beta-hydroxybutyrate levels in peripheral blood and ketone bodies supplemented in culture media affect the in vitro chemotaxis of bovine leukocytes.

Vet. Immunol. Immunopathol. 68(2-4), 177-86.

Suttorp, N.; Floer, B.; Schnittler, H.; Seeger, W.; Bhakdi, S. (1990):

Effects of *Escherichia coli* Hemolysin on Endothelial-Cell Function.

Infect Immun. 58(11), 3796-801.

Swerdlow, D. L.; Woodruff, B. A.; Brady, R. C.; Griffin, P. M.; Tippen, S.; Donnell, H. D., Jr.; Geldreich, E.; Payne, B. J.; Meyer, A., Jr.; Wells, J. G.; et al. (1992):

A waterborne outbreak in Missouri of *Escherichia coli* O157:H7 associated with bloody diarrhea and death.

Ann Intern Med. 117(10), 812-9.

Synge, B. A.; Hopkins, G. F.; Reilly, W. J.; Sharp, J. C. (1993):

Possible link between cattle and E coli O157 infection in a human.

Vet Rec. 133(20), 507.

Synge, B.; Paiba, G. (2000):

Verocytotoxin-producing E coli O157.

Vet Rec. 147(1), 27.

Synge, B. A. (2000):

Veterinary significance of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157.
World J Microbiol Biotechnol. 16(8-9), 725-32.

Synge, B. A.; Chase-Topping, M. E.; Hopkins, G. F.; McKendrick, I. J.; Thomson-Carter, F.; Gray, D.; Rusbridge, S. M.; Munro, F. I.; Foster, G.; Gunn, G. J. (2003):

Factors influencing the shedding of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 by beef suckler cows.
Epidemiol Infect. 130(2), 301-12.

Tesh, V. L.; Burris, J. A.; Owens, J. W.; Gordon, V. M.; Wadolowski, E. A.; O'Brien, A. D.; Samuel, J. E. (1993):

Comparison of the relative toxicities of Shiga-like toxins type I and type II for mice.
Infect Immun. 61(8), 3392-402.

Thomas, A.; Jiggle, B.; Smith, H. R.; Rowe, B. (1994):

The Detection of Vero Cytotoxin-Producing *Escherichia coli* and Shigella-Dysenteriae Type-1 in Fecal Specimens Using Polymerase Chain-Reaction Gene Amplification.
Lett Appl Microbiol. 19(6), 406-9.

Thran, B. H.; Hussein, H. S.; Hall, M. R.; Khaiboullina, S. F. (2001):

Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef heifers grazing an irrigated pasture.
J Food Prot. 64(10), 1613-6.

Tilden, J., Jr.; Young, W.; McNamara, A. M.; Custer, C.; Boesel, B.; Lambert-Fair, M. A.; Majkowski, J.; Vugia, D.; Werner, S. B.; Hollingsworth, J.; Morris, J. G., Jr. (1996):

A new route of transmission for *Escherichia coli*: infection from dry fermented salami.
Am J Public Health. 86(8), 1142-5.

Tkalcic, S.; Brown, C. A.; Harmon, B. G.; Jain, A. V.; Mueller, E. P. O.; Parks, A.; Jacobsen, K. L.; Martin, S. A.; Zhao, T.; Doyle, M. P. (2000):

Effects of diet on rumen proliferation and fecal shedding of *Escherichia coli* O157 : H7 in calves.
J Food Prot. 63(12), 1630-6.

Toma, C.; Espinosa, E. M.; Song, T. Y.; Miliwebsky, E.; Chinen, I.; Iyoda, S.; Iwanaga, M.; Rivas, M. (2004):

Distribution of putative adhesins in different seropathotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*.
J Clin Microbiol. 42(11), 4937-46.

Toma, C.; Nakasone, N.; Miliwebsky, E.; Higa, N.; Rivas, M.; Suzuki, T. (2008):

Differential adherence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* harboring saa to epithelial cells.
Int J Med Microbiol. 298(7-8), 571-8.

Tozzi, A. E.; Niccolini, A.; Caprioli, A.; Luzzi, I.; Montini, G.; Zacchello, G.; Gianviti, A.; Principato, F.; Rizzoni, G. (1994):

A community outbreak of haemolytic-uraemic syndrome in children occurring in a large area of northern Italy over a period of several months.

Epidemiol Infect. 113(2), 209-19.

Trabulsi, L. R.; Kaper, J. B. (1996):

Proceedings of the International Symposium on Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) - Sao Paulo, SP, Brazil - August, 28-30, 1995 - Preface.

Revista De Microbiologia, 27, U7-U.

Tuteneš, A. V.; Pierard, D.; Uradzinski, J.; Jozwik, E.; Pastuszcak, M.; Van Hende, J.; Uyttendaele, M.; Debevere, J.; Cheasty, T.; Van Hoof, J.; De Zutter, L. (2002):

Isolation and characterization of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157 : H7 from cattle in Belgium and Poland.

Epidemiol Infect. 129(1), 41-7.

Tzipori, S.; Montanaro, J.; Robinsbrowne, R. M.; Vial, P.; Gibson, R.; Levine, M. M. (1992):

Studies with Enteroaggregative *Escherichia coli* in the Gnotobiotic Piglet Gastroenteritis Model.

Infect Immun. 60(12), 5302-6.

Upton, P.; Coia, J. E. (1994):

Outbreak of *Escherichia coli* O157 infection associated with pasteurised milk supply.

Lancet, 344(8928), 1015.

Van Baale, M. J.; Sargeant, J. M.; Gnad, D. P.; DeBey, B. M.; Lechtenberg, K. F.; Nagaraja, T. G. (2004):

Effect of forage or grain diets with or without monensin on ruminal persistence and fecal *Escherichia coli* O157 : H7 in cattle.

Appl Environ Microbiol. 70(9), 5336-42.

Van Diemen, P. M.; Dziva, F.; Stevens, M. P.; Wallis, T. S. (2005):

Identification of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26:H- Genes Required for Intestinal Colonization in Calves.

Infect Immun. 73(3), 1735-43.

Van Donkersgoed, J.; Graham, T.; Gannon, V. (1999):

The prevalence of verotoxins, *Escherichia coli* O157 : H7, and Salmonella in the feces and rumen of cattle at processing.

Can Vet J. 40(5), 332-8.

Van Donkersgoed, J.; Berg, J.; Potter, A.; Hancock, D.; Besser, T.; Rice, D.; LeJeune, J.; Klashinsky, S. (2001):

Environmental sources and transmission of *Escherichia coli* O 157 in feedlot cattle.

Can Vet J. 42(9), 714-20.

Vermunt, J. J.; Greenough, P. R. (1997):

Management and Control of Claw Lameness: an Overview.

In: Lameness in cattle. / Hrsg. P. R. Greenough und A. D. Weaver. - Philadelphia, USA: Saunders. S. 308-15.

Vlisidou, I.; Lyte, M.; van Diemen, P. M.; Hawes, P.; Monaghan, P.; Wallis, T. S.; Stevens, M. P. (2004):

The neuroendocrine stress hormone norepinephrine augments *Escherichia coli* O157:H7-induced enteritis and adherence in a bovine ligated ileal loop model of infection.

Infect Immun. 72(9), 5446-51.

Vogt, R. L.; Dippold, L. (2005):

Escherichia coli O157:H7 outbreak associated with consumption of ground beef, June-July 2002.

Public Health Rep. 120(2), 174-8.

Wada, Y.; Nakazawa, M.; Kubo, M. (1994):

Natural infection with attaching and effacing *Escherichia coli* (O15) in an adult cow.

J Vet Med Sci. 56(1), 151-2.

Wadolkowski, E. A.; Sung, L. M.; Burris, J. A.; Samuel, J. E.; O'Brien, A. D. (1990):

Acute renal tubular necrosis and death of mice orally infected with *Escherichia coli* strains that produce Shiga-like toxin type II.

Infect Immun. 58(12), 3959-65.

Wang, G. D.; Zhao, T.; Doyle, M. P. (1996):

Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in bovine feces.

Appl Environ Microbiol. 62(7), 2567-70.

Weber, A.; Klie, H.; Richter, H.; Gallien, P.; Timm, M.; Perlberg, K. W. (1997):

Present problems in detection of sources of infection and chains of infection with enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC).

Berl Münch Tierärztl Wochenschr. 110(6), 211-3.

Weinstein, D. L.; Jackson, M. P.; Samuel, J. E.; Holmes, R. K.; Obrien, A. D. (1988):

Cloning and Sequencing of a Shiga-Like Toxin Type-II Variant from an *Escherichia coli* Strain Responsible for Edema Disease of Swine.

J Bacteriol. 170(9), 4223-30.

Wells, J. G.; Shipman, L. D.; Greene, K. D.; Sowers, E. G.; Green, J. H.; Cameron, D. N.; Downes, F. P.; Martin, M. L.; Griffin, P. M.; Ostroff, S. M.; Potter, M. E.; Tauxe, R. V.; Wachsmuth, I. K. (1991):

Isolation of *Escherichia coli* serotype O157-H7 and other Shiga-Like-Toxin-producing *Escherichia coli* from dairy cattle.

J Clin Microbiol. 29(5), 985-9.

Werber, D.; Fruth, A.; Buchholz, U.; Prager, R.; Kramer, M. H.; Ammon, A.; Tschape, H. (2003):

Strong association between shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 and virulence genes *stx(2)* and *eae* as possible explanation for predominance of serogroup O157 in patients with haemolytic uraemic syndrome.

Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 22(12), 726-30.

Wieler, L. H.; Bauerfeind, R.; Baljer, G. (1992):

Characterization of Shiga-Like Toxin producing *Escherichia coli* (Sttec) isolated from calves with and without diarrhea.

Zentralbl Bakteriologie. 276(2), 243-53.

Wieler, L. H.; Vieler, E.; Erpenstein, C.; Schlapp, T.; Steinruck, H.; Bauerfeind, R.; Byomi, A.; Baljer, G. (1996):

Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from bovines: association of adhesion with carriage of *eae* and other genes.

J Clin Microbiol. 34(12), 2980-4.

Wieler, L. H. (1997):

Bestimmung von Virulenzfaktoren boviner Shiga-Toxin-bildender *Escherichia coli* (STEC)-Stämme als Bewertungsgrundlage ihrer klinischen Bedeutung für Rind und Mensch.

Giessen, Justus-Liebig-Universität, Habilitations-Schrift.

Wieler, L. H.; Schwanitz, A.; Vieler, E.; Busse, B.; Steinruck, H.; Kaper, J. B.; Baljer, G. (1998):

Virulence properties of shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains of serogroup O118, a major group of STEC pathogens in calves.

J Clin Microbiol. 36(6), 1604-7.

Wieler, L. H.; Busse, B.; Steinruck, H.; Beutin, L.; Weber, A.; Karch, H.; Baljer, G. (2000):

Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) strains of serogroup O118 display three distinctive clonal groups of EHEC pathogens.

J Clin Microbiol. 38(6), 2162-9.

Wieler, L. H.; Sonjinski, G.; Schlapp, T.; Failing, K.; Weiss, R.; Menge, C.; Baljer, G. (2007):

Longitudinal prevalence study of diarrheagenic *Escherichia coli* in dairy calves.

Berl Münch Tierärztl Wochenschr. 120(7-8), 296-306.

Willshaw, G. A.; Thirlwell, J.; Jones, A. P.; Parry, S.; Salmon, R. L.; Hickey, M. (1994):

Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in beefburgers linked to an outbreak of diarrhoea, haemorrhagic colitis and haemolytic uraemic syndrome in Britain.

Lett Appl Microbiol. 19(5), 304-7.

Wilson, J. B.; Clarke, R. C.; Renwick, S. A.; Rahn, K.; Johnson, R. P.; Karmali, M. A.; Lior, H.; Alves, D.; Gyles, C. L.; Sandhu, K. S.; McEwen, S. A.; Spika, J. S. (1996):

Vero cytotoxigenic *Escherichia coli* infection in dairy farm families.

J Infect Dis. 174(5), 1021-7.

Wiss, R.; Klare, B. (1987):

Aktuelle Gesichtspunkte zur Pathophysiologie des Hämolytisch-Urämischen Syndroms.

In: Akutes Nierenversagen im Kindesalter. / Hrsg. E. Balzer, M. Bulla, G. Kleinberg and E. Zweymüller. - Stuttgart: Schattauer Verlag. S. 121.

Wolin, M. J. (1969):

Volatile Fatty Acids and Inhibition of *Escherichia coli* Growth by Rumen Fluid.

Appl Microbiol. 17(1), 83-8.

Wong, C. S.; Jelacic, S.; Habeeb, R. L.; Watkins, S. L.; Tarr, P. I. (2000):

The risk of the hemolytic-uremic syndrome after antibiotic treatment of *Escherichia coli* O157:H7 infections.

N Engl J Med. 342(26), 1930-6.

Woodward, M. J.; Gavier-Widen, D.; McLaren, I. M.; Wray, C.; Sozmen, M.; Pearson, G. R. (1999):

Infection of gnotobiotic calves with *Escherichia coli* o157:h7 strain A84.

Vet Rec. 144(17), 466-70.

World Health Organisation (1996):

Food safety: Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* infection.

Wkly Epidemiol Rec. 71(35).

World Health Organisation (1997):

Prevention and control of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) infections.

WHO Consultation, Genf, Schweiz, World Health Organisation.

World Health Organisation (1998):

Zoonotic non-O157 Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* (STEC), Berlin: 23.-26-06-1998

World Health Organisation (2000):

2000 - *E. coli* O157 in Canada. abgerufen am 01.11.2008

http://www.who.int/csr/don/2000_05_30/en/index.html.

Wray, C.; McLaren, I.; Pearson, G. R. (1989):

Occurrence of 'attaching and effacing' lesions in the small intestine of calves experimentally infected with bovine isolates of verocytotoxic E coli.

Vet Rec. 125(14), 365-8.

Wray, C.; McLaren, I. M.; Randall, L. P.; Pearson, G. R. (2000):

Natural and experimental infection of normal cattle with *Escherichia coli* O157.
Vet Rec. 147(3), 65-8.

Zamboni, A.; Fabbriotti, S. H.; Fagundes-Neto, U.; Scaletsky, I. C. A. (2004):

Enteroaggregative *Escherichia coli* virulence factors are found to be associated with infantile diarrhea in Brazil.
J Clin Microbiol. 42(3), 1058-63.

Zschöck, M.; Amr El Sayed, A. A.; Hamann, H.-P. (1998):

Zum Vorkommen verotoxinbildender *Escherichia coli* (VTEC) bei der Mastitis des Rindes.
Milchwissenschaft, 53, 307-9.

Zschöck, M.; Hamann, H. P.; Kloppert, B.; Wolter, W. (2000):

Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* in faeces of healthy dairy cows, sheep and goats: prevalence and virulence properties.
Lett Appl Microbiol. 31(3), 203-8.

10. Anhang

10.1. Verwendete Geräte

Gerät	Typ	Hersteller (Ort)
Brutschrank	B 6120	Heraeus, Langwedel
Gefrierschrank	GSN 2825	Liebherr, Rostock
Gel-Elektrophoresekammer	ComPhor Maxi MT	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldenburg
Gel-Elektrophoresekammer	PerfectBlue™ Breitformat-Gel-system Maxi ExW	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Hybridisierungssofen	HIR4M	Grant Boekel, Cambridge/GB
Kühlschrank	FKS 1800	Liebherr, Rostock
Magnetrührer	MR 2000	Heidolph, Schwabach
Plattenschüttler	RO 5	Gerhardt, Königswinter
Schüttler	Reax 2000	Heidolph, Schwabach
Schüttelbrutschrank	3032	GFL, Burgwedel
Schüttelwasserbad	1083	GFL, Burgwedel
Thermocycler	Flex Cycler	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldenburg
Tiefgefrierschrank	HFU 586 Basic	Heraeus, Langwedel
Tischzentrifuge	3 K 12	Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz
Ultraschallbad	B 2210 E-MT	Branson, Connecticut/USA
UV-Gerät	Stratalinker 2400	Stratagene, La Jolla/USA
UV-Gel-Betrachter	Molecular Imager Gel Doc Systems	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Vortexer	G 560 E	Scientific Industries, New York/USA
Waage	LC 2201 S	Sartorius, Göttingen
Wasseranlage	Milli-Q UF	Millipore, Schwalbach
Wasseranlage	Milli RO	Millipore, Schwalbach
Wasserbad	WNE 14	Memmert, Schwabach

10.2. Verwendetes Labormaterial

Material	Lieferant
Pipetten Research	Eppendorf AG, Hamburg
Pipetten Reference	Eppendorf AG, Hamburg
Einmalösen	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe
Petrischalen	Erich Eydam KG, Kronshagen
Krutex Soft Rektal Gloves	Heiland Vet GmbH, Hamburg
Semper guard Vinyl Handschuhe kurz	Heiland Vet GmbH, Hamburg
Bovivet Gleitgel	Heiland Vet GmbH, Hamburg
Reagenzgläser klein	Erich Eydam KG, Kronshagen
Reagenzgläser groß	Erich Eydam KG, Kronshagen
96-er PCR-Platten	Sarstedt AG+Co., Nümbrecht
Nylonmembran	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Filterpapier	Erich Eydam KG, Kronshagen
Reaktionsgefäße 1,5ml	Eppendorf AG, Hamburg
Cryoröhrchen	Inverness Medical Deutschland, Köln
Stoppuhr	J Uhrenfabrik Junghans GmbH & Co.KG, Schramberg

10.3. Odds Ratio für *stx*-Nachweis in Fäzes von Milchrindern mit 95%-Konfidenzintervall, saisonal ausgewertet

Monat	Odds = 1											
	Jan	Feb	März	Apr	Mai	Jun	Aug	Sept	Okt	Nov	Dez	
Jan	×	1,88* (0,97-3,63)	1,64 (0,86-3,13)	2,12** (1,14-3,94)	1,21 (0,68-2,15)	1,10 (0,62-1,93)	0,91 (0,53-1,59)	0,86 (0,49-1,49)	0,67 (0,39-1,13)	1,20 (0,68-2,11)	1,39 (0,78-2,50)	
Feb	0,53* (0,28-1,03)	×	0,87 (0,42-1,80)	1,13 (0,56-2,27)	0,65 (0,33-1,25)	0,58 (0,30-1,13)	0,50** (0,26-0,96)	0,46** (0,19-0,87)	0,35*** (0,19-0,66)	0,64 (0,33-1,23)	0,74 (0,38-1,46)	
März	0,61 (0,32-1,16)	1,14 (0,55-2,36)	×	1,29 (0,65-2,57)	0,74 (0,39-1,41)	0,67 (0,35-1,27)	0,57* (0,30-1,08)	0,52** (0,28-0,99)	0,37*** (0,20-0,68)	0,66 (0,35-1,27)	0,85 (0,44-1,65)	
Apr	0,47** (0,25-0,88)	0,89 (0,44-1,78)	0,77 (0,39-1,54)	×	0,57* (0,31-1,06)	0,52** (0,28-0,96)	0,44*** (0,24-0,81)	0,41*** (0,22-0,74)	0,32*** (0,18-0,57)	0,57* (0,31-1,07)	0,66 (0,35-1,24)	
Mai	0,82 (0,47-1,47)	1,55 (0,80-3,00)	1,35 (0,71-2,59)	1,75* (0,94-3,26)	×	0,90 (0,51-1,60)	0,77 (0,44-1,35)	0,71 (0,40-1,24)	0,55** (0,32-0,94)	0,99 (0,56-1,75)	1,15 (0,63-2,08)	
Jun	0,91 (0,52-1,61)	1,72 (0,89-3,31)	1,50 (0,79-2,85)	1,94** (1,05-3,59)	1,11 (0,63-1,96)	×	0,85 (0,49-1,48)	0,78 (0,45-1,36)	0,60* (0,35-1,023)	1,08 (0,61-1,91)	1,27 (0,71-2,29)	
Aug	1,08 (0,62-1,88)	2,03** (1,06-3,88)	1,77* (0,94-3,35)	2,29*** (1,24-4,20)	1,31 (0,74-2,30)	1,18 (0,66-2,06)	×	0,93 (0,54-1,59)	0,72 (0,43-1,21)	1,29 (0,74-2,26)	1,50 (0,84-2,68)	
Sept	1,17 (0,67-2,03)	2,19** (1,15-4,18)	1,91** (1,01-3,61)	2,47*** (1,35-4,53)	1,41 (0,81-2,48)	1,28 (0,73-2,22)	1,07 (0,63-1,84)	×	0,78 (0,47-1,31)	1,41 (0,81-2,45)	1,62* (0,91-2,88)	
Okt	1,52 (0,89-2,61)	2,85*** (1,51-5,40)	2,49*** (1,33-4,66)	3,22*** (1,77-5,85)	1,84** (1,06-3,19)	1,66* (0,97-2,86)	1,40 (0,82-2,37)	1,30 (0,77-2,20)	×	1,80** (1,05-3,10)	2,11*** (1,20-3,71)	
Nov	0,84 (0,474-1,494)	1,58 (0,81-3,08)	1,38 (0,72-2,65)	1,78* (0,95-3,34)	1,02 (0,57-1,3)	0,92 (0,52-1,64)	0,78 (0,44-1,36)	0,72 (0,41-1,26)	0,56** (0,32-0,95)	×	1,17 (0,65-2,12)	
Dez	0,72 (0,40-1,29)	1,35 (0,69-2,66)	1,18 (0,61-2,29)	1,52 (0,81-2,88)	0,87 (0,48-1,58)	0,79 (0,44-1,42)	0,66 (0,37-1,17)	0,62* (0,35-1,10)	0,48*** (0,28-0,84)	0,87 (0,48-1,56)	×	

Fett: signifikant

Jan: Januar

Aug: August

Sept: September

Okt: Oktober

Apr: April

Mai: Mai

Nov: November

*: Tendenz

**: signifikant

***: hoch signifikant

Jan: Januar

Aug: August

Sept: September

Okt: Oktober

Apr: April

Mai: Mai

Nov: November

*: Tendenz

**: signifikant

grau: Schrift: nicht signifikant

Jan: Juni

Aug: August

Sept: September

Okt: Oktober

Apr: April

Mai: Mai

Nov: November

*: Tendenz

**: signifikant

(): 95%-Konfidenzintervall

Jul: Juli

Aug: August

Sept: September

Okt: Oktober

Nov: November

Dez: Dezember

(): 95%-Konfidenzintervall

**: signifikant

***: hoch signifikant

10.4. Angabe der 95%-Konfidenzintervalle für Tabelle 41

	Quartal (Odds=1)							
	1 Modell 1	1 Modell 2	2 Modell 1	2 Modell 2	3 Modell 1	3 Modell 2	4 Modell 1	4 Modell 2
1	×	×	↓ 0,61** (0,41-0,92)	↓ 0,09**** (0,03-0,30)	↓ 0,43**** (0,30-0,61)	↓ 0,08**** (0,02-0,16)	↓ 0,63** (0,43-0,91)	↓ 0,05**** (0,02-0,16)
	↑ 1,64** (1,09-2,46)	↑ 11,56**** (3,40-39,34)	×	×	→ 0,70* (0,49-1,00)	→ 0,88 (0,50-1,53)	→ 1,02 (0,70-1,49)	↓ 0,58** (0,34-0,98)
3	↑ 2,35**** (1,63-3,38)	↑ 13,22**** (4,01-43,61)	→ 1,43* (1,00-2,06)	→ 1,14 (0,65-2,00)	×	×	↑ 1,47** (1,06-2,03)	→ 0,66* (0,42-1,04)
	↑ 1,60** (1,10-2,34)	↑ 20,13**** (6,16-65,81)	→ 0,98 (0,67-1,42)	↑ 1,74** (1,02-2,98)	↓ 0,68** (0,49-0,94)	→ 1,52* (0,97-2,40)	×	×

Modell 1 *stx*-Nachweis mittels Screening-PCR

Modell 2: STEC-Nachweis mittels Kolonie-Hybridisierung

(): 95%-Konfidenzintervall

****: höchst signifikant ** : signifikant

*: Tendenz

↑: signifikant erhöht

↓: signifikant erniedrigt

→: nicht signifikant

11 Vorabveröffentlichungen

Aus der vorliegenden Arbeit gingen bereits folgende Veröffentlichungen hervor:

Menrath, A.; Kemper, N. (2007)

„Verbreitung Shiga-Toxin bildender *Escherichia coli* in Milchviehbetrieben Schleswig-Holsteins“.

II. EHEC-Workshop 2007, 09.-11.05.07, Wildbad Kreuth

Menrath, A.; Kemper, N. (2007)

„Prävalenz pathogener *Escherichia coli* bei Milchkühen– eine Longitudinalstudie“.

Vortragstagung der DGfZ und GfT, 26.-27.09.07, Hohenheim

Menrath, A.; Schlenker, G.; Kemper, N. (2007)

„Longitudinalstudie zur Ausscheidung Shiga-Toxin bildender *Escherichia coli* bei Milchkühen“.

2. Berliner Doktoranden-Symposium FB Veterinärmedizin, 08.06.07, Berlin

Menrath, A.; Kemper, N. (2008)

„Einflüsse auf die Ausscheidung Shiga-Toxin bildender *Escherichia coli* bei Milchkühen“.

Vortragstagung der DGfZ und GfT, 17.-18. September 2008, Bonn

Menrath, A.; Kemper, N. (2008)

„Prävalenz Shiga-Toxin bildender *Escherichia coli* in Milchviehbetrieben- Analyse verschiedener Risikofaktoren“.

DVG-Fachgruppentagung "Bakteriologie und Mykologie, 25. - 27. Juni 2008, Braunschweig

Kemper, N.; Menrath, A. (2008)

„Wiederkäuer als Überträger von Zoonosen: *Escherichia coli* verursachen Durchfall“.

Bauernblatt, S. 146-147

Menrath, A.; Heidemanns, K.; Wieler, L.-H.; Semmler, T.; Fruth, A.; Kemper, N.

„Persistent Shedding of Shiga-Toxin producing *Escherichia Coli* in Dairy Cattle in Northern Germany“.

7th International Symposium on Shiga Toxin (Verocytotoxin) producing *Escherichia coli* infections, 10.-13.Mai 2009, Buenos Aires /Argentinien

Menrath, A.; Heidemanns, K.; Wieler, L.-H.; Semmler, T.; Fruth, A.; Kemper, N.

„Examination on shedding of Shiga-Toxin producing *Escherichia coli* in dairy cattle in Northern Germany“.

XIV ISAH Congress 2009 Sustainable Animal Husbandry, 19.-23.Juli 2009, Vechta

12 Selbständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Bei der Anfertigung wurden keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel eingesetzt.

Ich habe keine entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar entgeltliche Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Ich habe die Dissertation an folgenden Instituten angefertigt:

- Institut für Tierzucht und Tierhaltung der Agrar- und Ernährungswissenschaftlichen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität in Kiel
- Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin

Die Dissertation wurde bisher nicht für eine Prüfung oder Promotion oder für einen ähnlichen Zweck zur Beurteilung eingereicht.

Ich versichere, dass ich die vorstehenden Angaben nach besten Wissen und Gewissen vollständig und der Wahrheit entsprechend gemacht habe.

Andrea Menrath

Kiel, den 04.08.2009

13 Danksagungen

Danken möchte ich allen, die zum Entstehen der vorliegenden Arbeit beigetragen haben.

Besonders danke ich den Landwirten für ihre freundliche und großzügige Kooperation, ohne diese wäre die Durchführung des Projektes nicht möglich gewesen.

Herrn Prof. Dr. Edgar Schallenberg danke ich für die Überlassung des Themas und Frau Dr. Nicole Kemper für die überragende Betreuung.

Bedanken möchte ich mich weiterhin bei Herrn Prof. Dr. Lothar H. Wieler für die Übernahme der Betreuung der Arbeit, sowie die professionelle und kritische Betreuung, aber auch bei Herrn Prof. Gerd Schlenker, der sich zunächst bereit erklärte, diese Arbeit zu betreuen, bis er in den Ruhestand ging.

Besonderer Dank gilt Evelyn Lass für die unverzichtbare Unterstützung im Labor und Gabi Ottzen-Schirakow und Julia Becker für die kompetente Hilfe in allen Fragen der PCR und Gel-Elektrophorese, aber auch Herrn Dr. Lutz Geue vom FLI in Wusterhausen für seine Bereitwilligkeit, mir die Methodik der PCR und der Koloniehybridisierung näher zu bringen. Herrn Dr. Ullrich Schotte danke ich für die Bereitstellung einiger sehr interessanter Publikationen.

Weiterhin danke ich Frau Dr. Angelika Fruth von RKI in Wernigerode, Kathrin Heidemanns und Thorsten Semmler aus dem Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen für die weiterführende Typisierung meiner STEC-Isolate.

Mein besonderer Dank gilt aber auch den Menschen, die mich während der Höhen und Tiefen bei der Erstellung dieser Arbeit begleitet haben und da wären:

- vor allem Franziska, die mir bei unseren Probenahme-Touren noch so einiges über Pflanzenbau und Rinderhaltung beigebracht,
- meinen Bürokollegen Franziska und Jan für die anregenden fachlichen und nichtfachlichen Gespräche,
- Imke G., die immer wenn es mal „eng“ wurde einsprang und half,
- Steffi, Imke T. und Carsten, meinen „Statistik-Feen“, die mir in jeder statistischen Fragestellung Frage und Antwort standen,
- Nicole Kemper, meiner „Cheffe“, für die äußerst gute fachliche und menschliche Unterstützung und Betreuung,

aber auch bei allen anderen Mitarbeitern des Instituts für Tierzucht und Tierhaltung der CAU Kiel, die mich in unterschiedlichster Weise unterstützt haben.

Schließlich möchte ich mich noch bei meiner Familie, meinen Freunden und meinem Schatz für ihre Geduld und Hilfe bedanken.

Sandra Ogriseck / Uni Kiel, <http://www.uni-kiel.de/bilder>
Jürgen Haacks / Uni Kiel, <http://www.uni-kiel.de/bilder>
Andrea Menrath / Uni Kiel

ISBN 978-3-941703-64-3



Verlag: Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH
35392 Gießen · Friedrichstraße 17 · Tel. 0641 / 24466 · Fax: 0641 / 25375
e-mail: info@dvf.net · Homepage: <http://www.dvf.de>