

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	1
Abbildungsverzeichnis	6
Tabellenverzeichnis.....	8
Abkürzungsverzeichnis.....	11
1 Ausgangssituation und Fragestellung	14
2 Literaturübersicht.....	15
2.1. <i>Escherichia coli</i>	15
2.1.1 Gesundheitlich bedenkliche <i>E. coli</i>	16
2.1.1.1 Enterohämorrhagische <i>E. coli</i> (EHEC) bzw. Verotoxin-bildende <i>E. coli</i> (VTEC)	18
2.1.1.2 Enterohämorrhagisch-aggregative <i>E. coli</i> (EAHEC)	22
2.1.2 Infektionen durch <i>E. coli</i>	23
2.1.2.1 Pathogenese von Infektionen durch Verotoxin-bildende <i>E. coli</i> (VTEC)	23
2.1.2.2 Vorkommen von Verotoxin-bildenden <i>E. coli</i> (VTEC) in Rohwurstzeugnissen	25
2.1.2.3 Erkrankungen durch enterohämorrhagische <i>E. coli</i> (EHEC).....	30
2.1.2.4 Infektionen durch enteroaggregative <i>E. coli</i> (EAEC)	33
2.1.3 Ausbruchsgeschehen von 2011	34
2.1.3.1 Virulenzeigenschaften von EAHEC O104:H4	35
2.1.3.1.1 Bacteriophagen und Verotoxin 2a	36
2.1.3.1.2 Plasmid pAA und AAF/I	37
2.1.3.1.3 Plasmid pESBL mit CTX-M15 und TEM-1	38
2.1.4 Nachweisverfahren	39
2.2 Rohwurstzeugnisse	45
2.2.1 Teewurst.....	47
3 Material und Methoden	48
3.1 Versuchsstamm	48
3.2 Vorversuch 1	48
3.2.1 Vorbereitung des Stammes	48
3.2.2 Verdünnungsreihe und Keimzahlbestimmung	50
3.2.3 Berechnung des Inokulums.....	51
3.2.4 Vorbereitung der Produktion	52
3.2.5 Mikrobiologische Untersuchung des Ausgangsmaterials	54
3.2.6 Produktion	54

3.2.7 Reinigung und Desinfektion	56
3.2.8 Probenahme sowie pH- und aw-Wert-Messungen.....	57
3.2.9 Untersuchung der Kontrollcharge	58
3.2.10 Untersuchung der artifiziell kontaminierten Charge	59
3.2.11 DNA-Isolierung.....	59
3.2.12 Multiplex-PCR auf <i>E. coli</i> O104:H4.....	61
3.3 Vorversuch 2	64
3.3.1 Mikrobiologische Untersuchung des Ausgangsmaterials	65
3.3.2 Produktion	65
3.3.3 Reinigung und Desinfektion	66
3.3.4 Probenahme sowie pH- und aw-Wert-Messungen.....	66
3.3.5 Untersuchung der artifiziell kontaminierten Charge	67
3.3.6 DNA-Aufbereitung	67
3.4. Etablierung einer konventionellen Multiplex-PCR zur Detektion von AAF/I	68
3.4.1 Auswahl und Abgleich von Gensequenzen und Primer	68
3.4.2. Auswahl der Stämme	71
3.4.3 Erster Testdurchlauf.....	72
3.4.4 Zweiter Testdurchlauf.....	75
3.4.5 Dritter Testdurchlauf.....	76
3.4.6 Vierter Testdurchlauf.....	78
3.5 Vorversuch 3	79
3.5.1 Vorbereitung des Stammes	79
3.5.2 Verdünnungsreihe und Keimzahlbestimmung	79
3.5.3 Berechnung des Inokulums	80
3.5.4 Vorbereitung der Produktion	80
3.5.5 Mikrobiologische Untersuchung des Ausgangsmaterials	81
3.5.6 Produktion	81
3.5.7 Reinigung und Desinfektion	82
3.5.8 Probenahme sowie pH-Wert-Messungen	83
3.6.9 Untersuchung der Kontrollcharge	83
3.6.10 Untersuchung der artifiziell kontaminierten Chargen	83
3.6.11 DNA-Aufbereitung	84
3.6.12 Multiplex-PCR auf <i>E. coli</i> O104:H4.....	84
3.6.13 Duplex-PCR auf AAF/I.....	85
3.7. Hauptversuche	86
3.7.1 Vorbereitung des Stammes	87

3.7.2 Verdünnungsreihe und Keimzahlbestimmung	87
3.7.3. Berechnung der Inokula.....	88
3.7.4 Vorbereitung der Produktionen.....	88
3.7.5 Mikrobiologische Untersuchung des Ausgangsmaterials.....	89
3.7.6 Produktion der Teewurstchargen	89
3.7.7 Reinigung und Desinfektion	91
3.7.8 Probenahme sowie pH-Wert-Messungen	91
3.7.9 Untersuchung der Kontrollchargen	91
3.7.10 Untersuchungen der artifiziell kontaminierten Chargen.....	92
3.7.11 DNA-Aufbereitung	92
3.7.12 Multiplex-PCR auf <i>E. coli</i> O104:H4.....	92
3.7.13 Duplex-PCR auf AAF/I.....	93
4 Ergebnisse	94
4.1 Vorversuch 1	94
4.1.1 Keimzahlbestimmungen.....	94
4.1.2 Mikrobiologische Untersuchung des Ausgangsmaterials.....	94
4.1.3 pH- und aw-Wert-Messungen.....	95
4.1.4 Untersuchung der Kontrollcharge auf EAHEC O104:H4.....	96
4.1.5 Untersuchung der artifiziell kontaminierten Charge auf EAHEC O104:H4.....	97
4.1.6 Molekularbiologische Untersuchung auf <i>E. coli</i> O104:H4.....	97
4.2 Vorversuch 2.....	99
4.2.1 Keimzahlbestimmungen.....	99
4.2.2 Mikrobiologische Untersuchung des Ausgangsmaterials.....	99
4.2.3 pH- und aw-Wert-Messungen.....	100
4.2.4 Untersuchung der Kontrollcharge auf EAHEC O104:H4.....	101
4.2.5 Untersuchung der artifiziell kontaminierten Charge auf EAHEC O104:H4.....	101
4.2.6 Molekularbiologische Untersuchung auf <i>E. coli</i> O104:H4.....	102
4.3 Etablierung einer PCR zum Nachweis von AAF/I.....	104
4.4. Vorversuch 3.....	111
4.4.1 Keimzahlbestimmungen.....	111
4.4.2 Mikrobiologische Untersuchung des Ausgangsmaterials.....	111
4.4.3 pH-Wert-Messungen	112
4.4.4 Untersuchung der Kontrollcharge auf EAHEC O104:H4.....	113
4.4.5 Untersuchung der artifiziell kontaminierten Chargen auf EAHEC O104:H4.....	114
4.4.6 Molekularbiologische Untersuchung auf <i>E. coli</i> O104:H4.....	114
4.4.7 Molekularbiologische Untersuchung auf AAF/I.....	115

4.5 Hauptversuche	116
4.5.1 Mikrobiologische Untersuchung des Ausgangsmaterials	116
4.5.2 pH-Wert-Messungen	117
4.5.3 Untersuchung auf EAHEC O104:H4	118
4.5.4 Molekularbiologische Untersuchung auf <i>E. coli</i> O104:H4	121
4.5.5 Molekularbiologische Untersuchung auf AAF/I	121
5 Diskussion	123
5.1 Methodische Aspekte	123
5.1.1 Auswahl des Kontaminationsstammes	123
5.1.2 Keimzahlberechnungen	124
5.1.3 Virulenzfaktoren Verotoxin 2a und AAF/I	125
5.1.4 Plasmid-codierte ESBL-Bildung	126
5.2 Risikoabschätzung	128
5.2.1 Vorkommen gesundheitlich bedenklicher <i>E. coli</i> -Stämme in Rohwurst	128
5.2.2 Teewurst als Risikolebensmittel?	130
5.2.2.1 Einfluss von Starterkulturen	133
5.2.3 Ausblick	135
6 Schlussfolgerungen	136
7 Zusammenfassung	137
8 Summary	139
9. Anhang	140
9.1. Rezepte und Herstellungsverfahren	140
9.1.1 Hirn-Herz-Bouillon (BHI)	140
9.1.2 Caseinpepton-Glukose-Hefeextrakt-Agar (PC)	140
9.1.3 Blut-Agar (CB)	141
9.1.4 Verdünnungslösung	141
9.1.5 NaCl	141
9.1.6 Kristallviolett-Galle-Glukose-Agar (VRBG)	142
9.1.7 TBX	142
9.1.8 Herstellung dNTP-Mix	143
9.1.9 Herstellung von 10x TBE-Stammlösung	143
9.2.0 Herstellung von TBE-Puffer (Gebrauchslösung):	143
9.2.1 Herstellung von Standard-Agarosegelen	144
9.2.2 Herstellung eines Ethidiumbromid-Färbebes	144
9.2 Fotodokumentation	145
9.3 Ergebnistabellen	149

10 Literaturverzeichnis.....	162
10.1 Originalarbeiten.....	162
10.2 Rechtsvorschriften und Leitsätze	180
10.3 Normen.....	181
11 Danksagung	182