

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	IX
Abbildungsverzeichnis	XII
Abkürzungsverzeichnis	XIV
1 Einleitung	1
2 Literaturübersicht	3
2.1 <i>Escherichia coli</i>	3
2.1.1 Eigenschaften	3
2.1.2 Vorkommen und Bedeutung	4
2.2 Pathogene <i>E. coli</i>	5
2.3 Verotoxin-bildende <i>E. coli</i>	8
2.3.1 Virulenzfaktoren	10
2.3.1.1 Verotoxine	11
2.3.1.2 Weitere Virulenzfaktoren	14
2.3.2 Serogruppen	17
2.3.3 Non-O157 VTEC	19
2.3.4 <i>E. coli</i> O157:H7	20
2.3.4.1 Spezifische Eigenschaften von <i>E. coli</i> O157:H7	20
2.3.4.2 Tenazität	21
2.4 Erkrankungen beim Menschen	23
2.4.1 Infektionsdosis	23
2.4.2 Risikogruppen	25
2.4.3 Klinische Symptomatik	25
2.5 Epidemiologie	28
2.5.1 Erregerausscheidung	29
2.5.2 Inzidenz EHEC-bedingter Erkrankungen	30
2.5.3 Übertragungswege	33
2.5.4 Vorkommen beim Tier	36
2.5.5 Vorkommen in Lebensmitteln	38
2.5.6 Rechtliche Vorgaben	45
2.6 Nachweisverfahren für <i>E. coli</i> O157:H7 aus Lebensmitteln	46
2.6.1 Beprobung	46
2.6.2 Anreicherungsmedien	47

2.6.3	Immunomagnetische Separation (IMS)	50
2.6.4	Subkultivierungsmedien	50
2.6.5	Molekularbasierte Nachweisverfahren.....	51
2.6.6	Bestätigung und Charakterisierung	54
2.6.6.1	Serotypisierung	54
2.6.6.2	Immunoassays	54
2.6.7	Validierte Alternativverfahren	55
3	Material und Methoden.....	57
3.1	Material.....	57
3.1.1	Referenzstämme.....	57
3.1.2	Probenmaterial.....	58
3.1.3	Medien und Lösungen.....	58
3.1.3.1	Herstellung von Nährmedien und Lösungen.....	60
3.1.4	Geräte und Labormaterialien.....	62
3.2	Methoden.....	67
3.2.1	Referenzverfahren	67
3.2.2	Alternativverfahren	68
3.2.3	Probenvorbereitung.....	71
3.2.4	Inokulation.....	71
3.2.4.1	Anzucht und Kältebehandlung der Referenzstämme	71
3.2.4.2	Inokulation der Versuchsansätze.....	72
3.2.5	Probenahmezeitpunkte	73
3.2.6	Durchführungsprotokolle für die einzelnen Testverfahren.....	73
3.2.6.1	IMS im Referenzverfahren.....	73
3.2.6.2	IMS im Alternativverfahren	73
3.2.6.3	Beimpfung und Auswertung des Rainbow® Agars O157	74
3.2.6.4	Beimpfung und Auswertung von CT-SMAC-Agar	75
3.2.6.5	Latex-Agglutination.....	77
3.2.6.6	Subkultur auf Blutagar	77
3.2.6.7	Singlepath® <i>E. coli</i> O157	78
3.2.6.8	Duopath® Verotoxin	78
3.2.6.9	Biochemische Reihe mit api 20E™	79
3.2.6.10	DNA-Extraktion mit dem foodproof® StarPrep One Kit	80
3.2.6.11	DNA-Extraktion durch Kochen	80
3.2.6.12	Real time-PCR mit dem foodproof® <i>E. coli</i> O157 Detection Kit 5'Nuclease.....	81
3.2.7	Untersuchung Rohmaterial.....	83

3.2.7.1	Begleitflora	84
3.2.7.2	Chemische Analysen	84
3.2.8	Statistik und Kennwerte zur Ergebnisinterpretation	87
3.2.8.1	Wiederfindungsrate zum Vergleich ungepaarter Proben	87
3.2.8.2	Sensitivität zum Vergleich gepaarter Proben	87
3.2.8.3	Spezifität zum Vergleich gepaarter Proben	87
3.2.8.4	Bewertungskriterien bezüglich der Vergleichbarkeit der einzelnen Ansätze	88
3.2.8.5	Festlegung einer Ergebnis-Kaskade	89
4	Ergebnisse	92
4.1	Rohmaterial	92
4.1.1	Chemische Analyse	92
4.1.2	Begleitflora	93
4.2	Inokulation	94
4.2.1	Anzucht von <i>E. coli</i> O157:H7 (ATCC 35150) zur Inokulation	94
4.2.2	Inokulation von <i>E. coli</i> ATCC 35150 als Positiv-Kontrolle	97
4.2.3	Inokulation von <i>E. coli</i> ATCC 25922 als Negativ-Kontrolle	97
4.2.4	Herstellung fraktioniert-inokulierter Proben	98
4.3	Bewertungskriterien zur Vergleichbarkeit der einzelnen Ansätze	99
4.4	Fraktioniert-inokulierte Proben	101
4.4.1	Wiederfindungsrate	105
4.4.2	Sensitivität	107
4.4.3	Spezifität	110
4.4.4	Auswertung von C _t -Werten der RT-PCR	112
5	Diskussion	114
5.1	Diskussion der Methodik	114
5.1.1	Rohmaterial	114
5.1.2	Referenzverfahren	115
5.1.3	Probengröße	116
5.1.4	Auswahl der Referenzstämme	119
5.1.5	Kühlung vor Inokulation	119
5.1.6	Anlegen fraktioniert-positiver Proben	120
5.1.7	Inokulationsdosis und Detektionslimit	122
5.1.8	Vergleichbarkeit der Untersuchungen	125
5.1.9	Ergebnisauswertung mit PP- und ITT-Verfahren	127
5.1.10	Molekularbiologischer Nachweis	127
5.1.11	Immunologische Nachweisverfahren	129

5.1.12	Kulturelle Nachweisverfahren.....	131
5.2	Diskussion der Ergebnisse.....	133
5.2.1	Kontrollen.....	133
5.2.2	Kontamination des Rohmaterials.....	134
5.2.3	Anreicherung.....	136
5.2.3.1	Anreicherungsmedium.....	136
5.2.3.2	Anreicherungsdauer	137
5.2.3.3	Anreicherungstemperatur	138
5.2.4	Sensitivität und Spezifität	139
5.2.5	Wiederfindungsrate.....	140
5.2.6	Bedeutung eines positiven <i>E. coli</i> O157:H7-Nachweises	142
5.3	Eingliederung und Ausblick.....	144
5.3.1	Kriterien für ein geeignetes Nachweisverfahren	144
5.3.2	Bedeutung von Hürdenkonzepten	147
5.3.3	Selektive Untersuchung auf <i>E. coli</i> O157	148
6	Schlussfolgerungen	150
7	Zusammenfassung	152
8	Summary	154
9	Anhang	156
9.1.1	Legende zu den Rohdaten-Tabellen (Nrr. 41-43)	157
9.1.2	Legende zur Bewertungs- und Vergleichs-Tabelle 44	173
9.1.3	Zusätzliche Ergebnisse Rohmaterial	185
9.1.4	Zusätzliche Ergebnisse der fraktioniert inokulierten Proben	186
9.1.5	Legende zur Auswertung der C _T -Werte in Tabelle 46	189
10	Literaturverzeichnis.....	193
11	Danksagung	235
12	Erklärung.....	237