

Untersuchungen zum Vorkommen von verotoxinbildenden Escherichia coli in genussfertigen und nicht genussfertigen Lebensmitteln = Investigations on the occurrence of verotoxin producing Escherichia coli in foods ready-to-eat and not-ready-to-eat

Autor(en): Svoboda, Paul / Gautsch, Sylvia / Lüthi, Thomas M.

Objektyp: Article

Zeitschrift: **Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène**

Band (Jahr): **89 (1998)**

Heft 6

PDF erstellt am: **12.07.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-983167>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Untersuchungen zum Vorkommen von verotoxinbildenden *Escherichia coli* in genussfertigen und nicht genussfertigen Lebensmitteln

Investigations on the Occurrence of Verotoxin Producing *Escherichia coli* in
Foods Ready-to-eat and Not-ready-to-eat

Key words: VTEC, EHEC, *Escherichia coli*, PCR, Food

Paul Svoboda

Kantonales Laboratorium Basel-Landschaft, Liestal

Sylvia Gautsch

Kantonales Laboratorium Basel-Stadt, Basel

Thomas M. Lüthi

Lebensmittelkontrolle, Kanton Solothurn, Solothurn

Einleitung

In den letzten Jahren wurden weltweit zunehmend *Escherichia coli*-Stämme aus Lebensmitteln isoliert, welche in der Lage sind, zwei potente Verotoxine (VT), das VT1 und VT2, zu produzieren. Diese VT-bildenden *Escherichia coli* (VTEC) – auch enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC) genannt – können bei Menschen schon in geringer Anzahl ernsthafte Erkrankungen hervorrufen (1). Die Ansteckung erfolgt dabei sowohl von Mensch zu Mensch via fäkal-oralen Route als auch durch den Verzehr kontaminierter Lebensmittel, vor allem tierischen Ursprungs (2, 3). Insbesondere rohes oder unzureichend durchgegartes Rindfleisch gilt dabei als Hauptinfektionsquelle (4–7).

Eine Sonderrolle unter den VTEC scheint der in den USA und England dominierende VTEC Serotyp O157:H7 einzunehmen, der sich durch eine verlangsamte Sorbitolfermentation und eine fehlende β -Glucuronidase auszeichnet (8). Es wird jedoch zunehmend auch über Infektionen mit VTEC, zum Teil in Form grösserer

Ausbrüche, berichtet, welche nicht diesem Serotyp angehören (9, 10). In der Schweiz spielt der Serotyp O157 zurzeit nur eine untergeordnete Rolle. So konnten im Zeitraum von 1992–1996 *E. coli* O157 nur gerade für einen Drittel aller VTEC-Infektionen verantwortlich gemacht werden (A. Burnens, Nationales Zentrum für enteropathogene Erreger, NENT, persönliche Mitteilung). Lüscher et al. (11) zeigten bei einer Untersuchung im Jahre 1992, dass bei 9 von 10 VTEC-Patienten andere Serotypen als O157:H7 für die Erkrankung verantwortlich waren. Überhaupt sind im Gegensatz zu anderen Ländern, wie den USA, Kanada, Japan, Grossbritannien, aber auch Deutschland, in denen zunehmend durch VTEC hervorgerufene sporadische Erkrankungen wie auch Ausbrüche mit mehreren 100 bis 1000 Betroffenen auftreten, VTEC-Infektionen beim Menschen in der Schweiz eher selten (12). So wurde in der Schweiz bis heute kein Ausbruch beschrieben, und Untersuchungen an Kollektiven von Diarrhöpatienten zeigten, dass VTEC lediglich bei 1,6% bzw. 1,9% der Patienten nachgewiesen werden (11, 13).

Mit den für den Serotyp O157 üblichen Methoden werden die non-O157-Stämme aufgrund ihrer unterschiedlichen biochemischen Reaktionen nicht nachgewiesen. Diese Tatsache macht den Einsatz von Nachweismethoden erforderlich, welche auf der genetischen Identifizierung der Toxinbildungsfähigkeit mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) bzw. DNA-Hybridisierung oder auf der phänotypischen Identifizierung der VT mittels Zellkulturtest bzw. immunologischer Testverfahren basieren. Solche Nachweismethoden drängen sich auch deshalb auf, weil bereits weitere *Enterobacteriaceae* (z. B. *Citrobacter freundii*) beschrieben wurden, welche in der Lage waren, VT zu produzieren und lebensmittelbedingte Ausbrüche auszulösen (14).

Obwohl Hackfleischprodukte als Hauptinfektionsquelle gelten, wurden auch Epidemien beschrieben, die durch den Genuss von Rohmilch, Joghurt, Apfelwein und Wasser verursacht wurden. Daneben erfolgte auch durch pasteurisierte Milch, Rohmilchkäse und Salat eine Übertragung von VTEC (4, 6, 15, 16). Während in der Literatur zahlreiche Daten zur Verbreitung von VTEC in Lebensmitteln, insbesondere in Fleischprodukten, in den USA, Kanada und Grossbritannien zu finden sind (5, 7, 16), liegt für die Schweiz nur eine Untersuchung zur Kontamination von rohem Rindfleisch vor (17).

Ziel der vorliegenden Studie, welche im Zeitraum von 1995 bis 1998 in drei kantonalen Laboratorien durchgeführt wurde, war es, Aufschluss über das Vorkommen von VTEC in verschiedenen sowohl genuss- als auch nicht genussfertigen Lebensmitteln in der Nordwestschweiz zu erhalten. Hierzu wurden unterschiedliche Produktgruppen mit Hilfe von zuvor in den jeweiligen Labors etablierten Untersuchungsmethoden auf die Anwesenheit von VTEC untersucht, wobei der eigentliche Nachweis dieser Erreger mittels zweier verschiedener PCR-Systeme erfolgte. Zwei Labors verwendeten hierzu einen kommerziell erhältlichen, auf einer einfachen PCR beruhenden Kit, während im dritten Labor der Nachweis über eine nested PCR erfolgte.

Material und Methoden

Verwendete E. coli-Kontrollstämme

- Positivkontrolle: *E. coli* O157:H7, Stamm 933 (VT1+/VT2+),
Centers for Disease Control (CDC), Atlanta
- Negativkontrolle: *E. coli* ATCC 25922

Untersuchte Lebensmittel

Zur Untersuchung gelangten 455 rohe, gekühlte oder gefrorene Hackfleischproduktproben von Rind, Schwein und Geflügel, 91 Rohwurstwaren, 25 Proben von ca. 200 g schweren Stücken rohen Rindfleisches, 81 Weichkäse aus pasteurisierter oder roher Milch, 77 vorgeschnittene, gewaschene, abgepackte Salate (Schnittsalat, Sojasprossen usw.), 110 Rohmilchproben und 8 Proben behandeltes Trinkwasser aus dem Verteilernetz. Mit Ausnahme der 25 rohen Rindfleischproben am Stück und einem Teil der Rohmilchproben wurden die Lebensmittelproben im Detailhandel oder aus Restaurationsbetrieben erhoben, gekühlt ins Untersuchungslabor gebracht und gleichentags der mikrobiologischen Untersuchung zugeführt. Bei den Rindfleischproben am Stück handelte es sich um Importware aus Nord- und Südamerika, die vom Zoll erhoben, gekühlt an das Untersuchungslabor gesandt und am Tag des Eintreffens der mikrobiologischen Untersuchung zugeführt wurde. Von den 110 Rohmilchproben stammen 52 aus dem Detailhandel, 8 Proben direkt vom Produzenten und 50 Proben aus zwei Milchannahmestellen, welche von insgesamt 33 Landwirtschaftsbetrieben (mit durchschnittlich 17 Kühen) beliefert werden. Sämtliche Rohmilchproben wurden gekühlt ins Untersuchungslabor gebracht und gleichentags der mikrobiologischen Untersuchung zugeführt.

Die Trinkwasserproben wurden im Rahmen der periodischen Trinkwasserkontrolle in den Gemeinden des Kantons Basel-Landschaft zusätzlich auf das Vorkommen von VTEC untersucht. Detaillierte Angaben zur Anzahl, Art und Herkunft der untersuchten Proben finden sich in Tabelle 1.

Isolierung und Nachweis von VTEC mittels einfacher PCR

Die Untersuchung diverser Lebensmittelproben auf die Anwesenheit von VTEC erfolgte in den Labors 1 und 2 mit Hilfe eines einheitlichen Kultivierungsschrittes, dem sich eine einfache PCR-Nachweismethode anschloss.

Anreicherung

Für die Anreicherung wurden 25 g bzw. 25 ml Lebensmittelprobe eingewogen, mit 225 ml auf Raumtemperatur vorgewärmter modifizierter Tryptone Soya Broth (mTSB, Oxoid CM 129) mit Novobiocinzusatz (Merck 1.06255.0001, Endkonzen-

Tabelle 1. Anzahl, Art und Herkunft der untersuchten Lebensmittelproben und Vorkommen von VTEC

Lebensmittel	Labor 1	Labor 2	Labor 3	Total
<i>Rohe Hackfleischprodukte</i>	98 (3*)	150 (1*)	207 (3*)	455 (7*)
Hackfleisch, Rind/Detailhandel	12	4	56	72
Hackfleisch, Schwein/Detailhandel	–	–	7 (1*)	7 (1*)
Hackfleisch, Geflügel/Detailhandel	–	–	5	5
Hackfleisch, gemischt/Detailhandel	2	–	4	6
Hackbraten/Detailhandel	1	–	3	4
Hacksteaks, Rind/Detailhandel	3 (1*)	8	24 (2*)	35 (3*)
Hacksteaks, Schwein/Detailhandel	–	–	3	3
Tatar, Rind/Detailhandel	23	12	4	39
Hamburger, Rind/Detailhandel	57 (2*)	91	29	177 (2*)
Hamburger, Geflügel/Detailhandel	–	–	9	9
Hamburger, Rind/Restaurationsbetrieb	–	35 (1*)	50	85 (1*)
Poulet-Nuggets/Restaurationsbetrieb	–	–	13	13
<i>Rohwurstwaren/Detailhandel</i>	31	–	60	91
<i>Robes Rindfleisch am Stück/Zoll</i>	–	–	25 (4*)	25 (4*)
<i>Weichkäse</i>	31	50	–	81
aus Rohmilch/Detailhandel	9	7	–	16
aus pasteurisierter Milch/Detailhandel	22	18	–	40
unbekannt/Detailhandel	–	25	–	25
<i>Vorgeschnittene Salate/Detailhandel</i>	32	45	–	77
<i>Robmilch</i>	–	100 (7*)	10	110 (7*)
Detailhandel	–	42 (4*)	10	52 (4*)
Sammelstelle	–	50 (2*)	–	50 (2*)
Direktvermarkter	–	8 (1*)	–	8 (1*)
<i>Trinkwasser</i>	8	–	–	8
Total	200 (3*)	345 (8*)	302 (4*)	847 (1*)

(*) = Anzahl VTEC-positiver Befunde

tration 20 mg/l) versetzt, während 90 s im Stomacher homogenisiert und anschließend während 6 h bei 42 °C inkubiert.

Nach erfolgter Bebrütung wurden je 100 µl der Anreicherung auf *E. coli* Direkt Agar MUG (ECD-MUG, Oxoid CM 649B) ausgestrichen und bei 37 °C während 18–24 h inkubiert. Platten mit Keimwachstum wurden für die PCR-Analytik verwendet.

Trinkwasser

100 ml Trinkwasser wurden nach der Methode 7.07.2 des Schweizerischen Lebensmittelbuches, Kapitel 56 (18), angesetzt. Filter (Millipore HAWG 050S1) mit Keimwachstum wurden für die PCR-Analytik verwendet.

DNA-Extraktion

Alle auf ECD-MUG-Platten gewachsenen Bakterienkolonien wurden mittels sterilem, zuvor in steriler, physiologischer NaCl-Lösung angefeuchtetem Tupfer aufgenommen und in 5 ml einer sterilen, physiologischen NaCl-Lösung suspendiert. 100 µl der resultierenden Suspension wurden in ein steriles Röhrchen mit 400 µl Lysis-Puffer, bestehend aus 2,5% Chelex 100 (BioRad 143-2832) und 50 mM Tris, pH 9,5 (Fluka 93350) pipettiert. Die Röhrchen wurden im Wasserbad während 15 min bei 100 °C erhitzt und anschliessend während 6 min bei 13 000 rpm zentrifugiert (17). Der Überstand wurde für die PCR-Analytik eingesetzt.

Einfache PCR

Verwendet wurde ein vom Institut für medizinische und molekulare Diagnostik (IMD), Zürich, erhältlicher PCR-Kit («PCR Mix (VT1VT2)», IMD AG, Renggerstr. 56, CH-8038 Zürich). Gemäss Anleitung des Herstellers wurden 10 µl Überstand in ein 0,5-ml-Röhrchen mit 40 µl PCR-Mix (PCR Mix VTEC und Super TaqPolymerase) pipettiert. Die Amplifikation (3 min 93 °C – 40 Zyklen bei 92 °C/30 s, 58 °C/40 s, 72 °C/30 s – 5 min 72 °C) erfolgte im Labor 1 in einem Progene Thermocycler (Techne) bzw. im Labor 2 nach Überschichtung der Röhrchen mit 2 Tropfen Mineralöl (Sigma M5904) in einem Crocodile II Thermocycler (Appligene). Bei jeder Amplifikation wurde *E. coli* O157:H7 (Stamm 933) als positive sowie *E. coli* ATCC 25922 als negative Kontrolle mitgeführt.

Die Auftrennung der Amplifikationsprodukte erfolgte mittels Elektrophorese auf einem 2,7% Agarosegel (Boehringer Mannheim 1388983) mit 1 µg/ml Ethidiumbromid (BioRad 161-0430) in TBE-Puffer (19). Als DNA-Grössenstandard diente AmpliSize™ (DNA Size Standard 50–2000 bp, BioRad 170–8200). Die Banden wurden auf einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht, photographiert und ausgewertet. Nach Herstellerangaben galt als positiver Befund der Nachweis einer oder zweier Banden von 179 bp (VT1) bzw. 346 bp (VT2). Wurden keine Banden nachgewiesen, galt die Probe als VTEC-negativ.

Bei Vorliegen positiver Befunde wurde die jeweilige ECD-MUG-Platte bzw. die dazugehörige Anreicherungsbouillon zur Bestätigung mittels PCR, zum VT-Nachweis mittels ELISA sowie zur Speziesidentifikation und Serotypbestimmung an das NENT gesandt.

Isolierung und Nachweis von VTEC mittels nested PCR

Für den Nachweis von VTEC in verschiedenen Lebensmitteln verwendete Labor 3 je nach untersuchter Produktgruppe zwei Anreicherungsmedien. Der Kultivierung schloss sich eine nested PCR-Methode an.

Anreicherung

Von Fleischproben wurden 25 g eingewogen und mit 225 ml auf Raumtemperatur vorgewärmter MacConkey Broth (MCB, Difco 0020-01-5) versetzt. Von Milchproben wurden je 25 ml mit 225 ml auf Raumtemperatur vorgewärmter mTSB mit Novobiocinzusatz (Difco 3197-60, Endkonzentration 20 mg/l) versetzt. Die Ansätze wurden während 90 s im Stomacher homogenisiert und anschliessend während 24 h bei 42 °C inkubiert. Nach erfolgter Bebrütung wurden je 100 µl der Anreicherung auf ECD-MUG-Platten (Biolife 401427) ausgestrichen und bei 37 °C während 18–24 h inkubiert. Platten mit Keimwachstum wurden für die PCR-Analytik verwendet.

DNA-Extraktion

Die DNA-Extraktion erfolgte wie bereits zuvor beschrieben.

Nested PCR

Die Durchführung der nested PCR erfolgte mit einigen Modifikationen in Anlehnung an ein vom Labor für Lebensmittelchemie, Institut für Biochemie, Universität Bern, zur Verfügung gestelltes Protokoll (M. Gilgen, Protokoll für den PCR-Nachweis verotoxinogener *E. coli* in Fleischproben). Zur Anwendung kamen zwei nested PCR-Systeme zum Nachweis der Gene für VT1 und VT2. Die Primer-Paare I-1 (ACACTGGATGATCTCAGTGG)/I-2 (CTGAATCCCCCTCCATTATG) und I-3 (TTGTCATCATCATGCATCGC)/I-4 (AGTTACA-CAATCAGGCGTTCG) dienten zur Amplifikation einer Region des VT1-Gens, wobei die jeweiligen Fragmente 614 bp (Primer-Paar I-1/I-2) bzw. 246 bp (Primer-Paar I-3/I-4) betragen. Die Primer-Paare für die Amplifikation einer Region des VT2-Gens waren II-1 (CCATGAC(AG)ACGGACAGCAGTT)/II-2 (CCTGTCA(AG)CTGAGCACTTTG) und II-3 (GTTCTGCGTTTTGTTCAC TGT)/II-4 (AGCTGTATTACTTTCCCATAA) mit Fragmentlängen von 779 bp (Primer-Paar II-1/II-2) bzw. 372 bp (Primer-Paar II-3/II-4). Die PCR erfolgte jeweils in 100-µl-Ansätzen. Die Reaktionsbedingungen für die erste PCR mit den Primer-Paaren I-1/I-2 für VT1 und II-1/II-2 für VT2 waren PCR-Puffer 1x (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 0,1% Triton-X-100, pH 8,8, Promega M190A), 2 µg/ml BSA (Pharmacia 27-8915-01), 3 mM MgCl₂ (Promega A351B), 200 µM von jedem dNTP (Promega U1240), 0,25 µM der Primer I-1, I-2, II-1 und II-2 sowie 2 U Taq DNA Polymerase (Promega M186A). Als Matrize dienten 20 µl Überstand aus der DNA-Extraktion. Für die zweite, nested PCR mit den Primer-Paaren I-3/I-4 für VT1 und II-3/II-4 für VT2 änderten sich die Reaktionsbedingungen wie folgt: 1,5 mM MgCl₂ sowie 0,5 µM der jeweiligen Primer. Als Matrize für die nested PCR

wurden 2 µl der ersten PCR zugegeben. *E. coli* O157:H7 (Stamm 933) sowie *E. coli* ATCC 25922 dienten bei jeder Amplifikation als Positiv- und Negativkontrolle. Die Amplifikation erfolgte nach Überschichtung der Röhrchen mit 2 Tropfen Mineralöl (Sigma M5904) in einem Crocodile II Thermocycler (Appligene) mit folgendem Programm: 94 °C/1 min, 25 Zyklen bei 94 °C/30 s, 60 °C/1 min, 72 °C/1 min – 72 °C/3 min für die äusseren Primer-Paare und 1 min 94 °C – 30 Zyklen bei 94 °C/30 s, 55 °C/1 min, 72 °C/1 min – 72 °C/3 min für die nested PCR.

Die Auftrennung der Amplifikationsprodukte erfolgte mittels Elektrophorese auf einem 1,5% Agarosegel mit 1 µg/ml Ethidiumbromid (Merck 1.11608) in TBE-Puffer. Als DNA-Grössenstandard diente eine 100-bp-Leiter (Pharmacia 27-4001-01). Die Banden wurden auf einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht, fotografiert und ausgewertet. Der Nachweis einer oder zweier Banden von 614 bp (VT1) bzw. 779 bp (VT2) nach der ersten PCR bzw. 246 bp (VT1) bzw. 342 bp (VT2) nach der zweiten PCR galt als positiver Befund. Ansonsten galt die Probe als VTEC-negativ.

Bei Vorliegen positiver Befunde wurde die jeweilige ECD-MUG-Platte bzw. die dazugehörige Anreicherungsbouillon zur Bestätigung mittels PCR, zum VT-Nachweis mittels ELISA sowie zur Speziesidentifikation und Serotypbestimmung an das NENT gesandt.

Resultate

Insgesamt wurden 296 genussfertige (Tatar, Rohwurstwaren, Salate, Weichkäse, Trinkwasser) und 551 nicht genussfertige Lebensmittelproben untersucht. Während aus keinem der genussfertigen Lebensmittel VTEC isoliert werden konnten, waren in den nicht genussfertigen 18mal (3,3%) VTEC nachweisbar. Dabei handelte es sich um sieben von 416 (1,7%) rohen Hackfleischprodukten, vier von 25 (16%) rohen Rindfleischproben am Stück sowie um sieben von 110 (6,4%) Rohmilchproben (Tabelle 1). Über die Eigenschaften der aus den einzelnen Lebensmittelproben isolierten VTEC-Stämme gibt Tabelle 2 Auskunft.

Rohe Hackfleischprodukte

In vier von insgesamt 248 (1,6%) in den Labors 1 und 2 mit der einfachen PCR analysierten rohen Hackfleischproduktproben vom Rind aus dem Handel und aus Restaurationsbetrieben konnten VTEC nachgewiesen werden. Dabei handelte es sich um drei von 183 (1,6%) Hamburgern sowie um ein von 11 (9,1%) Rinderhacksteaks. In den restlichen Hackfleischproduktproben konnten keine VTEC gefunden werden. Die aus einem Restaurationsbetrieb stammende Hamburgerprobe enthielt das VT2-Gen, eine der aus dem Handel erhobenen Hamburgerproben sowie das Hacksteak enthielten jeweils das VT1-Gen beherbergende Keime (Abb. 1). Im dritten aus dem Handel erhobenen Hamburger konnte das VT2-Gen nach-

Tabelle 2. Herkunft und Eigenschaften von 18 aus nicht genussfertigen Lebensmitteln isolierten VTEC-Stämmen

Herkunft	Eigenschaften			
	Serotyp	VT1-Gen	VT2-Gen	Toxinbildung
<i>Rohe Hackfleischprodukte</i>				
Hackfleisch, Schwein	<i>E. coli</i> non-O157	+	-	+
Hacksteak, Rind	<i>E. coli</i> non-O157	+	-	+
	<i>E. coli</i> non-O157	-	+	-
	<i>E. coli</i> non-O157	+	-	+
Hamburger, Rind	<i>E. coli</i> non-O157	+	-	+
	<i>E. coli</i> non-O157	-	+	-
Hamburger, Rind (Restaurationsbetrieb)	<i>E. coli</i> non-O157	-	+	+
Rohes Rindfleisch am Stück (Zollproben)	<i>E. coli</i> non-O157	+	+	+
	<i>E. coli</i> non-O157	+	+	-
	<i>E. coli</i> non-O157	+	+	+
	<i>E. coli</i> non-O157	-	+	fraglich positiv
<i>Robmilch</i>				
Detailhandel	<i>E. coli</i> non-O157	-	+	-
	<i>E. coli</i> non-O157	+	-	+
	<i>E. coli</i> non-O157	+	-	-
	<i>E. coli</i> non-O157	+	-	-
Sammelstelle	<i>E. coli</i> non-O157	+	+	+
	<i>E. coli</i> non-O157	-	+	-
Direktvermarkter	<i>E. coli</i> non-O157	+	-	-

gewiesen werden. Die nachfolgende Bestätigung durch das NENT zeigte, dass es sich in allen Fällen um *E. coli* non-O157-Stämme handelte. Bei sämtlichen eingeschickten Proben fiel der Nachweis der VT-Gene mittels PCR positiv aus. Mit Ausnahme des aus dem dritten Hamburger isolierten VT2-Gen beherbergenden *E. coli*-Stammes fiel bei den anderen Stämmen auch der VT-Nachweis mittels ELISA positiv aus.

Von 207 aus dem Handel und aus Restaurationsbetrieben erhobenen und vom Labor 3 mittels nested-PCR untersuchten rohen Hackfleischproduktproben von Rind, Schwein und Geflügel enthielten drei Proben (1,4 %) aus dem Handel VTEC. Eine Probe wies das VT2-Gen, die beiden anderen das VT1-Gen beherbergende Keime auf. Dabei gelang der Nachweis in zwei von 166 (1,2%) Proben Rindfleisch, in einer der 10 (10%) Proben Schweinefleisch, jedoch in keiner der 27 Proben Geflügelfleisch und vier Mischproben. Bei den VTEC aufweisenden Proben handelte es sich um zwei von 24 (8,3%) analysierten Rinderhacksteaks und um eine von sieben (14,3%) untersuchten Proben Schweinehackfleisch. Die Bestätigung durch das NENT ergab einmal einen *E. coli* non-O157, bei dem die VT-Gene mittels PCR, nicht jedoch die VT selbst mittels ELISA nachgewiesen werden konnten. Bei

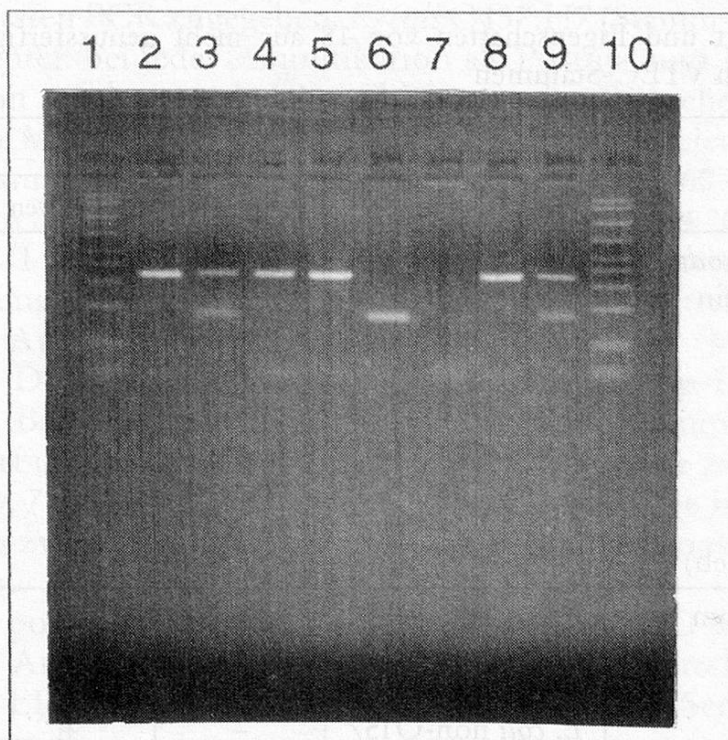


Abb. 1. Nachweis von VTEC in Hackfleischprodukten mittels einfacher PCR. Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel mit je 20 µl der für VT1- (179 bp) und VT2-Gen (346 bp) spezifischen Amplifikationsprodukten.

Bahnen 1, 10: Längenstandard (AmpliSize, BioRad, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 700, 1000, 1500, 2000 bp).

Bahnen 2, 4, 5: VT2 positives *E. coli*-Isolat aus Hamburger

Bahnen 3, 9: Positiv-Kontrolle (*E. coli* O157:H7, VT1 und VT2 positiv)

Bahn 6: VT1 positives *E. coli*-Isolat aus Hamburger

Bahn 7: Negativ-Kontrolle (*E. coli* ATCC 25922)

Bahn 8: Positiv-Kontrolle (*E. coli* O26, VT2 positiv).

der zweiten und dritten VTEC-positiven Probe handelte es sich ebenfalls um einen *E. coli* non-O157-Stamm, bei dem sowohl der Nachweis der VT-Gene mittels PCR positiv ausfiel, als auch die VT selbst mittels ELISA nachgewiesen werden konnten.

Rohwurstwaren

In keiner der 91 im Labor 1 und 3 mittels einfacher bzw. nested PCR analysierten Proben Rohwurstwaren konnten VTEC gefunden werden.

Rohes Rindfleisch am Stück

In vier von 25 (16%) am Zoll erhobenen und im Labor 3 mittels nested PCR analysierten Proben rohes Rindfleisch aus Süd- und Nordamerika konnten VTEC nachgewiesen werden. Sämtliche VTEC-positiven Proben stammten aus Argenti-

nien. Drei Proben enthielten sowohl das VT1- als auch das VT2-Gen, die vierte ausschliesslich das VT2-Gen beherbergende Keime. Das NENT bestätigte bei einer Probe das Vorliegen von *E. coli* non-O157, bei dem sowohl der Nachweis beider VT-Gene mittels PCR als auch der VT-Nachweis mittels ELISA positiv waren. Auch bei den anderen drei Proben handelte es sich um *E. coli* non-O157-Stämme, bei denen zwar der Nachweis der VT-Gene mittels PCR positiv, der VT-Nachweis mittels ELISA jedoch einmal positiv, einmal fraglich positiv und einmal negativ ausfiel.

Weichkäse- und Salatproben

VTEC konnten in keiner der im Labor 1 und 2 mit der einfachen PCR untersuchten 81 Weichkäse- und 77 Salatproben aus dem Handel nachgewiesen werden.

Rohmilch

In sieben von 100 (7%) im Labor 2 analysierten Rohmilchproben liessen sich mit der einfachen PCR VTEC nachweisen. Dabei handelte es sich um vier von 42 (9,5%) aus dem Detailhandel, um eine von acht (12,5%) direkt beim Produzenten erhobenen Proben und um zwei von 50 (4%) Proben einer Milchannahmestelle. Eine Probe enthielt Keime, die sowohl das VT1- als auch das VT2-Gen aufwiesen. Bei zwei Proben wurden das VT2-Gen und bei vier Proben das VT1-Gen beherbergende Keime gefunden. Das NENT bestätigte mit Ausnahme von zwei Proben die molekularbiologischen Befunde und identifizierte die Stämme als *E. coli* non-O157. Der VT-Nachweis mittels ELISA fiel bei zwei der sieben isolierten Stämme positiv aus.

In den 10 mit Hilfe der nested PCR im Labor 3 untersuchten Rohmilchproben aus dem Handel konnten keine VTEC nachgewiesen werden.

Trinkwasser

In keinem der aus acht untersuchten Trinkwasserproben isolierten *E. coli*-Stämme konnten das VT1- bzw. VT2-Gen nachgewiesen werden.

Diskussion

Die Tatsache, dass in den letzten Jahren immer häufiger VTEC anderer Serotypen als O157 im Zusammenhang mit Epidemien, sporadischen HUS-Fällen und akuter Gastroenteritis isoliert wurden, zeigt, dass VTEC vieler Serotypen wichtige enterische Pathogene sind (12). Nachdem *E. coli* O157:H7, der vor allem in den USA und England dominierende Serotyp (20–22), eine Sonderrolle unter den

VTEC einnimmt, ist auch die Diagnostik mehrheitlich auf diesen Keim ausgerichtet (8, 9). In der Schweiz dagegen spielt dieser Serotyp eine untergeordnete Rolle. Daher sind zur Erkennung der VTEC aller Serogruppen serogruppenspezifische Tests nur bedingt geeignet. Es muss mit Methoden gearbeitet werden, die auf Merkmale zielen, welche allen VTEC eigen sind. Hierzu bietet sich der genotypische Nachweis der DNA-Sequenzen, welche die Information für die VT-Bildung tragen, mittels PCR bzw. DNA-Hybridisierung an oder aber der phänotypische Nachweis der VT mittels Zellkulturverfahren bzw. immunologischer Tests. Gegenüber der Zellkulturmethode birgt die PCR den Vorteil, dass sie auch für Routine-labors geeignet ist. Die PCR-Methodik ist einfach und bietet sich auch für die Durchführung grösserer Untersuchungszahlen an. Der Nachweis der gesuchten VTEC ist sowohl ausgehend von einer Reinkultur als auch von einer Mischkultur möglich. Im Gegensatz zu immunologischen Testverfahren erlaubt die PCR zudem eine Toxintypisierung.

Da die in den eigenen Untersuchungen verwendeten PCR-Methoden bisher nur im Zusammenhang mit der Analyse von Fleischproben auf VTEC beschrieben worden waren (17, 23), wurde in den jeweiligen Labors im Rahmen von Vorversuchen die Anwendbarkeit beider PCR-Systeme auch für die Untersuchung von verschiedenen anderen Lebensmitteln überprüft (Daten nicht gezeigt). In Anbetracht der Tatsache, dass bei VTEC, zumindest beim Serotyp O157, die Infektionsdosis sehr niedrig ist (16) und VTEC auch in geringen Konzentrationen in Lebensmitteln mit einem hohen Anteil an Begleitflora vorkommen können, wurde zur Erhöhung der Isolierungsrate dem eigentlichen Nachweis dieser Erreger mittels PCR eine Anreicherung der Keime im Lebensmittel vorausgeschickt. In verschiedenen Publikationen wurde dazu der Einsatz von mTSB mit Novobiocinzusatz oder MCB empfohlen (6, 24, 25). Die bei den in Labor 1 und 2 durchgeführten Untersuchungen von verschiedenen künstlich kontaminierten Lebensmitteln nach Anreicherung in mTSB mit Novobiocinzusatz für 6 h bei 42 °C erzielten Resultate konnten als befriedigend beurteilt werden und deckten sich gut mit denen von Bolton et al. (24, 26). Diese konnten zeigen, dass für mit *E. coli* O157 künstlich kontaminierte Fleischprodukte die besten Ergebnisse mit mTSB mit Novobiocinzusatz bei 42 °C erzielt wurden. Wie bei der Untersuchung von künstlich kontaminierten Fleischproben zeigte auch die in Labor 1 und 2 durchgeführte Analyse von künstlich kontaminiertem Weichkäse, dass unabhängig vom inokulierten VTEC-Serotyp zum Teil nur wenige Zellen in 25 g Lebensmittel genügte, um nach beschriebener Anreicherung ein positives Signal in der PCR zu erhalten. Das Vorgehen erwies sich für die Untersuchung von Milch unabhängig vom inokulierten VTEC-Serotyp ebenfalls als sehr gut – es wurden stets weniger als 10 Keime in 25 ml Probe nachgewiesen – während im Fall von vorgeschnittenem Salat zum Teil einige hundert Zellen notwendig waren, um nach erfolgter Anreicherung ein positives Signal in der PCR zu erhalten.

Der Vorteil einer 6stündigen Inkubation der Anreicherungsbouillon, wie sie in Labor 1 und 2 durchgeführt wurde, liegt in einem Zeitgewinn von einem Tag. Nachteilig erweist sich jedoch, dass Proben, die im Lauf des Nachmittags angeliefert werden, aus labortechnischen Gründen nicht mehr angesetzt werden können.

In Kombination mit der nested PCR wurden daher im Labor 3 im Rahmen von Vorversuchen verschiedene Anreicherungsmedien (mTSB mit Novobiocinzusatz, MCB) und Inkubationsbedingungen (6 h, 24 h, 37 °C, 42 °C) miteinander verglichen. Dabei erwies sich für die Untersuchung künstlich kontaminierter Fleischproben eine Anreicherung in MCB bei 42 °C während 24 h, für die Analyse von künstlich kontaminiertem Weichkäse eine Anreicherung in mTSB mit Novobiocinzusatz ebenfalls bei 42 °C während 24 h am besten. Mit beiden Methoden reichten unabhängig vom inokulierten VTEC-Serotyp wenige Zellen in 25 g Probe aus, um ein positives Signal in der nachfolgenden PCR zu erhalten. So soll sich MCB insbesondere bei Produkten mit vorwiegend grampositiver Begleitflora, wie Hackfleisch, als effizient erwiesen haben (27).

In der Literatur wurde mehrfach beschrieben, dass VTEC bei 43 °C und 44 °C nicht mehr wachstumsfähig sind (4, 25, 28). Sowohl die Resultate von *Bolton et al.* (24, 26) und *Willshaw et al.* (29) als auch unsere eigenen Ergebnisse können dies nicht bestätigen. Alle eingesetzten Teststämme zeigten nicht nur bei 42 °C gutes Wachstum, sondern auch bei der Inkubation auf ECD-MUG-Platten bei 44 °C. Auch wenn die Generationszeit der VTEC bei 42 °C 0,64 h beträgt im Gegensatz zu 0,49 h bei 37 °C, liegt der Vorteil einer höheren Bebrütungstemperatur bei der selektiven Hemmung der Begleitkeime (24). Bei 37 °C muss stets ein stärkeres Fremdkeimwachstum in Kauf genommen werden. Dies könnte dazu führen, dass die gesuchten VTEC durch andere Keime, z. B. *Enterobacteriaceae*, in ihrem Wachstum unterdrückt, gehemmt oder überwachsen werden und somit die für einen positiven Befund notwendige VTEC-Konzentration nicht erreicht werden kann.

Mit beiden PCR-Systemen wurden schnelle, spezifische, spezies- und serotyp-unabhängige Nachweismethoden verwendet, die zwar eine molekularbiologische Grundausrüstung und gut geschultes Laborpersonal verlangen, die jedoch nach der Etablierung einfach durchzuführen sind. Beide PCR-Methoden eignen sich für die Anwendung im Routinelabor. So ist der PCR-Kit von IMD, bedingt durch die bereits gebrauchsfertigen Röhrchen mit Mastermix sehr routinefreundlich und standardisiert, was im Hinblick auf die Qualitätssicherung eines Routinelabors von Bedeutung ist. Die nested PCR wiederum zeichnet sich durch eine höhere Sensitivität und Spezifität aus, kann doch mittels zweiter Amplifikation die Gegenbestätigung des ersten Amplifikats erbracht werden. Eine weitere Identifizierung der entstandenen PCR-Produkte mittels Hybridisierung mit einer markierten Sonde oder einer Restriktionsenzymverdauung ist nicht mehr notwendig.

Mit den beiden PCR-Methoden wurden insgesamt 847 verschiedene natürlich kontaminierte Lebensmittel untersucht. Dabei handelte es sich um 296 genussfertige und 551 nicht genussfertige Produkte. Während aus keinem der genussfertigen Lebensmittel VTEC isoliert werden konnten, darunter auch 39 Tatarproben, ließen sich diese Erreger aus 18 (3,3%) der nicht genussfertigen Proben isolieren. Dabei handelte es sich um *E. coli* non-O157, wobei der Nachweis sowohl in rohen Fleisch- als auch in Rohmilchproben gelang. Untersuchungen der staatlichen Untersuchungsämter in Deutschland zeigten ähnliche Ergebnisse. Aus über 4500 verschiedenen Lebensmittelproben konnten nur viermal (0,09%) VTEC isoliert

werden. *E. coli* O157:H7 waren keine nachweisbar. Auch hier gelang der Nachweis lediglich in nicht genussfertigen Milch- und Fleischproben (30). In sieben von 416 (1,7%) in der vorliegenden Studie untersuchten nicht genussfertigen Hackfleischprodukten konnten *E. coli* non-O157 festgestellt werden, wobei mit beiden Methoden unabhängig voneinander ähnliche Nachweisraten gefunden wurden. Wesentlich höhere Nachweisraten von 15–40% für VTEC in Fleischprodukten vom Rind werden aus den USA, Kanada und Grossbritannien berichtet (10, 29). Tatsächlich konnte auch bei der Untersuchung von aus Südamerika importiertem rohem Rindfleisch eine wesentlich höhere Nachweishäufigkeit von 16% aufgezeigt werden. Es ist jedoch schwierig, die von den einzelnen Autoren gewonnenen Resultate miteinander zu vergleichen, da unterschiedliche Isolierungstechniken und Nachweismethoden angewandt wurden. Untersuchungen aus Kontinentaleuropa zeigen, dass VTEC weniger häufig gefunden werden. So konnten bei Untersuchungen in Belgien in 1,8% der untersuchten Rindfleischproben VTEC nachgewiesen werden, in keinem Fall jedoch *E. coli* O157 (10). Baumgartner und Grand (17) wiesen bei in der Schweiz durchgeführten Untersuchungen in 6,8% der Rindfleischproben VTEC mittels PCR, jedoch ohne vorausgegangener Anreicherung nach. Je nach untersuchter Produktgruppe lag die Nachweisrate zwischen 2–20%. Auf der anderen Seite konnten Hewvelink et al. (31) in 16% der mit PCR untersuchten Anreicherungskulturen von verschiedenen rohen Fleischprodukten VTEC nachweisen. Wie bei den in den eigenen Untersuchungen isolierten Stämmen zeigten auch sie, dass trotz Anwesenheit der VT-Gene nicht alle Isolate auch Toxine bildeten.

Der Nachweis von VTEC gelang ebenfalls in sieben der 110 (6,4%) untersuchten Rohmilchproben. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Untersuchungen in Deutschland. Dort wurden aus vier von 50 Rohmilchproben (8%) bzw. einer von 38 Rohmilchproben (2,6%) VTEC isoliert (32). Auch Kuntze et al. (33) gelang in zwei von 245 (0,8%) Rohmilchuntersuchungen der Nachweis von *E. coli* O157, nicht jedoch der VT. Ebenso wurden in einer von 110 (0,9%) Proben Vorzugsmilch VTEC gefunden (32).

In keiner der 81 untersuchten Weichkäse- und 77 Salatproben konnten VTEC nachgewiesen werden. Die Befunde für VTEC in Weichkäse stimmen dabei mit den Resultaten von Untersuchungen aus anderen Ländern weitestgehend überein. Sowohl bei einer in Deutschland durchgeführten Untersuchung von 15 Proben Rohmilchkäse, darunter auch Weichkäse, als auch bei der Untersuchung von 50 Rohmilchweichkäsen konnten bei keiner der Proben VTEC gefunden werden (33). Auch Knappstein et al. (34) wiesen bei der Analyse von 156 Proben Weichkäse aus Rohmilch und 96 Weichkäsen aus pasteurisierter Milch in keiner Probe VTEC nach. Bei einer in Italien durchgeführten Untersuchung von 397 italienischen Weichkäsen konnten ebenfalls keine VTEC isoliert werden (35).

Die vorliegenden Untersuchungen an Proben aus der Nordwestschweiz zeigen, dass zurzeit das Vorkommen von VTEC in nicht genussfertigen Fleisch- und Milchprodukten als seltener Befund gewertet werden muss. Aus genussfertigen Lebensmitteln liessen sich keine VTEC nachweisen. Eine besondere Erwähnung verdient dabei der Tatar, gilt doch rohes Rindfleisch mit als Hauptinfektionsquelle

(4–7). Aufgrund der geringen Probenzahl lässt sich jedoch das von diesem Produkt ausgehende Risiko nicht abschliessend beurteilen.

Trotz der geringen Nachweisrate bei den nicht genussfertigen Lebensmitteln sind Erkrankungen durch sie nicht auszuschliessen, wie die verschiedenen Ausbrüche in den USA und in England zeigen (5, 7, 21). Da eine vollständige Elimination von VTEC aus Rinderbeständen nie möglich sein wird und daher bei rohen Lebensmitteln tierischer Herkunft stets davon ausgegangen werden muss, dass sie mit unerwünschten Mikroorganismen kontaminiert sind, kommt den Massnahmen zur Vermeidung von VTEC-Infektionen besondere Bedeutung zu. Hierzu zählen insbesondere küchentechnische Massnahmen wie die Vermeidung von Kreuzkontaminationen und eine ausreichende Erhitzung der Lebensmittel.

Dank

Wir danken Dr. A. Burnens (NENT) für die Bestätigungen der Verdachtsisolate mit molekularbiologischen und immunologischen Methoden, der Firma IMD AG für die zur Verfügungstellung der Kontrollstämme sowie dem Institut für Biochemie, Universität Bern, für die zur Verfügungstellung des nested PCR-Protokolls. Den Laborantinnen und Laboranten D. Kohler, C. Iff, R. Rathgeb, J. Grimbichler, S. Wullschleger und S. Staub sei für den motivierten Einsatz gedankt.

Zusammenfassung

Um Aufschluss über das Vorkommen von VTEC in Lebensmitteln in der Nordwestschweiz zu erhalten, wurden im Zeitraum von 1995 bis 1998 in den drei Kantonalen Laboratorien Basel-Landschaft, Basel-Stadt und Solothurn insgesamt 296 genussfertige und 551 nicht genussfertige Lebensmittel auf das Vorhandensein von VTEC mittels eines kommerziell erhältlichen PCR-Kits und einer nested PCR untersucht. In sieben von 416 (1,7%) nicht genussfertigen rohen Hackfleischprodukten, in vier von 25 (16%) rohen Rindfleischproben am Stück, sowie in sieben von 110 (6,4%) Rohmilchproben konnten VTEC festgestellt werden. Nicht nachweisbar waren VTEC in 39 Tatarproben, in 91 Rohwurstwaren, in 81 Weichkäsen, in 77 Proben vorgeschnittenem Salat und in acht Trinkwasserproben. Bei allen 18 VTEC-Isolaten handelte es sich um *E. coli* non-O157.

Résumé

L'objectif de la présente étude était de déterminer la présence de VTEC dans les denrées alimentaires dans le nord-ouest de la Suisse. A cet effet, entre 1995 et 1998 dans les trois laboratoires cantonaux de Bâle-Campagne, Bâle-Ville et Soleure la présence de VTEC a été recherchée dans 296 aliments prêts à la consommation et 551 aliments non prêts à la consommation à l'aide de deux techniques PCR, soit un test commercialisé ainsi qu'une nested PCR. Des VTEC ont été détectés dans sept des 416 (1,7%) produits à base de viande hachée crue non prêts à la consommation, dans quatre des 25 (16%) échantillons de viande de bœuf crue, ainsi que dans sept des 110 (6,4%) échantillons de lait cru. Des VTEC n'ont pas été détectés dans les 39 échantillons de tartar, les 91 produits de charcuterie crus, les 81

fromages à pâte molle, les 77 salades pré-coupées et dans les huit échantillons d'eau de boisson. Dans les 18 souches isolées de VTEC, il s'agissait de *E. coli* non-O157.

Summary

To assess the occurrence of VTEC in foodstuffs in the north-western part of Switzerland a total of 296 ready-to-eat and 551 not-ready-to-eat food samples were analysed between 1995 and 1998 by three laboratories of the Canton Basel-Landschaft, Basel-Stadt and Solothurn for the presence of VTEC using a commercially available PCR-Kit and a nested PCR. VTEC were detected in seven out of 416 (1,7%) raw, not-ready-to-eat minced meat products, in four out of 25 (16%) samples of raw beef pieces as well as in seven out of 110 (6,4%) raw milk samples. However, no VTEC were detectable in 39 samples of tatar, in 91 raw meat sausages, in 81 samples of soft cheese, in 77 pre-cutted salads and in eight samples of drinking water. All 18 VTEC-isolates were *E. coli* non-O157.

Literatur

1. Burnens, A., Zbinden, R., Kaempf, L., Heinzer, I. and Nicolet, J.: A case of laboratory acquired infection with *Escherichia coli* O157:H7. Zbl. Bakt. **279**, 512–517 (1993).
2. Burnens, A., Frey, A., Lior, H. and Nicolet, J.: Prevalence and clinical significance of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) isolated from cattle in herds with and without calf diarrhoea. J. Vet. Med. **42**, 311–318 (1995).
3. Hancocket, D.D., Besser, T.E., Kinsel, M.L., Tarr, P.I., Rice, D.H. and Paros, M.G.: The prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 in dairy and beef cattle in Washington State. Epidemiol. Infect. **113**, 199–207 (1994).
4. Doyle, M.: *Escherichia coli* O157:H7 and its significance in foods. Int. J. Food Microbiol. **12**, 289–302 (1991).
5. 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., Baron, R. and Kobayashi, J.: A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 – associated bloody diarrhea and hemolytic uremic syndrome from hamburgers. JAMA **272**, 1349–1353 (1994).
6. Acheson, D.W.K., Lincicome, L.L., De Breucker, S. and Keusch, G.T.: Detection of shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* in ground beef and milk by commercial enzym immunoassay. J. Food Prot. **59** (4), 344–349 (1996).
7. Rodrigue, D.C., Mast, E.E., Greene, K.D., Davis, J.P., Hutchinson, M.A., Wells, J.G., Barrett, T.J. and Griffin, P.M.: A university outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with roast beef and an unusually benign clinical course. J. Infect. Dis. **172**, 1122–1125 (1995).
8. Beutin, A., Gleier, K., Zimmermann, S. und Geier, D.: Zur Identifizierung von Verotoxin-bildenden (VTEC) und enterohämorrhagischen *E. coli* (EHEC) auf Indikatornährböden. Klin. Lab. **40**, 193–201 (1994).
9. Bitzan, M., Ludwig, K., Klmet, M., König, H., Büren, J. and Müller-Wiefel, D.E.: The role of *Escherichia coli* O157 infections in the classical (enteropathic) haemolytic uraemic syndrome: Results of a Central European, multicentre study. Epidemiol. Infect. **110**, 183–196 (1993).

10. Johnson, R.P., Clarke, R.C., Wilson, J.B., Read, S.C., Rahn, K., Renwick, S.A., Sandhu, K.A., Alves, D., Karmali, M.A., Lior, H., McEwen, S.A., Spika, J.S. and Gyles, C.L.: Growing concerns and recent outbreaks involving non-O157:H7 serotypes of verotoxigenic *Escherichia coli*. J. Food Prot. **59** (10), 1112–1122 (1996).
11. Lüscher, D., Graf-Settab, S. und Altwegg, M.: Bakterielle Durchfallerreger: Nachweis von Verotoxin-produzierenden *Escherichia coli* mittels Polymerase-Kettenreaktion. Schweiz. Med. Wschr. **122**, 1911–1918 (1992).
12. Bülte, M. und Heckötter, S.: Vorkommen und Bedeutung von O157 und anderen verotoxinbildenden *E. coli* bei Tieren und in Lebensmitteln. Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. **88**, 665–680 (1997).
13. Hassink, R.I., Truttmann, A.C., Essers, B. und Bianchetti, M.G.: Erkrankungen durch verotoxinbildende *Escherichia coli* beim Menschen. Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. **88**, 650–657 (1997).
14. Tschäpe, H., Prager, R., Strecker, W., Fruth, A., Tietze, E. and Böhme, G.: Verotoxinogenic *Citrobacter freundii* associated with severe gastroenteritis and cases of haemolytic uraemic syndrome in a nursery school: green butter as the infection source. Epidemiol. Infect. **114**, 441–450 (1995).
15. Morgan, D., Newman, C.P., Hutchinson, D.N., Walker, A.M., Rowe, B. and Majid, F.: Verotoxin producing *Escherichia coli* O157 infections associated with the consumption of yoghurt. Epidemiol. Infect. **111**, 181–187 (1993).
16. Vernozy-Rozand, C. et Ray-Gueniot, S.: *Escherichia coli* O157:H7. Etude clinique, pathogénique, épidémiologique et prévention des accidents alimentaires. Revue Méd. Vét. **148** (2), 89–98 (1997).
17. Baumgartner, A. and Grand, M.: Detection of verotoxin-producing *Escherichia coli* in minced beef and raw hamburgers: comparison of polymerase chain reaction (PCR) and immunomagnetic beads. Arch. Lebensmittelhyg. **46**, 125–148 (1995).
18. Bundesamt für Gesundheit: Schweizerisches Lebensmittelbuch, Band V, 5. Aufl., Kapitel 56 «Mikrobiologie». Eidg. Drucksachen- und Materialzentrale, Bern 1988.
19. Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T.: Molecular cloning: a laboratory manual, second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York 1989.
20. Tarr, P.I.: *Escherichia coli* O157:H7: Overview of clinical and epidemiological issues. J. Food Prot. **57**, 632–636 (1994).
21. Wall, P.G., McDonnell, R.J., Adak, G.K., Cheasty, T., Smith, H.R. and Rowe, B.: General outbreak of verocytotoxin producing *Escherichia coli* O157 in England and Wales from 1992–1994. CDR **6**, R26–R33 (1996).
22. Willshaw, G.A., Thirlwell, J., Jones, A.P., Parry, S., Salmon, R.L. and Hickey, M.: Verotoxin producing *Escherichia coli* O157 in beefburgers linked to an outbreak of diarrhea, haemorrhagic colitis and haemolytic uraemic syndrome in Britain. Lett. Appl. Microbiol. **19**, 304–307 (1994).
23. Gilgen, M., Hübner, Ph., Höfelein, C., Lüthy, J. and Candrian, U.: PCR-based detection of verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) in ground beef. (Submitted for publication in Research in Microbiology).
24. Bolton, E.J., Crozier, L. and Williamson, J.K.: New technical approaches to *Escherichia coli* O157. PHLS Microbiology Digest **12**, 67–70 (1995).
25. Richter, H.: Vorläufiges Verfahren zum qualitativen Nachweis von Verotoxin-bildenden *Escherichia coli* (VTEC) in Milch. Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (1996).

26. Bolton, F.J., Crozier, L. and Williamson, J.K.: Isolation of *Escherichia coli* O157 from raw meat products. Lett. Appl. Microbiol. **23**, 317–321 (1996).
27. Jäggi, N. und Diezi, M.: Verfahren zum Nachweis verotoxinbildender *Escherichia coli* (VTEC) in Milch und Weichkäse. Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. **88**, 335–344 (1997).
28. Chapman, P.A.: Verocytotoxin-producing *Escherichia coli*: an overview with emphasis on the epidemiology and prospects for control of *E. coli* O157. Food Control **6**, 187–193 (1995).
29. Willshaw, G.A., Smith, H.R., Roberts, D., Thirwell, J., Cheasty, T. and Rowe, B.: Examination of raw beef products for the presence of Verocytotoxin producing *Escherichia coli*, particularly those of serogroup O157. J. Appl. Bacteriol. **75**, 420–426 (1993).
30. Hygieneproblem EHEC. Ernährungsinformation der CMA. Der Lebensmittelbrief **3/4**, 53–54 (1998).
31. Heuvelink, A.E., Wemars, K. and DeBoer, E.: Occurrence of *Escherichia coli* O157 and other verocytotoxin-producing *E. coli* in retail raw meats in the Netherlands. J. Food Prot. **59**, 1267–1272 (1996).
32. Bockemühl, J. und Karch, H.: Zur aktuellen Bedeutung der enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC) in Deutschland (1994–1995). Bundesgesundhbl. **8**, 290–296 (1996).
33. Kuntze, U., Becker, H., Märtlbauer, E., Baumann, C. und Burow, H.: Nachweis von verotoxinbildenden *E. coli*-Stämmen in Rohmilch und Rohmilchkäse. Arch. Lebensmittelhyg. **47**, 141–144 (1996).
34. Knappstein, K., Hahn, G. und Heeschen, W.: Untersuchungen zum Vorkommen von Verotoxin-bildenden *Escherichia coli* (VTEC) in Weichkäse. Arch. Lebensmittelhyg. **47**, 59–62 (1996).
35. Aureli, P., Costantini, A., Fenicia, L., Gianfranceschi, M. and Rainaldi, L.: Occurrence of pathogenic *Escherichia coli* in available italian soft cheeses. Arch. Lebensmittelhyg. **43**, 17–19 (1992).

Dr. Paul Svoboda
 Kantonales Laboratorium
 Basel-Landschaft
 Postfach
 CH-4414 Füllinsdorf