

**Charakterisierung der Säureresistenz von  
verotoxinbildenden *Escherichia coli* (VTEC) und ihre  
Bedeutung bei der Herstellung von  
Sauermilcherzeugnissen**

Master of Public Health  
Chi-Yeun Cheung

Fakultät III – Prozesswissenschaften  
der Technischen Universität Berlin

Die Arbeit wurde im Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) angefertigt.

Berlin 2003  
D83

**Charakterisierung der Säureresistenz von verotoxinbildenden  
*Escherichia coli* (VTEC) und ihre Bedeutung bei der  
Herstellung von Sauermilcherzeugnissen**

vorgelegt von  
Master of Public Health  
Chi-Yeun Cheung  
aus Kangnung, Südkorea

von der Fakultät III – Prozesswissenschaften  
der Technischen Universität Berlin  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Naturwissenschaften  
- Dr. rer. nat. -

genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr. -Ing. Ulf Stahl

Gutachter: Prof. Dr. -Ing. Dietrich Knorr

Gutachterin: Dr. vet. med. Edda Bartelt (BfR)

Tag der wissenschaftliche Aussprache: 16. 12. 2003

Berlin 2003

D 83

## **EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG**

Hiermit erkläre ich, Chi-Yeun Cheung, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und nur unter Zuhilfenahme der angegebenen Quellen und Mittel verfasst habe.

**FÜR MEINE FAMILIE**

<b>1. EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>2. LITERATURÜBERSICHT .....</b>	<b>4</b>
<b>2.1 LEBENSMITTELINFEKTIONEN .....</b>	<b>4</b>
2.1.1. Inzidenz der Lebensmittelinfektionen .....	4
2.1.2. Neu auftkommende Pathogene.....	6
2.1.3. Mikrobielle Stressantwort.....	7
<b>2.2. VEROTOXINBILDENDE ESCHERICHIA COLI .....</b>	<b>10</b>
2.2.1. Definition und Erkrankungssymptome .....	10
2.2.2. Inzidenz und Epidemiologie.....	11
2.2.3. Virulenzfaktoren .....	12
2.2.4. Säureresistenz .....	14
<b>2.3. SAUERMILCHERZEUGNISSE.....</b>	<b>15</b>
2.3.1. Herkunft und Bedeutung .....	15
2.3.2. Starterkulturen .....	17
2.3.3. Herstellung der Sauermilcherzeugnisse.....	18
<b>3. MATERIAL UND METHODE.....</b>	<b>21</b>
<b>3.1. CHARAKTERISIERUNG DER VTEC-STÄMME.....</b>	<b>21</b>
3.1.1. Teststämme.....	21
3.1.2. Bestimmung der Säureresistenz .....	24
3.1.2.1. Gewinnung des Inokulums.....	24
3.1.2.2. Säuretest.....	24
3.1.2.3. Bestimmung der Säureresistenzantwort.....	26
3.1.3. Bestimmung der Zytotoxizität .....	26
3.1.3.1. Gewinnung von Toxinen.....	26
3.1.3.2. Kultivierung von Verozelllinien.....	26
3.1.3.3. MTT-Zytotoxizitätstest.....	27
3.1.3.4. Bestimmung der Zytotoxizität .....	29
3.1.4. Statistik .....	29

<b>3.2. UNTERSUCHUNGEN ZUM VERHALTEN VON VTEC-STÄMMEN IN SAUERMILCHERZEUGNISSEN .....</b>	<b>32</b>
3.2.1. Teststämme und Starterkulturen .....	32
3.2.2. Herstellung von Sauermilcherzeugnissen aus der mit VTEC kontaminierten Milch .....	32
3.2.3. Kontamination von Sauermilcherzeugnissen mit VTEC nach der Fermentation .....	35
3.2.4. Physikalische und chemische Untersuchungen .....	36
3.2.5. Mikrobiologische Untersuchungen .....	36
3.2.5.1. Quantitativer und qualitativer Nachweis von VTEC .....	36
3.2.5.2. Quantitativer Nachweis von Milchsäurebakterien .....	38
3.2.6. Datenbearbeitung.....	40
3.2.6.1. Bearbeitung der Keimzahlen .....	40
3.2.6.2. Erstellung von neuen Variablen .....	40
3.2.6.3. Statistische Auswertung.....	41
<b>4. ERGEBNISSE .....</b>	<b>42</b>
<b>4.1. CHARAKTERISIERUNG VON VTEC-STÄMMEN DURCH BESTIMMUNG DER SÄURERESISTENZ UND DER ZYTOTOXIZITÄT .....</b>	<b>42</b>
4.1.1. Säureresistenz .....	42
4.1.1.1. Prüfung auf drei Säureresistenzsysteme.....	42
4.1.1.2. Bestimmung der Säureresistenzantwort von <i>E.coli</i> .....	44
4.1.1.3. Beziehung zwischen Verotoxinbildungsvermögen und Säureresistenz .....	49
4.1.2. Zytotoxizität .....	50
4.1.2.1. Effekt von Verotoxin auf Verozellen.....	50
4.1.2.2. Bestimmung der Zytotoxizität von VTEC-Stämmen.....	50
4.1.3. Zusammenhang zwischen verschiedenen Eigenschaften der VTEC-Stämme .....	55
4.1.3.1. Verhältnis der Säureresistenzantwort zur Zytotoxizität .....	55
4.1.3.2. Vergleich der Eigenschaften nach Bildung von Untergruppen.....	56

4.1.3.3. Modell für die Schätzung der Erkrankungswahrscheinlichkeit durch einen VTEC.....	59
<b>4.2. HERSTELLUNG UND LAGERUNG VON MIT VTEC-STÄMMEN KONTAMINIERTEN SAUERMILCHERZEUGNISSEN .....</b>	<b>63</b>
4.2.1. Herstellung und Lagerung von Sauermilcherzeugnissen aus VTEC-kontaminierter Milch mit hohem Kontaminationsniveau .....	63
4.2.1.1. Gesamtuntersuchungsergebnisse von Joghurtherzeugnissen mit thermophilen Starterkulturen.....	63
4.2.1.1.1. <i>Klassischer Joghurt</i> .....	63
4.2.1.1.2. <i>Joghurt mild</i> .....	65
4.2.1.1.3. <i>Probiotischer Joghurt</i> .....	68
4.2.1.2. Technologische Parameter in Joghurtherzeugnissen.....	70
4.2.1.2.1. <i>Milchsäuregehalt</i> .....	70
4.2.1.2.2. <i>Säuerungsparameter</i> .....	72
4.2.1.3. Verhalten von VTEC .....	73
4.2.1.3.1. <i>Einfluss des Säureverhaltens der VTEC-Stämme auf ihr Verhalten in Joghurtherzeugnissen</i> .....	73
4.2.1.3.2. <i>Einfluss des Produkttyps auf das Verhalten von VTEC</i> .....	74
4.2.1.3.3. <i>Analyse des Einflusses der verschiedenen Parameter auf die Überlebensrate von VTEC in Joghurtherzeugnissen</i> .....	75
4.2.1.4. Sauermilch mit mesophiler Starterkultur.....	76
4.2.1.4.1. <i>Gesamtergebnisse der Sauermilchversuche</i> .....	76
4.2.1.4.2. <i>Einfluss des Starterkulturtyps auf die Säuerungsparameter und das Verhalten der VTEC-Stämme</i> .....	78
4.2.2. Herstellung und Lagerung von Sauermilcherzeugnissen mit niedrigem Kontaminationsniveau von VTEC kontaminierter Milch.....	80
4.2.2.1. Verhalten der VTEC .....	80
4.2.2.2. Einfluss des Kontaminationsniveaus auf die Überlebensfähigkeit von VTEC .....	80
4.2.3. Verhalten der VTEC in postfermentativ kontaminierten Joghurtherzeugnissen.....	81
4.2.3.1. Einfluss der Wachstumsphase des VTEC-Stammes auf das Verhalten zum Zeitpunkt der Kontamination .....	81

4.2.3.2. Einfluss des Kontaminationszeitpunktes auf das Verhalten der VTEC während der Lagerung.....	82
<b>5. DISKUSSION.....</b>	<b>84</b>
<b>5.1. CHARAKTERISIERUNG VON VTEC-STÄMMEN DURCH BESTIMMUNG DER SÄURERESISTENZ UND ZYTOTOXIZITÄT .....</b>	<b>84</b>
5.1.1. Säureresistenz.....	84
5.1.2. Zytotoxizität .....	89
5.1.3. Zusammenhang zwischen verschiedenen Eigenschaften der VTEC und Schätzung der Erkrankungswahrscheinlichkeit.....	90
<b>5.2. HERSTELLUNG UND LAGERUNG VON MIT VTEC-STÄMMEN KONTAMINIERTEN SAUERMILCHERZEUGNISSEN .....</b>	<b>96</b>
5.2.1. Herstellung und Lagerung von Sauermilcherzeugnissen aus VTEC-kontaminierter Milch mit hohem Kontaminationsniveau .....	96
5.2.2. Verhalten der VTEC in postfermentativ kontaminierten Joghurtherzeugnissen.....	102
<b>6. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>105</b>
<b>7. SUMMARY .....</b>	<b>106</b>
<b>8. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>107</b>

A. bidest.	<i>Aqua bidestillata</i>
Abb.	Abbildung
ATCC	American Type Culture Collection
CD <sub>50</sub>	zytotoxische Dosis 50%
D(-)-	linksdrehende
DNA	Desoxyribonucleinsäure
D-Wert	Dezimalreduktionszeit
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>eae</i>	<i>E. coli</i> attaching and effacing -Gen
EG	Minimales Glukose E-Medium
et al	<i>et alii</i>
HC	Hämorrhagische Colitis
<i>hly</i>	EHEC-Hämolysin-Gen
HUS	Hämolytisch urämisches Syndrom
KbE	Koloniebildende Einheit
L(+)-	rechtsdrehende
LB	Luria- Bertani-Medium
MES	2-(N-Morpholino)-Ethansulfonsäure
MTT	3-(4,5-Dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrazoliumbromid
OD	optische Dichte
PBS	phosphate buffered saline (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
pHir	induzierbar säureresistent
pHr	inhärent säureresistent
pHs	Säuresensibel
RpoS	Sigma S subunit of RNA polymerase
<i>rpoS</i>	Sigma S subunit of RNA polymerase-Gen
S.E.	Standardfehler
VT	Verotoxin
VTEC	Verotoxinbildende <i>E.coli</i>

# 1 EINLEITUNG

Obwohl intensive Maßnahmen zur Vorbeugung und Kontrolle der mikrobiellen Kontamination von Lebensmitteln, insbesondere mit pathogenen Erregern ergriffen werden, geht die Zahl der humanen Lebensmittelinfektionen nicht zurück. Eine Erklärung für dieses Phänomen könnte sein, dass die Bakterien vermehrt widerstandsfähiger gegen Stressbedingungen einschließlich der mikrobiologischen Hürden in der Lebensmittelverarbeitung werden. Aktuelle molekulare und physiologische Forschungsarbeiten belegen, dass viele pathogene Bakterien in der Lage sind, sich an sub-letale Stressbedingungen zu adaptieren und dabei gleichzeitig im Rahmen der Ausbildung von Stressantwort-Mechanismen ihre Virulenz zu erhöhen (Rowan, 1999). Eine der die Erreger am häufigsten störenden Bedingungen sind saure pH-Werte. Eine gesteigerte Säureresistenz der Erreger als Gegenreaktion würde sowohl die Überlebensrate von Infektionserregern während der Magen-Darmpassage erhöhen und somit ihre minimale Infektionsdosis vermindern, als auch ihre Überlebensfähigkeit in sauren Lebensmitteln, wie z.B. Sauermilcherzeugnissen, verbessern (Gorden et al., 1993).

Als Teil der physiologischen Darmflora beim gesunden Menschen spielt *Escherichia coli* eine wesentliche Rolle beim Inplationsantagonismus im Verdauungstrakt. Daneben haben sich jedoch auch pathogene *E.coli*-Gruppen, die verotoxinbildende *Escherichia coli* (VTEC) entwickelt. 1982 sind VTEC-Stämme erstmalig als Lebensmittelinfektionserreger in Erscheinung getreten, die Infektion erfolgte in diesem ersten beschriebenen Fall durch den Verzehr von nicht ausreichend erhitzten Fleischerzeugnissen („Hamburger“). VTEC können schwere Darmentzündungen beim Menschen auslösen, die von heftigem Durchfall über eine hämorrhagische Colitis (HC) bis hin zu teilweise tödlichen Komplikationen, wie dem hämolytisch-urämischem Syndrom (HUS) führen können (Paton und Paton, 1989). Neben dem Verotoxinbildungsvermögen, der Anhaftungsfähigkeit an die Mucosa des Darms und der

Ausstattung mit dem EHEC-Hämolsin zählt auch eine ausgeprägte Säureresistenz zu den Virulenzfaktoren bei VTEC.

Rinder sind das Hauptreservoir von VTEC-Stämmen. Rohmilch und nicht-pasteurisierte Milchprodukte gehören zu den wichtigen Vektoren der VTEC-Infektionen des Menschen. Alle Bestandteile, die für die Herstellung von Sauermilcherzeugnissen eingesetzt werden, müssen nach dem deutschen Lebensmittelrecht pasteurisiert werden. Trotzdem muss man im Rahmen der Risikoanalyse davon ausgehen, dass eine Rekontamination von pasteurisierter Milch vorkommen kann, z.B. in Folge minimaler Läsionen in der Pasteurisierungsanlage oder im Verlauf des Abpackstadiums. Schätzungsweise 10% der verpackten Einheiten werden so mit Rohmilchanteilen rekontaminiert (Mossel, 1987). Bisher gelten Sauermilcherzeugnisse jedoch trotzdem als relativ sichere Produkte. Potentiell pathogene Kontaminanten werden in Sauermilcherzeugnissen aufgrund der pH-Reduktion, Inhibition durch konkurrierende Flora aus Starterkulturen und wegen der Bildung verschiedener Metaboliten während der Fermentation in ihrer Vermehrung gehemmt und sterben in der Regel schnell ab. Allerdings ist bereits ein VTEC-Ausbruch beschrieben worden, der durch Joghurt verursacht wurde (Morgan *et al.*, 1993). Es besteht somit zum einen ein dringender Forschungsbedarf hinsichtlich der Identifikation von Virulenzfaktoren von VTEC. Zum anderen müssen Informationen über das Verhalten von VTEC unter den Stressbedingungen bei der Lebensmittelproduktion gesammelt werden, um Kontrollmaßnahmen zu optimieren und somit letztlich die Rate der VTEC-Infektionen zu senken. Auf diese beiden Aspekte geht die folgende Arbeit ein. Im ersten Teil werden VTEC-Stämme durch Bestimmung der phänotypischen Eigenschaften Säureresistenz und Zytotoxizität charakterisiert. Weiterhin werden Zusammenhänge zwischen den verschiedenen Eigenschaften der VTEC untersucht und die Einflussgröße jeder Eigenschaft auf die Humanpathogenität abgeschätzt. Ziel des zweiten Teils dieser Arbeit ist es, zu untersuchen, wie sich VTEC-Stämme während der Fermentation und der Lagerung von Sauermilcherzeugnissen verhalten. Dabei wird das jeweils spezifische Säureverhalten der Stämme im Zusammenhang mit unterschiedlichen

Starterkulturen in verschiedenen Sauermilcherzeugnissen geprüft und es werden hohe und niedrige Kontaminationsniveaus getestet. Weiterhin soll exemplarisch mit einem ausgewählten VTEC-Stamm das Verhalten bei postfermentativer Kontamination von Joghurtherzeugnissen untersucht werden. Hierbei können Erkenntnisse über den Einfluss des Kontaminationspunktes und somit zur Bedeutung der Adaptionphase für die Überlebensfähigkeit von VTEC-Stamm in Joghurt gewonnen werden.

## 2 LITERATURÜBERSICHT

### 2.1 LEBENSMITTELINFEKTIONEN

#### 2.1.1 Inzidenz der Lebensmittelinfektionen

Lebensmittelinfektionen und -intoxikationen sind ein bedeutendes, umfangreiches und stetig wachsendes Problem im gesundheitlichen Verbraucherschutz sowohl in Entwicklungsländern als auch in Industrieländern. Die meisten der Lebensmittelinfektionsfälle werden nicht in Meldesystemen erfasst, ihre genaue Anzahl ist deshalb unbekannt. Allein im Jahr 2000 wurden jedoch 2,1 Millionen durch Durchfallerkrankungen verursachte Todesfälle berichtet, von denen der größte Anteil durch kontaminierte Lebensmittel hervorgerufen wurde (WHO, 2002). Das WHO Surveillance Programme (Tirado und Schmidt, 2000) berichtet, dass in Deutschland im Zeitraum von 1993 bis 1998 *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Campylobacter* und *E.coli* die bedeutendsten bakteriellen Erreger von Lebensmittelinfektionsausbrüchen waren und dass roheihaltige Produkte, Fleischprodukte und Milchprodukte die häufigsten ursächlich beteiligten Lebensmittel waren (Abb. 2-1).

Die Problematik der Lebensmittelinfektionen wird im 21. Jahrhundert voraussichtlich noch weiter wachsen, insbesondere im Hinblick auf die zu erwartenden schnellen globalen Veränderungen. Die Anzahl infektionsanfälliger Personen nimmt in Industrieländern ständig zu (Mead et al., 1999). Dies basiert auf der steigenden Zahl von immungeschwächten Menschen, wie HIV-Infizierten und chronisch Erkrankten, sowie der Zunahme von älteren Menschen in der Bevölkerung. Veränderungen in den Essgewohnheiten, wie die zunehmende Vorliebe für rohe und minimal verarbeitete Lebensmittel, längere Zeitabstände zwischen der Verarbeitung und dem Verzehr von Lebensmitteln sowie ein zunehmender Außer-Haus-Verzehr tragen zur steigenden Inzidenz der Lebensmittelinfektionen bei (Altekruse et al., 1997; Friedman et al., 2000). Die Zunahme von Reisen und der internationale Handel sind weitere Faktoren, die lebensmittelbedingte Infektionskrankheiten fördern (Taylor et al., 1993; Eberhart-Phillips et al., 1996).

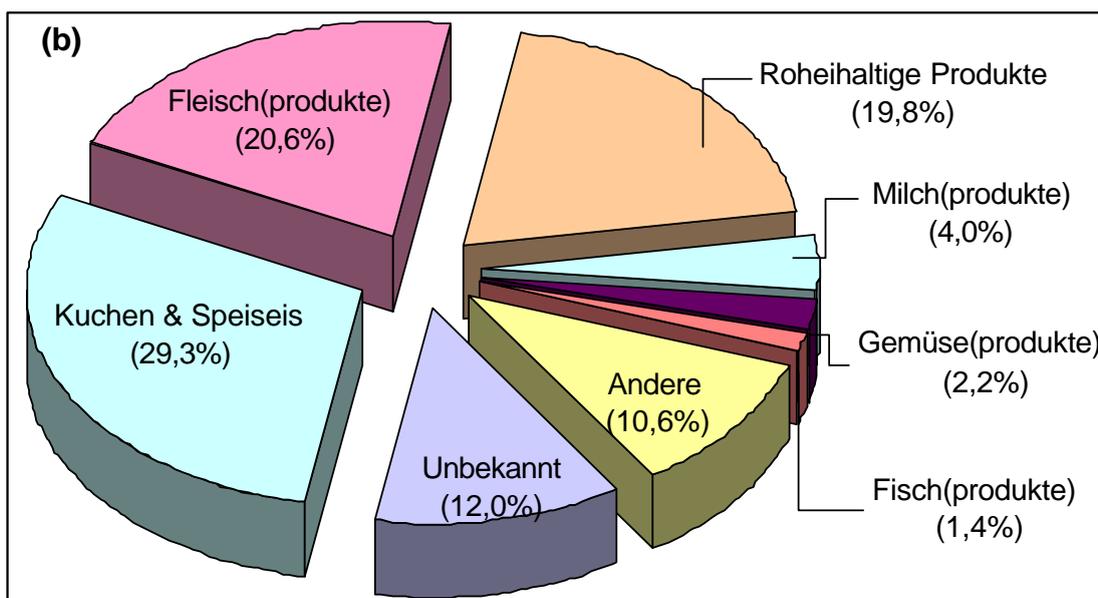
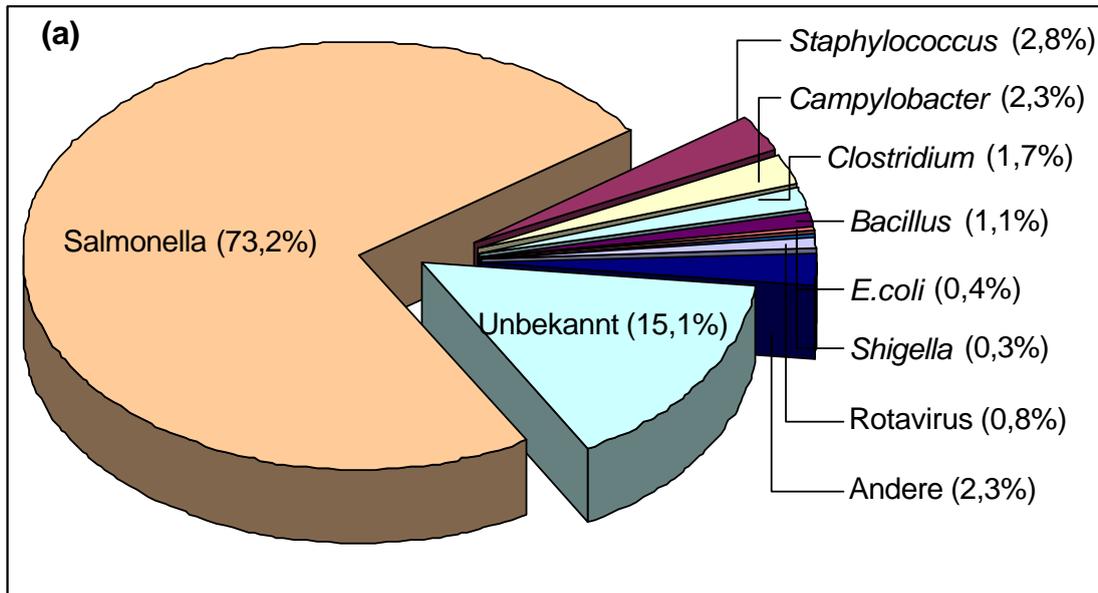


Abb. 2-1. In Deutschland im Zeitraum von 1993 bis 1998 erfasste Erreger von Ausbrüchen von Infektionskrankheiten (a) und verursachende Lebensmittel (b) (nach Tirado und Schmidt, 2000).

### 2.1.2 Neu auftkommende Pathogene

Bei Lebensmittelinfektionen und -intoxikationen interagieren drei Komponenten: der Erreger, der Wirt und die Lebensmittelmatrix, in welcher der Erreger vorliegt (Coleman und Marks, 1998). Wenn sich einer oder mehrere der drei Faktoren verändern, kann ein neuer Lebensmittelinfektionserreger mit neuen Eigenschaften entstehen oder zuvor unauffällige Mikroben die Bedeutung eines Infektionserregers erlangen. Im englischen Sprachraum werden diese Vorgänge mit dem Begriff "Emergence" umschrieben. Im Bereich der mikrobiologischen Lebensmittelsicherheit wird von "Emergence" gesprochen, wenn ein Erreger zum ersten Mal im Zusammenhang mit einer Erkrankung beobachtet wird, wenn ein Erreger häufiger Erkrankungen verursacht oder diese zunehmend schwerer verlaufen, oder wenn ein Erreger nach längerer Zeit plötzlich wieder auftaucht (IFT, 2000). Dieser Definition folgend sind mehrere Erreger, wie z.B. enterohämorrhagische *E.coli* (EHEC), *Campylobacter*, *Vibrio*, *Listeria*, *Salmonella* als "emerging" zu bezeichnen (Mead et al., 1999).

Der Begriff "Emergence" bezieht sich bei den pathogenen Erregern auf die unter den Einfluss der Umwelt stattfindenden evolutionären Vorgänge, welche zur Steigerung der Pathogenität der Mikroorganismen führen. Bislang wurde vermutet, dass diese Entwicklung aufgrund von sequentiellen kumulativen Mutationen stattfindet, die eine graduelle Steigerung von avirulent bis pathogen bewirken. Jüngste Forschungsarbeiten lassen jedoch vermuten, dass die Evolution der Pathogenität durch Quantensprünge, wie beispielsweise Beschaffung fremder DNA voranschreitet (Feng et al., 1998; Abb 2-2). Einige Erreger enthalten genetische Regionen, in welchen verschiedene Virulenzgene versammelt sind. Ein Beispiel hierfür ist die Pathogenitätsinsel LEE (Locus of Enterocyte Effacement) in EHEC (Hacker und Kaper, 2000). Manche Erreger können derartige Pathogenitätsinseln, die in anderen Organismen entwickelt wurden, als Set übernehmen und in ihr Genom einbauen. Weiterhin spielen Bakteriophagen eine Hauptrolle bei der Verbreitung von Virulenzfaktoren unter Pathogenen.

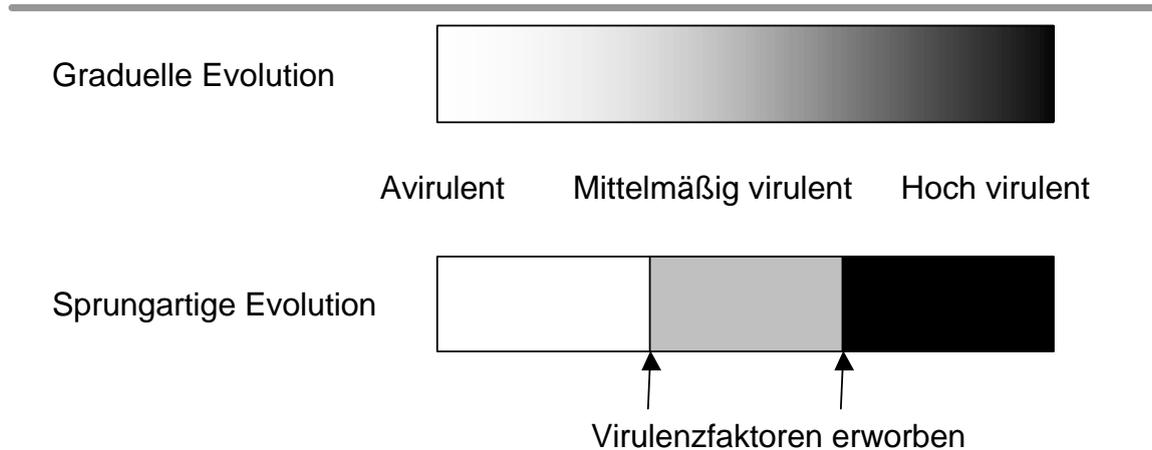


Abb. 2-2. Die zwei Modelle der Evolution von pathogenen Infektionserregern (nach IFT, 2000).

Genetische Analysen erleichtern unser Verständnis der Erregerevolution. Von Perna et al. (2001) haben das Genom des pathogenen *E.coli* Serovars O157:H7 sequenziert und ermittelt, dass *E.coli* O157:H7 im Vergleich zu nicht-pathogenen *E.coli* mehr als 1000 zusätzliche Gene besitzt. Große Variabilität in der Virulenz verschiedener *E.coli* O157:H7 Stämme belegt, dass die Genome sich rasch diversifizieren. Weiterhin kann die Befähigung zum Austausch von genetischen Material über die Speziesgrenzen hinaus die Evolution von Infektionserregern vorantreiben. Die Beschaffung und Ausbreitung von Antibiotikaresistenzgenen ist hierfür ein gutes Beispiel.

### 2.1.3 Mikrobielle Stressantwort

Chemische oder physikalische Parameter, die Mikroorganismen eine unfreundliche Umgebung bieten und Funktionsschäden verursachen können, werden als Stress bezeichnet. Stress kann tödlich für eine Zelle sein, oder sie nur sub-letal verletzen. Mikroorganismen können auf sub-letalen Stress durch morphologische und physiologische Veränderungen reagieren, diesen Vorgang nennt man „Stressantwort“. Die adaptierte Stressantwort ist kurzlebiger Natur, werden die Veränderungen nicht mehr bestätigt, können sie einfach ausgeschaltet werden, wenn nicht nötig (Archer, 1996). Die Stressantwort variiert je nach der Art des Stresses und kann unterschiedlich ausgeprägt sein innerhalb einer Bakteriengattung, einer Spezies oder bei verschiedenen

Stämmen. Entscheidend für die Stressantwort ist weiterhin der Zustand der Zelle (Vegetative Zelle / Spore), die Wachstumsphase, in der sie sich befindet (exponentiell / stationär), und der Grad ihrer Verletzung (intakt / verletzt) (IFT, 2001).

Sowohl in Lebensmitteln als auch im menschlichen Körper sind Mikroorganismen verschiedenen Stressen ausgesetzt (Sheridan und McDowell, 1998: Tabelle 2-1). Die Stressantwort ist bedeutend für die „Emergence“ von Lebensmittel-Pathogenen, da sie die Überlebensfähigkeit der Erreger im Lebensmittel verbessern kann. Weiterhin kann sich durch die Adaptation unter lebensmittelbedingten Stressbedingungen die Virulenz der Erreger erhöhen, da die Abwehrmechanismen des menschlichen Körpers ähnliche Stresse für Mikroorganismen erzeugen, wie jene die in Lebensmitteln auftreten (Archer, 1996).

Tabelle 2-1. Die bedeutendsten Stressfaktoren für Mikroorganismen und Beispiele für ihr Vorkommen im Körper und bei der Lebensmittelproduktion (nach Sheridan und McDowell, 1998)

Stressfaktoren	Auftreten der Lebensmittelproduktion	Auftreten im menschlichen Körper
Niedriger pH-Wert	Fermentation / Organische oder anorganische Säuren	Magen / Darm / Phagosome
Niedrige Temperatur	Kühlung / Einfrieren	Temperatursenkung bei der Ausscheidung
Widrige osmotische Verhältnisse	Pökelung	Magen
Sauerstoff / Oxidation	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> in Lebensmitteln / Vakuumverpackungen	Oxidative Eigenschaften der Phagocyte
Hitze	Erhitzung / Pasteurisation	Temperaturanstieg (Fieber)
Nahrungsmangel	Oberflächen in der Lebensmittelfabrik	Nährstoffmangel nach Darmentleerung, Makrophagen

Stressantworten werden durch unterschiedliche, teilweise sehr komplexe Mechanismen gesteuert. Manche erfolgen sehr schnell, wie zum Beispiel die nur wenige Sekunden dauernde physikalische Reaktion einer Osmose über die Membran, während andere Reaktionen auf Stress wie ein gesteigerter Austausch von genetischem Material zwischen Mikroorganismen mehrere Monate oder Jahre dauern. Die am häufigsten verbreitete Stressantwort von Mikroorganismen ist die Steigerung der Aktivität eines bereits vorhandenen Enzymsystems (Baird-Parker und Gould, 1998).

Besonders bedeutend für die Lebensmittelsicherheit sind generelle Stressantworten (GSR) der Mikroorganismen. Die GSR wird durch ein kompliziertes System vermittelt. Bei *E.coli* sind mehr als 50 Gene dafür zuständig (Hengge-Aronis, 2000). Die GSR wird von dem alternativen Sigma (s)-Faktor RpoS moduliert. RpoS ist ein Regulatorprotein, kodiert von chromosomal *rpoS*-Gen. Es induziert unter Stressbedingungen die Expression eines speziellen Gen-Sets, auf welchem die Synthese von Eiweißen für zelluläre Schutzfunktionen kodiert ist. RpoS wird auch Stationärphasen Sigma-Faktor genannt, weil es beim Eintritt der Zellen in die stationäre Wachstumsphase aktiv wird. Das RpoS-Niveau ist in schnell wachsenden Zellen und in Abwesenheit von Stressbedingungen niedrig (Hengge-Aronis, 1993). Es wurde nachgewiesen, dass Zellen mit defektem *rpoS*-Gen sensibel gegen diverse Stressbedingungen sind, die im Zusammenhang mit Verfahren der Lebensmittelproduktion auftreten (Rees et al., 1995; Farewell et al., 1998). Darüber hinaus deutet sich an, dass RpoS in verschiedenen Erregern, wie z.B. *Salmonella* (Fang et al., 1991), *E.coli* (Henge-Aronis, 1993), *Shigella* (Mekalanos, 1992), *Yersinia* (Iriate et al., 1995), *Staphylococcus* (Sheehan et al., 1992) und *Listeria* (Sokolovic et al., 1993) eine wichtige Rolle bei der Regulation von Virulenzgenen spielt.

Eine durch einen Stressfaktor ausgelöste GSR bewirkt gleichzeitige Reaktionen gegen andere Stressfaktoren. Verschiedensten Stressbedingungen ausgesetzte *E.coli* O157:H7 zeigten alle eine größere Hitzeresistenz als ein unter optimalen Bedingungen herangewachsener Kontrollstamm (Mazotta, 1999). Dieses Phänomen nennt man „Cross Protection“. Bei Lebensmittel-

konservierungsverfahren werden häufig Kombinationen von verschiedenen Stressfaktoren in Sinne einer Hürdentechologie eingesetzt (Leistner, 2000). Will man die Effektivität eines solchen Verfahrens beurteilen, so darf man die Befähigung von Bakterien zu einer adaptierten generellen Stressantwort nicht außer Acht lassen. Es ist zu prüfen, ob unter den speziellen Lebensmittelproduktions- oder -verarbeitungsbedingungen eine GSR in lebensmittelpathogenen Bakterien induziert werden kann. Wenn ja, ist zu klären, ob dadurch die Effektivität des Konservierungsprozesses beeinträchtigt wird (IFT, 2000).

## **2.2 VEROTOXINBILDENDE ESCHERICHIA COLI**

### **2.2.1 Definition und Erkrankungssymptome**

1982 wurden in den USA erstmals zwei Ausbrüche von hämorrhagischer Colitis (HC) im Zusammenhang mit Verotoxinbildenden *Escherichia coli* (VTEC, Synonym: STEC, Shigatoxin bildende *E.coli*) des Serotyps O157:H7 beschrieben (Riley et al., 1983; Johnson et al., 1983). Als enterohämorrhagische *E.coli* (EHEC) werden diejenigen VTEC bezeichnet, welche beim Menschen diese Erkrankung auslösen können (Beutin et al., 1994). Nach der enger gewählten Definition von Levine et al. (1987) sollen nur jene VTEC als EHEC bezeichnet werden, welche die gleichen klinischen, epidemiologischen und pathogenetischen Eigenschaften besitzen wie der Prototyp O157:H7. Bisher sind über 200 VTEC-Serotypen bekannt und immer wieder werden neue Serovaren im Zusammenhang mit VTEC-Erkrankungen identifiziert (Johnson et al., 1996). Der in Deutschland häufigste Serotyp ist O157, aber auch andere VTEC-Serotypen wie O26, O103, O91, O111 und O128 werden häufig nachgewiesen (Fruth et al., 2002). VTEC weisen ein breites Spektrum verschiedener Virulenzfaktoren auf, deren Relevanz bis heute noch weitgehend unerforscht ist. Eine endgültige Definition für die Humanpathogenität von VTEC ist deshalb derzeit nicht möglich. Im Hinblick auf einen vorbeugenden gesundheitlichen Verbraucherschutz sind

deshalb prophylaktisch alle VTEC als potentiell humanpathogene EHEC anzusehen (Samadpour et al., 1994).

VTEC können beim Menschen verschiedene intestinale Erkrankungen mit unterschiedlichen Schweregraden hervorrufen. Nach einer Inkubationszeit von 1 bis 8 Tagen beginnt die Erkrankung in der Regel mit wässrigen Durchfällen, die im Verlauf der Erkrankung zunehmend wässrig-blutig erscheinen. In den meisten Fällen heilt die Erkrankung ohne Residuen ab (Beutin und Niemer, 1995). Besonders Kinder und ältere Menschen sind jedoch bei schweren Formen der VTEC-Erkrankung durch lebensbedrohliche Folgekomplikationen wie das hämolytisch-urämische Syndrom (HUS) und die thrombotisch-thrombozytopenischen Purpura (TTP) gefährdet (Tarr, 1995). Bei ca. 10% dieser schwer erkrankten Patienten verläuft die Erkrankung letal (Bockemühl und Karch, 1996).

### **2.2.2 Inzidenz und Epidemiologie**

Wiederkäuer, vor allem Rinder, Schafe, und Ziegen sind asymptomatische Träger von VTEC und werden als ihr Hauptreservoir angesehen. Richter et al. (1997) wiesen VTEC im Rahmen einer Studie in über 50% der Kotproben von Rindern in Deutschland nach. Der direkte Kontakt mit Wiederkäuern und ihren Fäzes ist somit eine bedeutende potentielle Quelle für humane VTEC-Infektionen.

Ein weiterer Infektionsweg ist die Übertragung von Mensch zu Mensch (Huber et al., 1997). Weiterhin wurden verschiedene Lebensmittel als Vehikel für VTEC-Ausbrüche identifiziert (Tabelle 2-2). Der Verzehr von rohen oder nicht ausreichend erhitzten Lebensmittelprodukten von Wiederkäuern, wie rohem Rinderhackfleisch (Tartar), Hamburgern oder Rohmilch ist eine der Hauptursachen für VTEC-Infektionen. Weiterhin sind verschiedene Obst- und Gemüsearten, die beim Anbau oder während der Verarbeitung mit Fäzes von Wiederkäuern kontaminiert wurden, als Vektoren der VTEC-Infektion in Erscheinung getreten.

Tabelle 2-2. Lebensmittel, welche als Ursache von VTEC-Ausbrüchen identifiziert wurden.

Lebensmittelgruppe	Spezifische Infektionsquelle	Referenz
Fleisch / Fleischprodukte	Hamburger	Willshaw et al. (1997)
	Salami	Tilden et al. (1996)
	Mettwurst	Ammon et al. (1999)
Milch / Milchprodukte	Rohmilch	Keene et al. (1997)
	Pasteurisierte Milch	Upton und Coia (1994)
	Joghurt	Morgan et al. (1993)
	Rohmilchkäse	CDR Wkly(1999)
Gemüse / Obstprodukte	Salat	Ackers et al. (1998)
	Sprossen	Watanabe und Ozasa (1997)
	Apfelsaft	Cody et al. (1999)
Wasser	Leitungswasser	Akashi et al. (1994)
	Brunnenwasser	Pebody et al. (1999)

VTEC-Infektionen treten weltweit auf. Der bis heute größte VTEC-Ausbruch mit mehr als 8000 Erkrankten ereignete sich 1996 in Japan. Hauptsächlich betroffen waren Schulkinder, die sich wahrscheinlich an Rettichsprossen im Schulessen infizierten (Watanabe et al., 1996). Der zweit- und der drittgrößte Ausbruch fand in Nordamerika im Jahr 1992/1993 und in Schottland im Jahr 1996 statt. Als Überträger der Infektion in den USA wurden die Hamburger einer Fast-Food-Kette und in Schottland das Fleisch einer Metzgerei identifiziert (Bell et al., 1994; Liddell, 1997). In Deutschland wurde 1988 erstmals von einem VTEC-Ausbruch berichtet (Karch et al., 1990). Seit Einführung der Meldepflicht gemäß Infektionsschutzgesetz (IfSG) hat die Zahl der gemeldeten Fälle zugenommen. Nach Fruth et al. (2002) ist dieser Anstieg der Zahl der beobachteten VTEC-Infektionen auf den Einsatz verbesserter Methoden bei der Infektionserfassung sowie bei der Diagnostik zurückzuführen.

### 2.2.3 Virulenzfaktoren

Die Fähigkeit zur Bildung von Verotoxin (VT) ist das obligate Virulenzmerkmal der VTEC. Die Toxizität des Verotoxins für Verozellen (Nierenzellen der afrikanischen grünen Meerkatze) wurde erstmals von Konowalchuk et al. (1977)

belegt. Es gibt mehrere Varianten des Verotoxins, die zwei Hauptgruppen (VT1 und VT2) zugeordnet werden. VT1 ist identisch mit dem Toxin, welches von *Shigella dysenteriae* gebildet wird. Die Bezeichnung Shigatoxin (ST) oder Shiga-ähnliche Toxine (SLT) wird deshalb synonym verwendet. VT2 zeigt antigenische Unterschiede zu VT1 (Tesh und O'Brien, 1991). Innerhalb der VT2-Gruppe lassen sich verschiedene Genotypen wie VT2, VT2c, VT2d, VT2e usw. unterscheiden. Die VT kodierenden Gene liegen auf temperenten Phagen. Verotoxine blockieren die zelluläre Eiweißsynthese und führen dadurch zu einem schnellen Zelltod. Das VT Protein setzt sich aus einer A-Untereinheit und fünf B-Untereinheiten zusammen. Die A-Untereinheit vermittelt die toxische Aktivität, während die B-Untereinheiten für die Bindung an die Glykolipidrezeptoren (Globotriasosylceramid: Gb3) der Zellmembran verantwortlich sind (Tesh und O'Brien, 1991). Eine besonders hohe Dichte von Gb3-Rezeptoren liegt an den Nieren vor (Boyd und Lingwood, 1989).

Neben der Toxinbildung besitzen die meisten der von Patienten isolierten VTEC-Stämme noch weitere Virulenzmerkmale. VTEC können an der Darmwand sog. attaching and effacing (A/E)-Läsionen verursachen. Charakterisiert sind diese durch das Verschwinden der Mikrovilli der Darmepithelzellen (effacing) und durch die Verbindung (attaching) zwischen dem Bakterium und der epithelialen Zellmembran (Donnenberg et al., 1993). Die dichte Anheftung von VTEC wird durch die Produktion von Intimin ermöglicht. Das Intimin wird durch *eae*-Gen kodiert, welches sich auf einer Pathogenitätsinsel, dem sog. „Locus of Enterocyte Effacement (LEE) befindet (McDaniel et al., 1995). Außerdem enthält die LEE-Region weitere Virulenzgene wie *esp*, *esc*, *sep* und *tir*. Diese Gene kodieren für ein Typ-III-Sekretionssystem, mittels welchem die Virulenzdeterminanten in die Wirtszelle transportiert werden (Jarvis et al., 1995).

Ein weiterer Virulenzfaktor ist das EHEC-Hämolysin, das von dem auf einem Plasmid lokalisiertem *hly*-Gen kodiert wird. Das Hämolysin beeinflusst die Porenbildungseigenschaften der Wirtszellmembran. Tierversuchen zufolge ist das EHEC-Hämolysin zur Ausprägung typischer Krankheitssymptome

offensichtlich nicht notwendig, die nachgewiesenen Funktionen deuten jedoch darauf hin, dass dieser Faktor die VTEC-Infektion fördert (Kaper, 1998).

### 2.2.4 Säureresistenz

VTEC sind in der Lage, extrem saure pH-Werte zu überstehen. Dadurch können sie den Magen (etwa  $\text{pH} < 3,0$ ) erfolgreich passieren und dementsprechend gering ist die benötigte Dosis, um eine Infektion beim Menschen auszulösen (Gorden und Small, 1993). Weiterhin trägt diese Eigenschaft zu einer verbesserten Überlebensfähigkeit in sauren Lebensmitteln bei. Verschiedenste saure Lebensmittel wie z.B. Apfelsaft, fermentierte Fleischerzeugnisse oder Joghurt sind als Quelle von VTEC-Ausbrüchen identifiziert worden (siehe auch Tabelle 2-2). Obwohl die Überlebensfähigkeit von VTEC in verschiedenen Lebensmitteln mehrfach experimentell belegt worden ist (Miller und Kaspar, 1994; Weagant et al., 1994; Leyer et al., 1995), sind die genauen Mechanismen ihrer Säure-Widerstandsfähigkeit noch nicht vollständig geklärt. Unter Berücksichtigung der Wachstumsphase lassen sich die postulierten Mechanismen in die beiden Gruppen „Säure-Toleranz“ und „Säure-Resistenz“ untergliedern. Werden in der exponentiellen Wachstumsphase befindliche Zellen einer milden Säure ausgesetzt, so können sie sich langsam an den niedrigen pH-Wert gewöhnen und erlangen so eine Säure-Widerstandsfähigkeit, die dem Mechanismus „Säure-Toleranz“ zugeordnet wird (Goodson und Rowbury, 1983). Von einem „Säure-Resistenz“-Mechanismus spricht man hingegen, wenn man die erhöhte Überlebensfähigkeit von *E.coli* unter extrem sauren pH-Werten in der stationären Wachstumsphase gegenüber der geringeren während ihrer exponentiellen Wachstumsphase beschreiben will (Gorden und Small, 1993). Lin et al. (1995) haben drei verschiedene Mechanismen für den Erwerb der Säureresistenz bei *Escherichia coli* postuliert (Abb. 2-3).

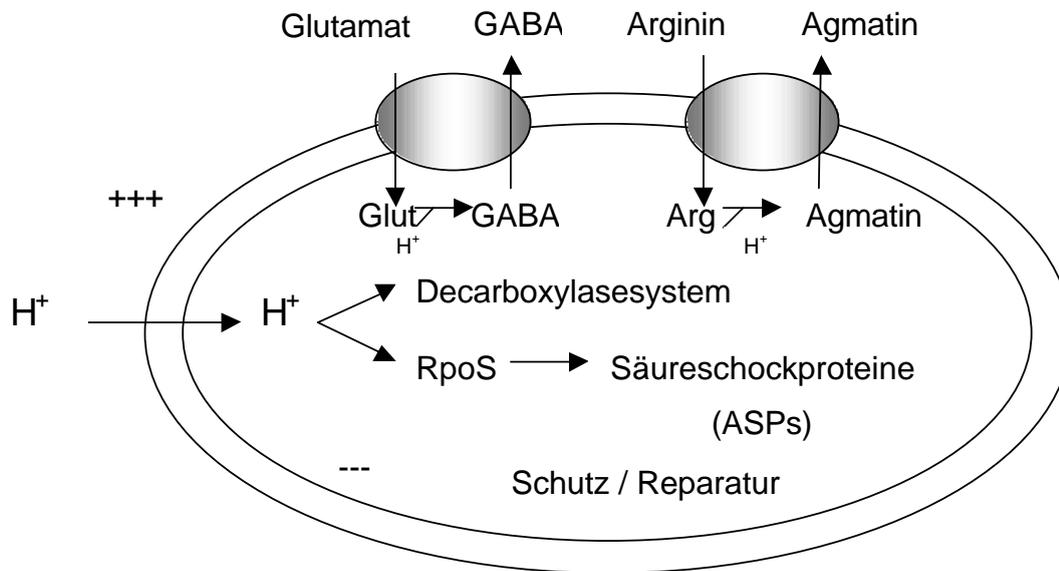


Abb. 2-3. Bekannte Mechanismen bei der Säureresistenzantwort von *Escherichia coli*. Die in die Zelle eindringenden Protonen können abgebaut werden durch Aminosäuredecarboxylierung: entweder durch Umwandlung von Glutamat zu GABA (Gamma-Amino-Isobutyrat) oder von Arginin zu Agmatin. Weiterhin kann durch den niedrigen pH-Wert der alternative Sigma-Faktor RpoS induziert werden, welcher ein Set von Säureschockproteinen (ASP) reguliert (in Anlehnung an Bearson et al., 1997).

## 2.3 SAUERMILCHERZEUGNISSE

### 2.3.1 Herkunft und Bedeutung

Sauermilcherzeugnisse sind die ältesten Milchprodukte überhaupt. Seitdem der Mensch Milch von Tieren zur Ernährung nutzt, werden Sauermilcherzeugnisse produziert. Vermutlich wurde beobachtet, dass die Säuerung der Milch spontan bei der Lagerung von Milch eintritt und festgestellt, dass die gesäuerte Milch wohlschmeckend, gut verdaulich und länger haltbar ist. Bereits in der altägyptischen Geschichte wurde von Sauermilcherzeugnissen berichtet (Mayr, 1981). Weltweit gibt es über 200 traditionelle regionale Sauermilcharten, wie beispielsweise Joghurt (Bulgarien), Kefir (Kaukasus), Ymer (Dänemark) und Zabady (Ägypten). Die molkereimäßige Herstellung von Sauermilch-



### 2.3.2 Starterkulturen

Starterkulturen sind aufgrund spezifischer Eigenschaften selektierte, definierte und lebensfähige Mikroorganismen in Reinkultur oder Mischkultur. Sie werden Lebensmitteln in der Absicht zugesetzt, das Aussehen, den Geruch und Geschmack und die Haltbarkeit zu verbessern (Weber, 1996).

Die wichtigsten Milchsäurebakterien, die als Starterkulturen für Sauermilcherzeugnisse verwendet werden, sind in Tabelle 2-3 zusammengestellt. Starterkulturen werden hinsichtlich ihrer optimalen Wachstumstemperatur in thermophile und mesophile untergliedert. Genetische Untersuchungen haben gezeigt, dass viele der Eigenschaften von Milchsäurebakterien nicht chromosomal, sondern auf Plasmiden kodiert sind. Anzahl und Art der Plasmide scheinen stammspezifisch zu sein. Beispielweise wurden bis zu 15 Plasmide mit unterschiedlichen Größen in Laktokokken nachgewiesen (Teuber, 1984).

Je nach ihrer Auslieferungsform durch den Handel werden die Starterkulturen in drei Gruppen eingeteilt: Flüssigkulturen, gefriergetrocknete Kulturen (lyophilisierte) und konzentrierte, tiefgefrorene Kulturen. Die Starterkulturindustrie bevorzugt wegen ihrer leichten Handhabung und geringeren Aktivitätsverlusten die Herstellung von gefriergetrockneten Kulturen. Die konzentrierte, tiefgefrorene Kultur ist die modernste Entwicklung der Auslieferungsform. Sie eignet sich besonders für den Direkteinsatz bei der industriellen Produktion (Teuber, 1986).

Durch Bakteriophagen verursachte Störungen in der Produktion von Milcherzeugnissen sind eines der größten Probleme der Milchindustrie. Bakteriophagen kommen in allen Medien vor und sind sog. Parasiten der Bakterien. Sie haben keinen eigenen Stoffwechsel und greifen Bakterienzellen, wie z.B. Milchsäurebakterien, an, um sie zur Vermehrung zu nutzen. Für die Kontrolle der Phagen werden viele Anstrengungen unternommen. Diese reichen von hygienischen Maßnahmen bis hin zum Einsatz phagenresistenter Kulturen (Arendt et al., 1994).

Tabelle 2-3. Eigenschaften von Starterorganismen für die Herstellung von Sauermilcherzeugnissen (nach Weber, 1996)

Spezies	Funktion	Gärung -styp <sup>10</sup>	Temp.- optimum (°C)	Milchsäure Konfi- guration	Menge (%)	Produkte	
<i>S.thermophilus</i> <sup>1</sup>	Säuerung	homo-	40	L(+)	0,6-0,8	Joghurt- erzeugnisse	
Thermophil	<i>Lb.bulgaricus</i> <sup>2</sup>	Säuerung, Aroma	homo-	45	D(-)		1,5-1,8
	<i>Lb.lactis</i> <sup>3</sup>	Säuerung	homo	40	D(-)		1,5-1,8
	<i>Lb.acidophilus</i> <sup>4</sup>	Säuerung, Antibiose	homo	37	D, L		0,3-1,9
	<i>B.bifidum</i> <sup>5</sup>	Antibiose	hetero	37	L(+)		0,1-1,4
Mesophil	<i>L.lactis</i> <sup>6</sup>	Säuerung	homo	30	L(+)	Sauermilch, Kefir, Sauerrahm	
	<i>L.cremoris</i> <sup>7</sup>	Säuerung, Aroma, Konsistenz	homo	22	L(+)		0,5-0,7
	<i>L.diacetylactis</i> <sup>8</sup>	Säuerung, Aroma	homo	22-28	L(+)	0,5-0,7	
	<i>Lc.cremoris</i> <sup>9</sup>	Aroma	hetero	20-28	D(-)	0,1-0,2	

<sup>1</sup>*Streptococcus salivarius ssp thermophilus.*; <sup>2</sup>*Lactobacillus delbrückii ssp bulgaricus*;

<sup>3</sup>*Lactobacillus delbrückii ssp lactis*; <sup>4</sup>*Lactobacillus acidophilus*; <sup>5</sup>*Bifidobacterium bifidum*;

<sup>6</sup>*Lactococcus lactis ssp. lactis*; <sup>7</sup>*Lactococcus lactis ssp. Cremoris*; <sup>8</sup>*Lactococcus lactis ssp.lactis biovar diacetylactis*; <sup>9</sup>*Leuconostoc mesenteroides ssp.cremoris*

<sup>10</sup> homo-fermentativ; hetero-fermentativ.

### 2.3.3 Herstellung der Sauermilcherzeugnisse

Bei der Herstellung der Sauermilcherzeugnisse sind gute Wachstumsbedingungen für die Starterkulturen notwendig. Zuerst wird die Milch auf den gewünschten Fettgehalt und den Trockensubstanzgehalt eingestellt. Die Homogenisierung der Milch führt zu einer verbesserten Konsistenz und Fettverteilung, gleichzeitig erfolgt auch eine Schwächung der in der Rohmilch vorhandenen Mikroorganismen, die somit empfindlicher für die anschließende Erhitzung werden. Die Milch wird erhitzt, um die in der Rohmilch vorhandenen Mikroorganismen, Enzyme und Bakteriophagen abzutöten. Danach erfolgt eine Abkühlung auf die optimale Temperatur für die Starterkultur. Anschließend wird die Milch mit einer bakteriologisch einwandfreien Starterkultur beimpft. Nach der Vorbehandlung der Milch und der Beimpfung mit Starterkulturen hängt die

weitere Behandlung davon ab, ob gerührte oder stichfeste Produkte hergestellt werden sollen. In Abbildung 2-4 sind beide Verfahren beschrieben.

Herstellung und Qualität der Sauermilcherzeugnisse wird von vielfältigen Faktoren beeinflusst. Besonders wirkt sich die Rohmilchbeschaffenheit einschließlich ihrer chemischen und mikrobiologischen Eigenschaften aus (Baustian, 1981). Die Milch sollte einen möglichst niedrigen Keimgehalt und keine Hemmstoffe, wie z.B. Arzneimittel oder Desinfektionsmittel, enthalten. Das Leistungsvermögen und die Kontaminationsfreiheit der Starterorganismen sind auch wichtige Einflussfaktoren auf die Herstellung. Dementsprechend müssen die Fermentationsbedingungen, z.B. die Fermentationsdauer und -temperatur oder die Impfmenge der Starterkulturen an die verschiedenen Produkte angepasst werden. Weiterhin beeinflussen die Abkühlbedingungen nachhaltig Konsistenz, Aromabildung und Nachsäuerung der Produkte.

Als Fremdkeime sind alle die Keime in Sauermilcherzeugnissen zu betrachten, die sich von den eingeimpften Kulturorganismen unterscheiden. Ins Produkt gelangen sie durch Überleben der Pasteurierungsbedingungen oder durch nachträgliche Rekontamination, besonders während der Abfüllung und Verpackung (Spillmann, 1981). Außer Verderbskeimen kann die Kontaminationsflora auch pathogene Keime umfassen. Wegen des niedrigen pH-Werts der Sauermilcherzeugnisse stellt eine Kontamination mit pathogenen Erregern in der Regel nur eine Gesundheitsgefahr dar. Sollte jedoch anfänglich eine geringe Kontamination mit Hefen oder Schimmelpilzen vorhanden sein, so kann sich jedoch der pH-Wert erhöhen und damit einem u.U. vereinzelt noch vorhandenen Erreger ermöglicht werden, sich zu vermehren. Die gefährlichsten Krankheitserreger im Zusammenhang mit Molkereiprodukten sind die psychotrophen Erreger *Listeria monocytogenes* und *Yersinia enterocolitica* (Mossel, 1987).

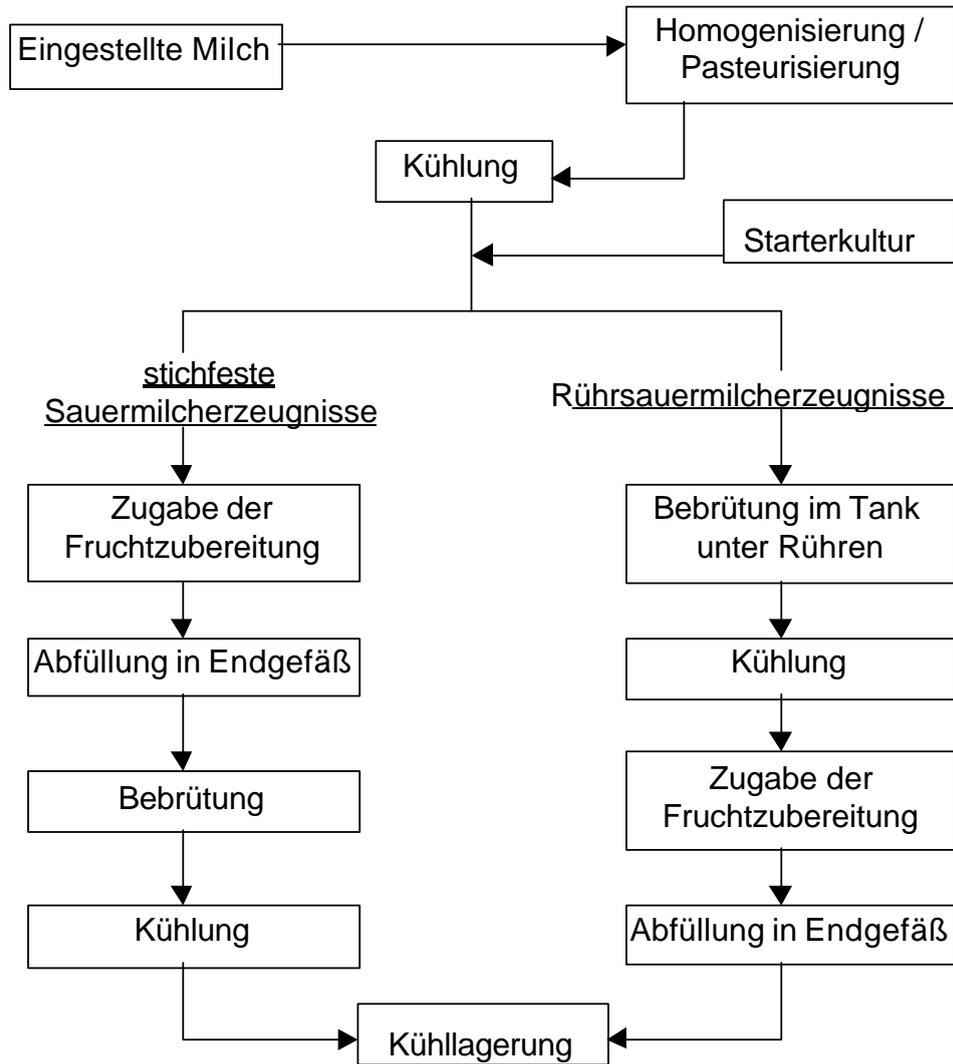


Abb. 2-4. Schema der Herstellung von Sauermilcherzeugnissen (nach Hermann et al.).

## 3 MATERIAL UND METHODE

### 3.1 CHARAKTERISIERUNG DER VTEC-STÄMME

#### 3.1.1 Teststämme

Die in dieser Arbeit verwendeten *E.coli* Stämme sind in Tabelle 3-1 aufgelistet. Es wurden insgesamt 65 VTEC-Stämme auf ihre Säureresistenz und Zytotoxizität geprüft. Stämme aus Lebensmitteln wurden im Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR), Fachgebiet Mikrobiologie und Hygiene, Berlin isoliert bzw. vom Nationalen veterinärmedizinischen Referenzlabor für *E.coli* (NRL) am BfR, Dessau, zur Verfügung gestellt. Stämme von Menschen im Zusammenhang mit Erkrankungen wurden vom Robert-Koch-Institut, Nationales Referenzzentrum für Enterobacteriaceae (NRZ), Wernigerode, oder vom NRL bereitgestellt. Sie gehören zu 29 verschiedenen Serotypen und sind durch das Vorkommen der VTEC-verbundenen Virulenzfaktoren, d.h. Verotoxin1-Gen (*vtx1*), Verotoxin 2-Gen (*vtx2*), „*E.coli* attaching and effacing“ Gen (*eae*) und das EHEC-Hämolysin-Gen (*hly*) charakterisiert. Weiterhin wurden 21 *E.coli* Stämme (nicht-VTEC), die kein Verotoxin bilden und aus Lebensmitteln isoliert wurden, als Kontrolle für die Bestimmung der Säureresistenz verwendet. Diese Stämme wurden der Stammsammlung des Fachgebiets Mikrobiologie und Hygiene des BfR entnommen.

Um das Verotoxinbildungsvermögen aller Teststämme zu bestätigen, wurde der Enzym-Immuno-Assay Premier EHEC<sup>®</sup> (Meridian Diagnostics Inc., Cincinnati, OH, USA) nach Herstellervorgaben durchgeführt.

Zur Herstellung von Stammkulturen wurde eine über Nacht bei 37 °C auf Blutagar (Rezept siehe Anhang) gewachsene Bakterienkolonie in 5 ml BHI-Bouillon (Merck, Darmstadt) überimpft und für 18 Stunden bei 37 °C unter Schütteln (120 U/min) inkubiert. Die gewachsene Kultur wurde jeweils mit 10% (v/v) sterilem Glycerin versetzt und in einem Kryo-Röhrchen mit Glasperlen bei –80 °C gelagert. Direkt vor der Untersuchung wurde der jeweilige Teststamm zur Reaktivierung auf Blutagar angezüchtet.

Tabelle 3-1. Übersicht über die in experimentellen Untersuchungen eingesetzten *E.coli* Stämme

Lfd.Nr.	Stamm- Bezeichnung	Herkunft	O:H- Serotyp	Virulenzfaktoren <sup>1</sup>	Stammsammlung <sup>2</sup>
1	K15.7	Käse	O6:H10	<i>vtx2</i>	BfR, Berlin
2	11.1	Hackfleisch	On.t.:H2	<i>vtx2</i>	BfR, Berlin
3	161-84	Mensch	O157:H7	<i>vtx1;vtx2;eae;hly</i>	BfR, Dessau, NRL
4	98-04391	Mensch	O103:H2	<i>vtx1;eae;hly</i>	RKI, Wernigerode, NRZ
5	ATCC 25922			-	ATCC
6	623/97	Hackfleisch	O103:H2	<i>vtx2;hly</i>	BfR, Dessau, NRL
7	32/98	Hackfleisch	O146:H28	<i>vtx2</i>	BfR, Dessau, NRL
8	33/98	Hackfleisch	O22:H16	<i>vtx2</i>	BfR, Dessau, NRL
9	669/97	Hackfleisch	O8:H19	<i>vtx1;vtx2;hly</i>	BfR, Dessau, NRL
10	F114/0/11	Hackfleisch	O22:H8	<i>vtx1;vtx2;hly</i>	BfR, Dessau, NRL
11	238/97	Hackfleisch	O157:H7	<i>vtx2;eae;hly</i>	BfR, Dessau, NRL
12	15/7	Käse	O6:H10	<i>vtx2</i>	BfR, Dessau, NRL
13	K7/B7/1	Käse	O6:H10	<i>vtx2</i>	BfR, Dessau, NRL
14	K79/2	Käse	O2:H27	<i>vtx2</i>	BfR, Dessau, NRL
15	W215/1	Wurst	O138:H-	<i>vtx2</i>	BfR, Dessau, NRL
16	W238/1	Wurst	On.t.:H-	<i>vtx1;hly</i>	BfR, Dessau, NRL
17	W206/1	Wurst	O91:H-	<i>vtx1</i>	BfR, Dessau, NRL
18	248/97	Wurst	O157:H7	<i>vtx1;vtx2;eae;hly</i>	BfR, Dessau, NRL
19	W131/3	Wurst	O22:H8	<i>vtx1;vtx2;hly</i>	BfR, Dessau, NRL
20	W183/1	Wurst	O22:H8	<i>vtx1;vtx2;hly</i>	BfR, Dessau, NRL
21	375/97	Milch	O157	<i>vtx1;vtx2;eae;hly</i>	BfR, Dessau, NRL
22	1/98	Milch	On.t.:H8	<i>vtx2;hly</i>	BfR, Dessau, NRL
23	11/98	Milch	O101:H4	<i>vtx2;hly</i>	BfR, Dessau, NRL
24	216/2	Milch	O156:H25	<i>vtx1;eae</i>	BfR, Dessau, NRL
25	16030-66/10	Hackfleisch	O21:H21	<i>vtx1;vtx2</i>	BfR, Dessau, NRL
26	235/97	Hackfleisch	O91:H21	<i>vtx1;vtx2;hly</i>	BfR, Dessau, NRL
27	46.1	Hackfleisch	O103:H21	<i>vtx2;hly</i>	BfR, Berlin
28	46.3	Hackfleisch	O116:H21	<i>vtx2;hly</i>	BfR, Berlin
29	106.2	Hackfleisch	O28:H4	<i>vtx2</i>	BfR, Berlin
30	32.1	Hackfleisch	O171:H2	<i>vtx2</i>	BfR, Berlin
31	28.1	Hackfleisch	O113:H21	<i>vtx2;hly</i>	BfR, Berlin
32	31.1	Hackfleisch	On.t.:H-	<i>vtx2</i>	BfR, Berlin
33	43.1	Hackfleisch	On.t.:H19	<i>vtx1;vtx2;hly</i>	BfR, Berlin
34	16.1	Hackfleisch	O91:H21	<i>vtx2;hly</i>	BfR, Berlin
35	95/Nr.1	Hackfleisch	O111:H-	<i>vtx1;vtx2;eae;hly</i>	BfR, Berlin
36	57/1	Hackfleisch	Osp:H48	<i>vtx2</i>	BfR, Dessau, NRL
37	E48a	Hackfleisch	On.t.:H19	<i>vtx1;vtx2;hly</i>	BfR, Berlin
38	48d	Hackfleisch	On.t.:H19	<i>vtx1;vtx2;hly</i>	BfR, Berlin
39	2431	Mensch	O116:H21	<i>vtx1;vtx2;hly</i>	BfR, Dessau, NRL
40	1271-84	Mensch	O157:H-	<i>vtx1;vtx2;eae;hly</i>	BfR, Dessau, NRL
41	B2576	Mensch	O157:H7	<i>vtx2;eae;hly</i>	BfR, Dessau, NRL
42	EDL933	Mensch	O157:H7	<i>vtx1;vtx2;eae;hly</i>	BfR, Dessau, NRL
43	HUS CL8	Mensch	O157:H7	<i>vtx1;vtx2;eae;hly</i>	BfR, Dessau, NRL
44	RL612/84	Mensch	O157:H7	<i>vtx2;eae;hly</i>	BfR, Dessau, NRL
45	98-03461	Mensch	O103:H2	<i>vtx1;eae;hly</i>	RKI, Wernigerode, NRZ
46	98-03589	Mensch	O103:H2	<i>vtx1;eae</i>	RKI, Wernigerode, NRZ
47	98-04261	Mensch	O103:H2	<i>vtx1;eae;hly</i>	RKI, Wernigerode, NRZ

### 3. Material und Methode

48	98-04918	Mensch	O103:H2	<i>vtx1; eae; hly</i>	RKI, Wernigerode, NRZ
49	98-04925	Mensch	O103:H2	<i>vtx2; eae; hly</i>	RKI, Wernigerode, NRZ
50	97-16152	Mensch	O103:H2	<i>vtx1; eae</i>	RKI, Wernigerode, NRZ
51	97-11467	Mensch	O103:H2	<i>vtx1; eae; hly</i>	RKI, Wernigerode, NRZ
52	97-11545	Mensch	O103:H-	<i>vtx1; eae; hly</i>	RKI, Wernigerode, NRZ
53	97-11617	Mensch	O103:H2	<i>vtx1; eae; hly</i>	RKI, Wernigerode, NRZ
54	97-06376	Mensch	O103:H2	<i>vtx1; eae; hly</i>	RKI, Wernigerode, NRZ
55	97-06939	Mensch	O103:H2	<i>vtx1; eae; hly</i>	RKI, Wernigerode, NRZ
56	97-03526	Mensch	O103:H18	<i>vtx1; eae; hly</i>	RKI, Wernigerode, NRZ
57	98-04427	Mensch	O26:H11	<i>vtx1; eae; hly</i>	RKI, Wernigerode, NRZ
58	98-04917	Mensch	O26:H11	<i>vtx1; eae; hly</i>	RKI, Wernigerode, NRZ
59	98-03562	Mensch	O26:H11	<i>vtx1; eae; hly</i>	RKI, Wernigerode, NRZ
60	98-03686	Mensch	O26:H11	<i>vtx2; eae; hly</i>	RKI, Wernigerode, NRZ
61	98-03460	Mensch	O26:H11	<i>vtx1; eae; hly</i>	RKI, Wernigerode, NRZ
62	98-05256	Mensch	O5:H-	<i>vtx1; eae; hly</i>	RKI, Wernigerode, NRZ
63	98-02975	Mensch	O111:H-	<i>vtx1; eae; hly</i>	RKI, Wernigerode, NRZ
64	98-04930	Mensch	O91:H-	<i>vtx1; vtx3; hly</i>	RKI, Wernigerode, NRZ
65	98-03328	Mensch	O91:H-	<i>vtx1; hly</i>	RKI, Wernigerode, NRZ
66	98-03459	Mensch	O91:H14	<i>vtx1; hly</i>	RKI, Wernigerode, NRZ
67	ATCC 11229			-	ATCC
68	43.4	Hackfleisch		-	BfR, Berlin
69	213/009	Hackfleisch		-	BfR, Dessau, NRL
70	S1665/87	Hackfleisch		-	BfR, Dessau, NRL
71	A1	Geflügel		-	BfR, Berlin
72	A8	Geflügel		-	BfR, Berlin
73	A9	Geflügel		-	BfR, Berlin
74	C600	Mensch		-	BfR, Dessau, NRL
75	CB572	Mensch		-	BfR, Dessau, NRL
76	C4170	Mensch		-	BfR, Dessau, NRL
77	Teufel	Mensch		-	BfR, Berlin
78	171	Wurstküche		-	BfR, Berlin
79	150	Wurstküche		-	BfR, Berlin
80	122	Wurstküche		-	BfR, Berlin
81	155	Wurstküche		-	BfR, Berlin
82	189	Wurstküche		-	BfR, Berlin
83	103	Wurstküche		-	BfR, Berlin
84	113	Wurstküche		-	BfR, Berlin
85	143	Wurstküche		-	BfR, Berlin
86	81	Wurstküche		-	BfR, Berlin

<sup>1</sup> Das entsprechende Gen wurde durch PCR-Verfahren nachgewiesen. *vtx1*, Verotoxin 1 Gen; *vtx2*, Verotoxin 2 Gen; *eae*, „Attaching and effacing“ Gen; *hly*, Enterohämolysin Gen, -, kein Toxigen vorhanden, d.h. nicht-VTEC.

<sup>2</sup> BfR, Bundesinstitut für Risikobewertung /ehemalig BgVV, Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin; NRL, Nationales veterinärmedizinisches Referenzlabor; RKI, Robert-Koch-Institut; NRZ, Nationales Referenzzentrum für Enterobacteriaceae; ATCC, American Type Culture Collection

#### **3.1.2 Bestimmung der Säureresistenz**

##### **3.1.2.1 Gewinnung des Inokulums**

Die Bestimmung der Ausprägung der Säureresistenz von *E.coli*-Stämmen erfolgte in Anlehnung an die Methode nach Lin et al. (1996). Die Autoren haben drei verschiedene Systeme zur Bestimmung der Säureresistenz beschrieben, das Glutamatsystem, das Argininsystem und das Oxidativsystem. Der Versuchsablauf ist dem Fließschema zu entnehmen (Abbildung 3-1).

Als Grundmedium für Anzucht der Stämme vor dem Säuretest dienten Luria-Bertani-Medium (LB, Merck) und Minimales Glukose-E-Medium (EG-Medium; Vogel und Bonner, 1956). Für das Glutamatsystem und das Argininsystem wurde LB-Medium mit 4 % Glukose (LBG) verwendet. Zur Prüfung im Oxidativsystem wurde mit 100mM Morpholinethansulfonsäure (MES; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) gepuffertes LB-Medium (LB-MES, pH 5,5) angesetzt. Das EG-Medium (pH 7,0) wurde als Aktivierungsmedium für die Kontrolle des Oxidativsystems genommen. Die Zellen wurden jeweils in 10ml der entsprechenden Medien mit einer Schüttelinkubation (120 U/Min) bei 37 °C über Nacht bis zur Stationärphase gezüchtet.

##### **3.1.2.2 Säuretest**

Für den Säuretest wurde EG-Medium mit 5 N HCl bis zum pH-Wert von 2,5 gesäuert und als Stressmedium entweder mit oder ohne Zusatzstoffe (Arginin oder Glutamat) angesetzt. Die Stressmedien wurden à 10 ml in 16 X 160 mm Reagenzröhrchen steril abgefüllt und bei 37 °C temperiert. Zur Prüfung im Glutamatsystem und im Argininsystem wurden die in LBG kultivierten Zellen jeweils in 10 ml EG mit 5,7 mM Glutamat (EG-Glu, pH 2,5) und in 10 ml EG mit 0,6 mM Arginin (EG-Arg, pH 2,5) inokuliert. Die in LB-MES gewachsenen Bakterien für die Testung im Oxidativsystem und die in EG angezüchteten Zellen für die Kontrollen wurden in EG (pH 2,5) ohne Zusatzstoffe überimpft. Die Ausgangskeimzahl der inokulierten Zellen in Stressmedium wurde auf ca.  $6 \pm 0,5$  Log KbE/ml eingestellt.

### 3. Material und Methode

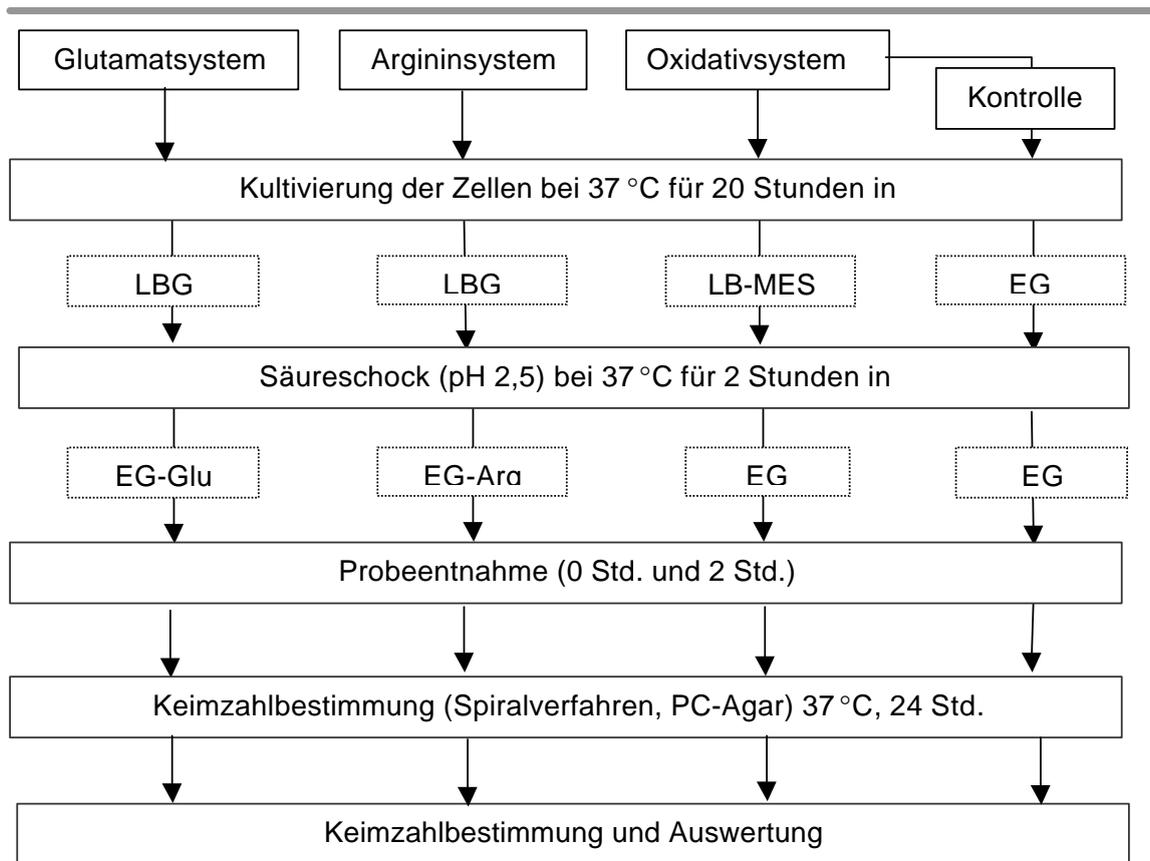


Abb. 3-1. Versuchsablauf bei der Säureresistenzbestimmung

Die *E.coli*-Stämme wurden bei 37 °C für 2 Stunden dem Säureschock ausgesetzt. Eine Keimzahlbestimmung erfolgte sowohl unmittelbar nach der Zugabe des *E.coli*-Inokulums in das Stressmedium (0 Std.) als auch nach 2 Stunden statischer Inkubation. Es wurde eine dezimale Verdünnungsreihe in 0,1% Peptonwasser (Merck) angelegt und im Doppelansatz auf Plate Count Agar (PC-Agar, Merck) mit Hilfe eines Spiralplattengerätes (Automatic Spiral Plater, WA06EF, Don Whiteley Scientific Limited, Lahden, Deutschland) ausplattiert. Nach der Inkubation bei 37 °C für 24 Stunden wurden die Keimzahlen aller Platten bestimmt.

### **3.1.2.3 Bestimmung der Säureresistenzantwort**

Als Überlebensrate in einer Versuchsreihe wurde die Reduktion der Log-Keimzahl nach zwei Stunden Säureschock im Vergleich zur logarithmischen Anfangskeimzahl berechnet. Der im weiteren verwendete Mittelwert der Log-Reduktion jedes Teststamms wurde aus mindestens zweimaligen Wiederholungsuntersuchungen ermittelt.

Die mittlere Log-Reduktion jedes Stammes im Oxidativsystem wird paarweise von der mittleren Log-Reduktion in einer Kontrolle abgezogen. Die errechnete Differenz ist der Induktionsgrad der Säureresistenz im Oxidativsystem.

### **3.1.3 Bestimmung der Zytotoxizität**

#### **3.1.3.1 Gewinnung von Toxinen**

Zur Produktion von Verotoxinen wurde eine auf Blutagar aktivierte Kolonie jedes Stammes in 20 ml Trypton Soya Bouillon (TSB; Oxoid, Hampshire, England) überführt und bei 37 °C unter Schütteln (120 U/Min) 20 Stunden bebrütet. Anschließend wurden die Kulturen abzentrifugiert (17,000 × g, 30 Min., 4 °C) und die Überstände durch 0,45µl Membranfilter (Milipore, Bedford, MA., USA.) sterilfiltriert. Die filtrierten Überstände wurden bei 4 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

#### **3.1.3.2 Kultivierung von Verozelllinien**

Die Arbeit mit Zellkulturen orientierte sich an den Methoden von Konowalchuk et al. (1977) und Speirs et al. (1977). Für den Test wurden Verozellen Vero-B4 (DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, ACC33, Braunschweig, Germany) verwendet, die aus der institutseigenen Zellsammlung stammten. Als Anzuchtmedium diente MEM-EARLE (Seromed Biochrom KG, Berlin, Deutschland) mit 50µg/ml Gentamycin (Seromed Biochrom KG) und 10% inaktiviertem fötalen Kälberserum (iFKS; Gibco BRL, Karlsruhe, Deutschland). Die Zelllinien wurden in Plastik-Zellkulturflaschen (Greiner GmbH, Frickenhausen, Deutschland) bei 37 °C (5% CO<sub>2</sub>, Wasserdampfsättigung) im Brutschrank (Heraeus B5060, Hanau, Deutschland)

kultiviert. Zum Ernten der Zellen wurden Mediumreste durch Spülen der Flaschen mit PBS entfernt. Durch Zugabe von Trypsin-EDTA-Lösung (0,05% Trypsin und 0,02% EDTA in PBS; Biochrom KG) und zehninütiger Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen abgelöst. Anschließend wurde zentrifugiert (200 × g 15 Min., 20 °C). Das Pellet wurde in Zellkulturmedium resuspendiert und ein Aliquot nach Anfärbung mit Trypanblau Lösung (0,5% Trypanblau in Kochsalzlösung, Merck) in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Die für den jeweiligen Test erforderliche Zelldichte wurde durch Zugabe von Medium eingestellt.

#### **3.1.3.3 MTT-Zytotoxizitätstest**

Zytotoxische Effekte auf die Verozellen wurden durch einen kolorimetrischen Test unter Verwendung des Farbstoffes 3-(4, 5-Dimezhy-thiazol-2-yl)-2,5 Diphentyltetrazoliumbromid (MTT; Sigma Chemical Co.) quantifiziert. Dieser Farbstoff, MTT, wird von Dehydrogenasen in aktiven Mitochondrien zu einem lilafarbenen Formazan umgesetzt (Green et al., 1984). Die Durchführung des MTT-Zytotoxizitätstests erfolgte in Modifikation des von Menge et al. (1999) beschriebenen Verfahrens.

Hierzu wurden die Kavitäten einer 96-Loch Mikrotiterplatte mit Flachboden (Greiner GmbH) mit je 100µl Verozellsuspension in Anzuchtmedium bei einer Zelldichte von  $4 \times 10^5$  Zellen pro ml beschickt. In die äußeren Vertiefungen der Platten wurden jeweils 100 µl PBS pipettiert.

Im Zytotoxizitätstestansatz wurden jeweils 50 µl Toxinüberstände, die in PBS 4fach bis zur Verdünnungsstufe  $4^{-10}$  weiter verdünnt wurden, in die Verozellen enthaltende Platte zugegeben. Alle Ansätze wurden dreifach angelegt. Auf jeder Platte wurden 5 Negativkontrollen (100 µl Zellsuspension mit 50 µl PBS pro Vertiefung) und 5 Blanks (jeweils 100 µl Anzuchtmedium mit 50 µl PBS pro Vertiefung) mitgeführt. Die kompletten Platten wurden bei 37 °C (5 % CO<sub>2</sub>, Wasserdampfsättigung) im Brutschrank für 96 Stunden inkubiert. Nach

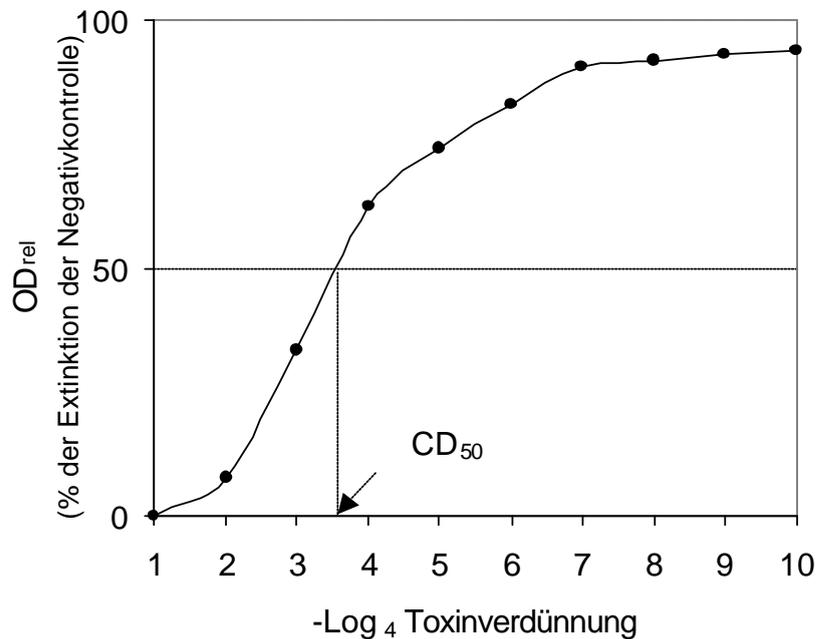


Abb. 3-2. Beispiel zur Auswertung des MTT-Zytotoxizitätstests

frühestens 48 Std. wurden die Zellen mikroskopisch begutachtet und der Prozentsatz zerstörter Zellen semiquantitativ ermittelt.

Nach 96 Stunden Inkubation wurde in jede Kavität der Mikrotiterplatte 25  $\mu$ l MTT-Lösung pipettiert (5 mg/ml MTT in PBS, sterilfiltriert) und die Platte für 4 Std. bei 37 °C inkubiert. Zum Lösen des in wässriger Lösung unlöslichen Formazans wurden in jede Kavität 100  $\mu$ l SDS-Lösung (10 % in A. bidest. mit 0,01 N HCl) gegeben. Die Inkubation wurde über Nacht fortgesetzt. Die Extinktionsdifferenzen OD<sub>abs</sub> (550 nm als Testwellenlänge, 630 nm als Referenzwellenlänge) in den einzelnen Kavitäten wurden im Titertek Multiscan® MCC/340 ELISA Plattenphotometer (Flow Labs, McLean, VA, USA) gemessen.

#### 3.1.3.4 Bestimmung der Zytotoxizität

Die Zytotoxizität der Toxine aus dem Bakterienkulturüberstand wurde in Bezug zu den Blanks ( $OD_{bla}$ ) und zu den Negativkontrollen ( $OD_{neg}$ ) in der jeweiligen Mikrotiterplatte angegeben. Dazu wurde die relative optische Dichte ( $OD_{rel}$ ) nach der folgenden Formel ermittelt.

$$OD_{rel} (\%) = \frac{OD_{abs} - OD_{bla}}{OD_{neg} - OD_{bla}} \times 100 \quad (\text{Gleichung 3-1})$$

Die relative optische Dichte ( $OD_{rel}$ ) jeder Probe wurde jeweils gegen den Logarithmus mit der Basis 4 der Verdünnungsstufen graphisch dargestellt (Abb. 3-2). Aus der Graphik wurde geometrisch die der 50%igen Zytotoxizität der Negativkontrolle entsprechende Toxinverdünnung ( $CD_{50}$ ) bestimmt (Gentry und Dalrymple, 1980). Die zur Basis 4 logarithmierte  $CD_{50}$  wurde als Arbiträre Einheit (A.E.) für den Zytotoxizitätstest ermittelt (Abb. 3-2). Aus Wiederholungsuntersuchungen wurde die mittlere A.E. bestimmt.

#### 3.1.4 Statistik

Alle statistischen Berechnungen wurden mit dem Statistik-Programmpaket SPSS Version 11.0.1. (SPSS Inc., 2001) durchgeführt. Die statistische Signifikanzgrenze für die berechnete Irrtumswahrscheinlichkeit (P) wurde als  $P < 0,05$  definiert.

Mit einer Clusteranalyse wurde die jeweils in den Untersuchungen ermittelte Säureresistenzantwort und die Zytotoxizität derart in verschiedene Klassen gruppiert, dass die Merkmalsunterschiede innerhalb einer Klasse möglichst gering sind. Um die Beziehung zwischen den drei Variablen der verotoxinbildenden *E.coli* (VTEC) Säureresistenzantwort, Induktionsgrad der Säureresistenz und Zytotoxizität (A.E.) zu analysieren, wurde jeweils der Korrelationskoeffizient nach Pearson ermittelt und es wurde die Signifikanz der Korrelation bewertet.

Zur statistischen Prüfung auf Unterschiede zwischen den Untergruppen der geprüften Stämme wurde eine Varianzanalyse nach dem Verfahren eines „Allgemeinen Linearen Modells“ durchgeführt. Zunächst wurden die Isolate

hinsichtlich ihres Toxinbildungsvermögens den beiden Gruppen VTEC und nicht-VTEC zugeordnet. Die VTEC-Stämme wurden nach ihrer Herkunft untergruppiert in Isolate von humanen Erkrankten und in Isolate von Lebensmitteln. Es wurden je nach gebildetem Toxin (*vtx1*, *vtx2* oder *vtx1/2*) 3 Subtypen unterschieden. Weiterhin erfolgte eine Gruppierung der Stämme nach der Ausstattung mit den Virulenzgenen *eae* und *hly* (jeweils ja oder nein). Im Rahmen eines Literaturstudiums wurde geprüft, ob ein Serotyp bereits als Verursacher einer humanen Erkrankung beobachtet wurde. 10 der Serotypen (O2, O5, O22, O26, O91, O103, O111, O113, O157 und O171) sind schon einmal im Zusammenhang mit einer Erkrankung beschrieben worden, sie wurden deshalb der Untergruppe „potentiell humanpathogen“ zugeordnet. Die anderen Serotypen wurden der Untergruppe „nicht-pathogen“ zugeordnet. Als Test für die Mittelwertvergleiche zwischen mehr als 3 unterschiedlichen Gruppen wurde Duncan's multiple range Test durchgeführt.

Der Einfluß der verschiedenen Variablen ( $X_1, X_2, \dots, X_7$ ) auf die binäre Variable  $Y$  ( $Y =$  Erkrankung Ja/Nein) wurde mit Hilfe einer multiplen logistischen Regressionsanalyse mit Rückwärtseliminierung (5 % Signifikanzgrenze) statistisch untersucht. Durch die Herkunft der Stämme (von einem humanen Erkrankten oder von einem Lebensmittel) ist definiert, ob sie eine Erkrankung verursachen können ( $Y=1$ ) oder nicht ( $Y=0$ ). Zur quantitativen Beschreibung der Zusammenhänge zwischen der Zielvariablen  $Y$  und den erklärenden Variablen ( $X_1, \dots, X_7$ ) dient die Wahrscheinlichkeit  $p$  (Eintritt des Zielereignisses Erkrankung,  $Y=1$ ). Während die Erkrankungswahrscheinlichkeit  $p$  sich auf eine Zahl zwischen 0 und 1 beschränkt, kann ihr Quotient (Odds Ratio),  $p/(1-p)$  ( $P(Y=1)/P(Y=0)$ ), jede beliebige positive Zahl annehmen. Der Logarithmus der Quotienten der Erkrankungswahrscheinlichkeit ( $\log(p/(1-p))$ ), genannt logit, umfasst die ganze reelle Zahlenmenge. Der logit von  $p$  mit den erklärenden Variablen  $X_1, \dots, X_7$  kann mit folgender Formel modelliert werden:

$$\log it(p) = \log(p/(1-p)) = \mathbf{b}_0 + \mathbf{b}_1 X_1 + \mathbf{b}_2 X_2 + \mathbf{b}_3 X_3 + \mathbf{b}_4 X_4 + \mathbf{b}_5 X_5 + \mathbf{b}_6 X_6 + \mathbf{b}_7 X_7$$

(Gleichung 3-2)

Die verschiedenen Parameter sind wie folgt definiert:

$p$ , Erkrankungswahrscheinlichkeit

$\beta_0$ , Konstante,  $\beta_1 \dots \beta_7$ , Regressionskoeffizienten

$X_1$ , *vtx1* (negativ:0 / positiv:1);  $X_2$ , *vtx2* (0/1);  $X_3$ , *eae* (0/1);  $X_4$ , *hly* (0/1);  $X_5$ , O-Serotyp (Human-verbunden,1/ andere,0);  $X_6$ , Induktionsgrad der Säureresistenz;  $X_7$ , Zytotoxizität.

Die logistische Regression mit dem Modell gemäß Gleichung 3-2 lieferte für jedes Isolat eine Schätzung der Erkrankungswahrscheinlichkeit. Die Isolate wurden nach der Größe des Schätzwertes (Grenze >0,5) klassifiziert. Über die Bestimmung der Rate der korrekt klassifizierten Stämme (als krankheitserregender Stamm erkannt) wurde die prädikative Effizienz des erstellten Modells geprüft.

## **3.2 UNTERSUCHUNG ZUM VERHALTEN VON VTEC-STÄMMEN IN SAUERMILCHERZEUGNISSEN**

### **3.2.1 Teststämme und Starterkulturen**

Zuerst wurden 3 VTEC-Stämme (Serotyp O157:H7) ausgewählt, die im Teil 1 bereits durch weitergehende Untersuchungen zur Säureresistenz und Zytotoxizität charakterisiert wurden (Tabelle 3-2). Die Stämme wurden in Zusammenhang mit einer Erkrankung, wie HC oder HUS, isoliert und können auch als EHEC bezeichnet werden. Alle 3 Stämme waren in Besitz des *eaeA*-Gens, des EHEC-Hämolysin-Gens und wiesen eine hohe Verozytotoxizität auf. Das Säureverhalten der *E. coli*-Stämme wurde geprüft und entsprechend als inhärent säureresistent (pHr), als induzierbar resistent (pHir) und als säuresensibel (pHs) differenziert. Im Vergleich zur Vorkultivierung in neutralem pH veränderte eine Vorkultivierung der Stämme in milder Säure (pH 5,5) das Verhalten der säureresistenten und säuresensiblen Stämme in einem äußerst sauren Bereich bei einem pH-Wert von 2,5 nicht, d.h. diese Stämme waren nicht induzierbar. Im Gegensatz dazu würde sich die Überlebensfähigkeit bei pH 2,5 bei dem induzierbar resistenten Stamm erheblich verbessern.

Versuchsweise wurden 4 verschiedene Sauermilcherzeugnisse, klassischer Joghurt, Joghurt mild, probiotischer Joghurt und Sauermilch mit entsprechenden Starterkulturen nach der Anweisung des Herstellers (Bionic GmbH & Co. KG, Niebüll) hergestellt. Eine Übersicht über die verwendeten Starterkulturen gibt Tabelle 3-3.

### **3.2.2 Herstellung von Sauermilcherzeugnissen aus der mit VTEC kontaminierten Milch**

Der Arbeitsablauf bei der Herstellung von Sauermilcherzeugnissen aus der mit VTEC kontaminierten Milch ist dem Fließschema zu entnehmen (Abb.3-3).

Einen Tag unmittelbar vor der Herstellung wurde Rohmilch (Herdensammelgemelk des Versuchsgutes des BfR) im Wasserbad bei über 65°C für länger als 30 Minuten pasteurisiert und bis zur Weiterverarbeitung bei +4°C gelagert.

Tabelle 3-2. VTEC-Stämme für die Untersuchungen in Sauermilcherzeugnissen

Lfd .Nr.	Stamm-Bezeichnung	O:H-Serotyp	Virulezfaktoren <sup>1</sup>	Herkunft <sup>2</sup>	Zyto-Toxizität <sup>3</sup>	Säure-Resistenz <sup>4</sup>
1	EDL933	O157:H7	<i>vtx1;vtx2;eae;hly</i>	Mensch (HC)	Hoch	pHr
2	161-84	O157:H7	<i>vtx1;vtx2;eae;hly</i>	Mensch (HC)	Hoch	pHir
3	HUS CL8	O157:H7	<i>vtx1;vtx2;eae;hly</i>	Mensch (HUS)	Hoch	pHs

<sup>1</sup> Das entsprechende Gen wurde durch PCR-Verfahren nachgewiesen. *vtx1*, Verotoxin 1 Gen; *vtx2*, Verotoxin 2 Gen; *eae*, „Attaching and effacing“ Gen; *hly*, EHEC-Enterohemolysin Gen

<sup>2</sup> HC, Hämorrhagische Colitis; HUS, Hämolytisch-Urämisches Syndrom

<sup>3</sup> hohe Zytotoxizität bedeutet A.E.> 4,5

<sup>4</sup> pHr, inhärent säureresistent; pHir, induzierbar säureresistent ; pHs, säuresensibel

Tabelle 3-3. Eingesetzte Starterkulturen

Klassifikation	Ziel-Produkte	Zusammensetzung	Bezeichnung
Thermophile Kulturen	Klassischer Joghurt	<i>Streptococcus thermophilus</i> ; <i>Lactobacillus delbrückii</i> <i>subsp.bulgaricus</i> ; Glukose als Trägerstoff	JOGURT VITAL-FERMENT™ (BI 2000)
	Joghurt Mild	<i>Streptococcus thermophilus</i> ; <i>Lactobacillus lactis</i> ; <i>Lactobacillus acidophilus</i> ; <i>Bifidobacterium</i> species; Glukose als Trägerstoff	MASTER JOGHURT VITAL-FERMENT™ (BI 2043)
	Probiotischer Joghurt	<i>Streptococcus thermophilus</i> ; <i>Lactobacillus acidophilus</i> ; <i>Bifidobacterium</i> species; <i>Bifidobacterium longum</i> BB536	JOGHURT PROBIOTIC VITAL-FERMENT™ (BI 3031)
Mesophile Kultur	Sauermilch	<i>Lactococcus lactis</i> ; <i>Lactococcus cremoris</i> ; <i>Lactococcus lactis</i> <i>biovar.diacetylactis</i> ; <i>Leuconostoc cremoris</i>	MASTER MILK VITAL-FERMENT™ (BI 2045)

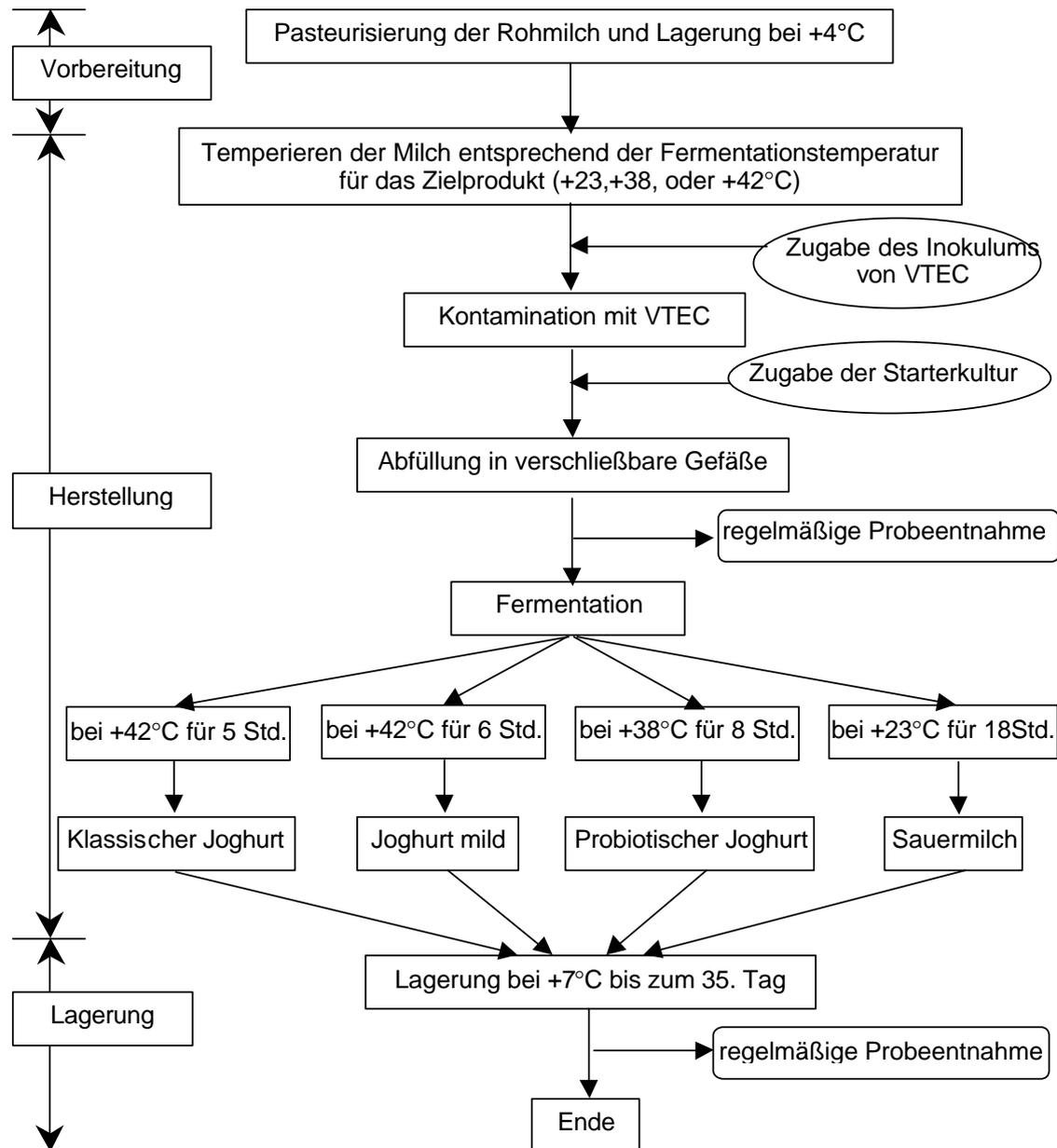


Abb.3-3. Versuchsablauf bei der Herstellung und der Lagerung von Sauermilcherzeugnissen aus mit VTEC kontaminierter Milch.

Am selben Tag wurde der jeweilige VTEC-Teststamm, der nach Stammaufbewahrung auf Blutagar reaktiviert worden war, in BHI-Bouillon überimpft und bei +37°C für 18 Stunden als Schüttelkultur bebrütet.

Die dezimal verdünnte Übernachtkultur von VTEC wurde in Milch inokuliert, die bei +23, +38, oder +42°C je nach Fermentationstemperatur des Zielproduktes temperiert wurde. Die Kontaminationshöhe wurde auf ca.  $3 \pm 0,5 \log \text{KbE/ml}$  als relativ hohes Niveau und auf ca.  $1 \pm 0,5 \log \text{KbE/ml}$  als niedriges Niveau eingestellt. Als negative Kontrolle wurde Milch ohne Beimpfung mit VTEC mitgeführt. Die lyophilisierte Starterkultur wurde der Milch zugegeben und gut gemischt. Die Milch wurde danach in verschließbare Gefäße mit einem Inhalt von ca. 200 ml verteilt und im Wasserbad unter den spezifischen Fermentationsbedingungen fermentiert. Im Anschluss an die jeweilige Fermentation wurden die Gefäße bei  $+7 \pm 1^\circ\text{C}$  für die Dauer von bis zu 35 Tagen gelagert.

#### **3.2.3 Kontamination von Sauermilcherzeugnissen mit VTEC nach der Fermentation**

Der VTEC Stamm 161-84 (Nr. 2 in Tabelle 3-2) wurde für die Versuche ausgewählt und auf Blutagar bei +37°C angezüchtet. Eine Kolonie wurde in 10ml BHI-Bouillon überimpft und bei +37°C für 18 Stunden bebrütet. Diese Übernachtkultur enthält Bakterien, die sich in der stationären Wachstumsphase befinden. Um einen VTEC Stamm in exponentieller Phase zu erhalten, wurde die Übernachtkultur in BHI-Bouillon verdünnt und in pasteurisierte Milch überführt. Diese Milch wurde ohne Starterkultur bei 42 °C für 5 oder 6 Std. je nach der erforderlichen Fermentationsanforderung des Zielproduktes bebrütet. Die lyophilisierte Starterkultur wurde der pasteurisierten und auf 42°C temperierten Milch zugegeben und gemischt. Danach wurden ca. 200 ml der Milch in verschließbare Gefäße mit ca. 200 ml gegeben und je nach Zielprodukt im Wasserbad bei 42°C für 5 oder 6 Std. bebrütet. Direkt am Ende der Fermentation wurde die fermentierte Milch mit der vorbereiteten Kultur inokuliert. Die Kontaminationsniveaus waren ca.  $4 \pm 0,5 \log \text{KbE/g}$  für klassischen Joghurt und  $5 \pm 0,5 \log \text{KbE/g}$  für Joghurt mild. Im Anschluss an die Kontamination wurden die Gefäße bei  $+7 \pm 1^\circ\text{C}$  für die Dauer von bis zu 35 Tagen gelagert.

#### **3.2.4 Physikalische und chemische Untersuchungen**

Während jeder Probeentnahme erfolgte gleichzeitig eine pH-Messung mit einem pH-Meter METTLER DELTA 345 und einer Gelelektrode InLab® 423 (METTLER TOLEDO LTD.). Für jedes Produkt wurden die Einzelmessergebnisse jeder Probeentnahme über alle Chargen gemittelt.

Das Untersuchungsprinzip der Milchsäurebestimmung basiert auf der LMBG § 35 Methode L 01.00- 26 „Bestimmung des Gehaltes an L- und D-Milchsäure (L- und D-Lactat) in Milch und Milchprodukten; Enzymatisches Verfahren“(BgVV, 1987a). Ein Gramm Probematerial wurde mit 49 ml aqua. Bidest. gründlich gemischt. Die verdünnte Probe wurde filtriert. Danach erfolgte die Bestimmung der D- und L-Milchsäure mittels eines Test Kits der Fa. BOEHRINGER MANNHEIM nach Anweisung des Herstellers. Die Messung erfolgte mit Hilfe einer 1cm light path Glasküvette im Spektrophotometer (UV-2100 PC, Shimazu Europa GmbH) bei einer Wellenlänge von 340 nm.

#### **3.2.5 Mikrobiologische Untersuchungen**

Von der Probeentnahme bis zur Probenverdünnung wurde nach der §35 LMBG-Methode L 01.00-1 „Vorbereitung der Probe für mikrobiologische Untersuchungen, Verfahren für Milch und flüssige Milchprodukte“ vorgegangen (BgVV, 1987b).

##### **3.2.5.1 Quantitativer und qualitativer Nachweis von VTEC**

Im Rahmen der mikrobiologischen Untersuchungen wurde der Nachweis von VTEC sowohl qualitativ als auch quantitativ durchgeführt.

Die quantitative Bestimmung von VTEC beim Versuch mit relativ hohem Kontaminationsniveau erfolgte mittels VRB-Agar (Merck) in Anlehnung an die §35 LMBG Methode nach L01.00-3 „Bestimmung der coliformen Keime in Milch, Milchprodukten, Butter, Käse und Speiseeis (Verfahren mit festem Nährboden)“ (BgVV, 1987c). Spezifiziert für *Escherichia coli* wurde diese Methode, indem die Platten nicht bei +30°C, sondern bei +37°C bebrütet wurden. Während der Vorversuche wurden die verdächtigen Kolonien (jeweils 5

pro Platte) der kontaminierten Sauermilcherzeugnisproben auf Indolbildung (KOVÁS-Reagenz, Merck) geprüft und auch das Verotoxinbildungsvermögen molekularbiologisch untersucht (siehe unten). Wenn keine vergleichbaren Kolonien in der negativen Kontrollprobe derselben Charge gefunden wurden, galten die Bakterien aus den inokulierten Joghurtproben als identifiziert und bestätigt.

Beim Versuch mit relativ niedrigem Kontaminationsniveau wurde für die quantitative Bestimmung von VTEC eine modifizierte Most Probable Number (MPN)-Methode eingesetzt. Diese Methode entsprach der Methode nach §35 LMBG L01.00-25 „Bestimmung der *Escherichia coli* in Milch, Milchprodukten, Butter, Käse und Speiseeis (Verfahren mit flüssigem Nährmedium)“ (BgVV, 1987d). Speziell für EHEC wurde an Stelle von Laurylsulfat-Tryptose-Bouillon (LST-Bouillon) bei 30 °C, mTSB-Bouillon bei 37 °C verwendet.

Zur Bestätigung der verdächtigen Kolonien aus der quantitativen Untersuchung - d.h. aus Sauermilcherzeugnisproben, die ein zählbares Ergebnis erbrachten - und zur Prüfung der Proben, in denen eine Berechnung der Koloniezahl nicht möglich war, erfolgte der qualitative Nachweis von VTEC mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Für die Durchführung der PCR wurde eine Anreicherung der Proben durchgeführt. Im Anschluss an die Anreicherung erfolgte eine Subkultivierung in mTSB- Bouillon mit Durhamröhrchen mit anschließender Prüfung der Gas- und Indolbildung. Für die Nukleinsäureextraktion wurden die Subkulturen, die sowohl durch Gas- als auch Indolbildung als *E.coli*-positiv bestätigt waren, mit Dneasy™ Tissue Kits (QUIAGEN GmbH, Hilden) nach Anleitung der Hersteller aufgearbeitet. Die Übernachtskulturen von Stamm 214/062 (BfR, Dessau, NRL) und Stamm C600 (BfR, Dessau, NRL) in mTSB-Bouillon wurden als Positiv- und Negativkontrollen für das folgende PCR-Verfahren ebenfalls aufgearbeitet (Gallien et al., 2000). 5 µl der aufgearbeiteten DNA Templates wurden in den folgenden 25 µl PCR-Ansatz gegeben: 2,5 µl 10-fach konzentrierter PCR-Puffer mit 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; Desoxynukleosidtriphosphatasemix (Boehringer Ingelheim), bestehend aus dTTP, dCTP, dATP, dGTP zu je 0,2mM; 25 p mol je Primer

(MK1, MK2; Karch und Meyer, 1989) und 2,5 U Goldstar™ DNA Polymerase (Eurogentec S.A., Seraing, Begium). Das Temperaturprofil beim GeneAmp PCR System 9600 (Perkin-Elmer PE Biosystems, Foster City, CA, USA) umfaßte einen initialen Erhitzungsschritt zur Denaturierung der DNA bei 94 °C für 5 min, sowie 30 Zyklen bestehend aus je 1 min bei 44 °C, 1,5 min 72 °C und 1 min bei 94 °C. Zu jeder PCR wurden Positiv- und Negativkontrollen sowie eine Chemikalienkontrolle mitgeführt. In einem Agarose-Gel (2 % Metaphor™ Agarose, Biozym Diagnostik GmbH, Oldendorf) entstehen Fragmente mit einer Länge von ca. 230 bp. für VT. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse der mitgeführten Positiv- und Negativkontrollen sowie der Chemikalienkontrolle wurde ein Amplifikat mit einer Länge von ca. 230 bp. in einem Agarose-Gel (2%) als VT bestätigt.

#### **3.2.5.2 Quantitativer Nachweis von Milchsäurebakterien**

Das Verhalten der Milchsäurebakterien während der Herstellung und Lagerung der Sauermilcherzeugnisse wurde anhand der negativen Kontrollproben geprüft. Zur Durchführung der Bestimmung von verschiedenen Milchsäurebakterien siehe Abb. 3-4.

Zur differenzierten Bestimmung wurden MRS-Agar (Merck) für *Lactobacilli* und M17-Agar (Merck) für *Streptococci* in Joghurtprodukte nach der ISO 7889:2003 Methode „Yoghurt - Enumeration of characteristic microorganisms - Colony-count Technique at 37°C“ angewendet. Die anaerobe Bebrütung gelang mit Hilfe von Anaerobcult® A (Merck). Der quantitative Nachweis von mesophilen Milchsäurebakterien in Sauermilch erfolgte mittels MRS-Agar nach der ISO15214:1998 Methode „Microbiology of food and animal feeding stuffs- Horizontal method for the enumeration of mesophilic lactic acid bacteria - Colony-count technique at 30°C“.

In Anlehnung an einen Entwurf des Subkomitees SC5 der die ISO/TC 34 Methode „Fermented milk-Enumeration of *Lactobacillus acidophilus*- Colony count technique at 43°C“ wurde MRS-Clindamycin-Agar für den quantitativen

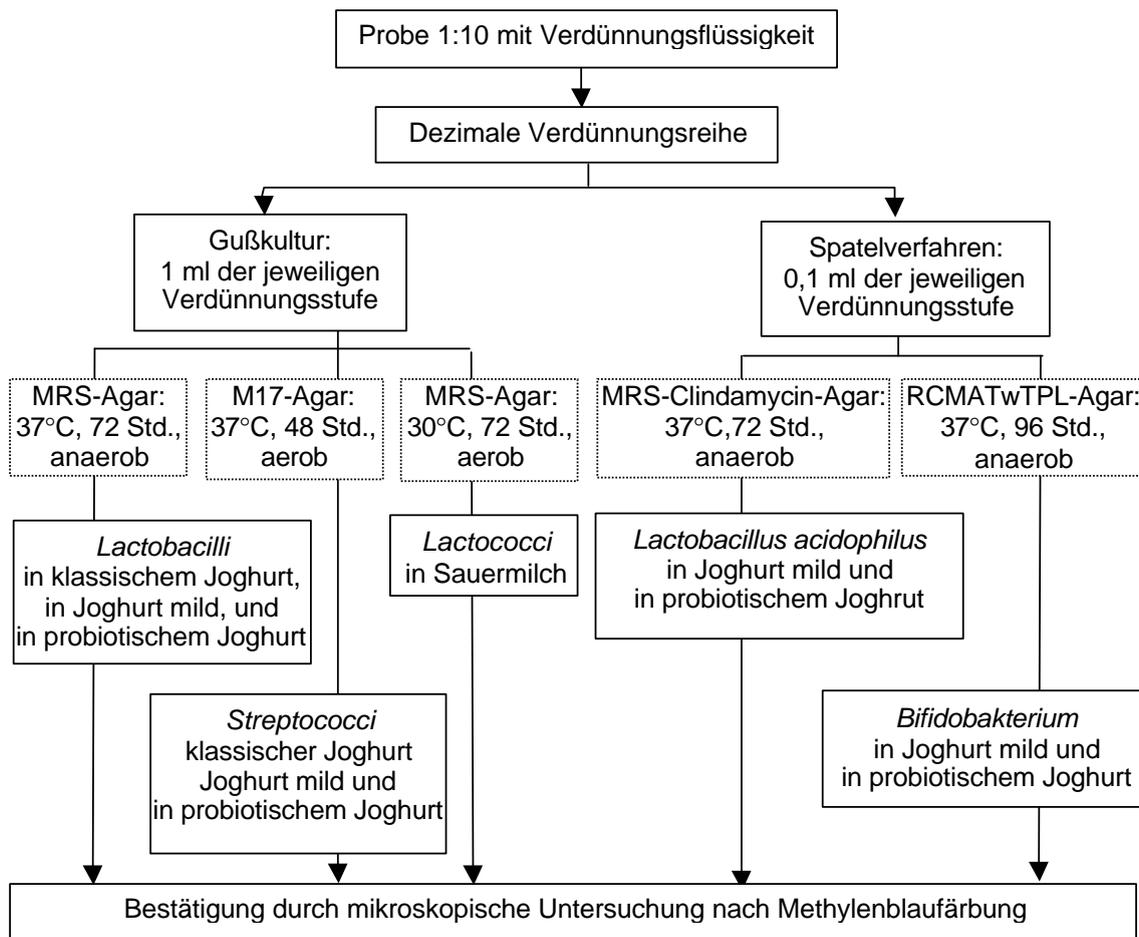


Abb. 3-4. Quantitative Nachweisverfahren zur differenzierten Bestimmung von Milchsäurebakterien

Nachweis von *Lactobacillus acidophilus* eingesetzt und mit Rücksicht auf die Zusammensetzung der Starterkultur bei 37°C statt 43°C anaerob bebrütet. Untersucht wurde der *Bifidobakterium*-Gehalt mittels RCMATwTPL-Agar entsprechend einer Methode von Engel (2002). Die dezimal verdünnte Probe wurde im Spatelverfahren auf zwei Platten ausgestrichen und bei 37°C für 4 Tage anaerob bebrütet. Aus den Koloniezahlen wurde der gewichtete Mittelwert errechnet.

Für die Identifizierung wurden die auf dem jeweiligen selektiven Medium gewachsenen Keime mikroskopisch nach Methylenblaufärbung (LÖFFLERS Methylenblaulösung, Merck) und gegebenenfalls über die Verwertung

verschiedener Kohlenhydrate mittels des API Systems 50 CH Kit (API Laboratory Product Ltd. bioMérieux, Frankreich) geprüft.

#### **3.2.6 Datenbearbeitung**

##### **3.2.6.1 Bearbeitung der Keimzahldaten**

Die ermittelten Einzelwerte der Keimzahlen wurden logarithmiert und Gruppenmittelwerte sowie dazugehörige Standardabweichungen wurden aus den mindestens dreimal wiederholten Versuchsreihen in Graphiken oder in Tabellen zusammengestellt. Die Keimzahl von Proben, in der VTEC quantitativ nicht bestimmbar, aber nach Anreicherung qualitativ mit Hilfe der PCR nachweisbar waren, wurden als „< 1 log KbE/g“ angegeben und für die Regressionsanalyse als „1 KbE/g“ definiert.

##### **3.2.6.2 Erstellung von neuen Variablen**

Um die Kinetik der Ergebnisse zu verstehen, wurden neue Variablen erstellt, z.B. die Säuerungsgeschwindigkeit von Milch während der Fermentation, die Vermehrungsrate von VTEC während der Fermentation und die Dezimalreduktionszeit (D-Wert) von VTEC während der Lagerung. Der Abfall der pH-Werte während der Fermentation,  $\Delta\text{pH}_{\text{fer}}$  wurde durch die Fermentationsdauer geteilt und als Säuerungsgeschwindigkeit ( $\overline{\text{pH}}_{\text{fer}}$ ) definiert. Die weitere Säuerung trotz des Fermentationsabbruchs während der 7-tägigen Kühlungslagerung wurde als Nachsäuerungsgrad ( $\Delta\text{pH}_{\text{lag}}$ ) bezeichnet, wobei der pH-Wert am 7. Lagerungstag vom pH-Wert am Ende der Fermentation subtrahiert wurde. Die Nachsäuerungsgeschwindigkeit ( $\overline{\text{pH}}_{\text{lag}}$ ) wurde errechnet, indem  $\Delta\text{pH}_{\text{lag}}$  durch die Lagerungsdauer geteilt wurde. Die Dezimalreduktionszeit (D-Wert) von VTEC während der Kühlungslagerung wurde aus der logarithmischen Überlebenskurve durch eine einfache lineare Regressionsanalyse berechnet.

### 3.2.6.3 Statistische Auswertung

Alle im Versuchszeitraum erhobenen Daten wurden mit Hilfe des Statistik-Programmpaketes SPSS Version 11.0.1. (SPSS Inc., 2001) statistisch geprüft. Für die Korrelation zwischen Variablen wurde der Korrelationskoeffizient nach Pearson ermittelt und es wurde die Signifikanz der Korrelation bewertet. Zur statistischen Prüfung der beeinflussenden Faktoren wurde eine Varianzanalyse nach dem Verfahren „Allgemeines Lineares Modell (GLM)“ durchgeführt. Dabei wurden Mittelwertvergleiche zwischen mehr als 3 unterschiedlichen Gruppen unter Anwendung von Duncan's multiple range Test durchgeführt. Mit Hilfe des GLM-Prozesses wurde der Einfluss verschiedener Parameter ( $X_1, X_2, \dots, X_6$ ) auf die Absterberate ( $Y = D\text{-Wert}$ ) analysiert. Dabei wurde die folgende Formel angewendet:

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_4X_4 + b_5X_5 + b_6X_6 \quad (\text{Gleichung 3-3})$$

Die verschiedenen Parameter sind wie folgt definiert:

$Y$ , Dezimalreduktionszeit (D-Wert)

$\beta_0$ , Konstante,  $\beta_1 \dots \beta_7$ , Regressionskoeffizient

$X_1$ , Säureresistenz ( $\text{pH}_{\text{ir}}, 1 / \text{pH}_{\text{r}}, 2 / \text{pH}_{\text{s}}, 3$ );  $X_2$ ,  $\Delta\text{pH}_{\text{fer}}$ ;  $X_3$ ,  $\overline{\text{pH}_{\text{fer}}}$ ;  $X_4$ , Vermehrungsrate während der Fermentation;  $X_5$ ,  $\Delta\text{pH}_{\text{lag}}$ ;  $X_6$ ,  $\text{pH}_{\text{lag}}$ .

Die statistische Signifikanzgrenze für die berechnete Irrtumswahrscheinlichkeit (P) ist als  $P < 0,05$  definiert.

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 CHARAKTERISIERUNG VON VTEC- STÄMMEN DURCH BESTIMMUNG DER SÄURERESISTENZ UND DER ZYTOTOXIZITÄT

Ein Ziel dieser Arbeit bestand in der weiteren Charakterisierung von VTEC-Stämmen, die über das Vorkommen von verschiedenen Virulenzfaktoren beschrieben waren, durch Bestimmung ihrer Säureresistenzantwort und ihrer Zytotoxizität. Dadurch wurde die Identifizierung der entscheidenden Einflussfaktoren für die Humanpathogenität unter den Eigenschaften der Stämme ermöglicht.

#### 4.1.1 Säureresistenz

##### 4.1.1.1 Prüfung auf drei Säureresistenzsysteme

Lin et al. (1996) haben drei verschiedene durch niedrige pH-Werte induzierbare Säureresistenzmechanismen in *E.coli* beschrieben. Zwei sind Decarboxylasesysteme (Glutamat- und Argininsystem) und eines ein Oxidativsystem. Es wurden in den eigenen Untersuchungen 4 VTEC-Stämme, die nur entweder aus Lebensmitteln (K15.7 und 11.1) oder von erkrankten Menschen (161-84 und 98-04391) isoliert worden waren, auf diese drei Säureresistenzsysteme getestet. Hierbei wurde ein nicht-VTEC-Stamm (ATCC25922) als Kontrolle mitgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4-1 zusammengestellt.

Alle 4 VTEC-Stämme wiesen ähnliche Säureresistenzniveaus durch das Glutamatsystem mit Absterberaten von weniger als 0,3 Log-Reduktion nach 2-stündigem Säureschock bei pH 2,5 auf. Die durch das Argininsystem vermittelte Säureresistenz war im Vergleich ein wenig kleiner. Hingegen variierte die Säureresistenz durch das Oxidativsystem je nach Stamm mit Log-Reduktionen zwischen 0,7 und 2,4 stark. Der aus erkranktem Menschen isolierte VTEC-Stamm 98-04391 und der aus einem Lebensmittel isolierte Stamm 11.1 zeigten

jeweils die stärkste und die schwächste Resistenz im Oxidativsystem. Ein Einfluss der Herkunft auf ihre Überlebensrate war nicht zu beobachten ( $P > 0,05$ ). Die Untersuchungen belegten jedoch, dass alle geprüften VTEC-Stämme mit allen drei Säureresistenzsystemen ausgestattet waren, auch wenn diese unterschiedlich effektiv arbeiten.

Der Kontrollstamm ATCC25922 (nicht-VTEC) war immer am empfindlichsten ( $P < 0,01$ ). Die stärkste Säureresistenz wurde bei diesem Stamm durch das Glutamatsystem vermittelt. Das Argininsystem funktionierte im Stamm ATCC25922 nicht so effektiv wie das Glutamatsystem, vermittelte jedoch ebenfalls Resistenz. Die Effektivität des Oxidativsystems war bei dem Stamm ATCC25922 zu gering, um Säureresistenz zu vermitteln.

Die Vorversuche mit beschränkter Stammzahl zeigten, dass es große Unterschiede bei der Effektivität des Oxidativsystems bei den verschiedenen Stämmen gibt. In den folgenden Studien wurden die Stämme deshalb nur auf die durch das Oxidativsystem vermittelte Säureresistenz geprüft und charakterisiert.

Tabelle 4-1. Die Effektivität der drei Säureresistenzsysteme in *E.coli* Stämmen

Bezeichnung	Log-Reduktion <sup>1</sup> (pH 2,5, 2 Std.)				
	K15.7	11.1	161-84	98-04391	ATCC25922
Glutamatsystem <sup>2</sup>	0,2	0,1	0,2	0,3	0,7
Argininsystem <sup>2</sup>	0,3	0,3	0,6	0,3	1,4
Oxidativsystem <sup>3</sup>	1,1	2,4	1,3	0,7	4,1

<sup>1</sup> Zellen wurden je nach System kultiviert und anschließend in pH 2,5 für 2 Stunden dem Säurestress ausgesetzt. Die Log-Keimzahl direkt nach dem Säureschock wurde von der logarithmierten Ausgangskeimzahl subtrahiert. Die Log-Reduktion ist ein Mittelwert aus mindestens dreifachem Wiederholungsansatz.

<sup>2</sup> Die Stämme wurden in LBG-Medium bei 37°C über Nacht kultiviert. Das EG-Medium (pH 2,5) wurde entweder mit 5,7mM Glutamat oder mit 0,6 mM Arginin supplementiert und als Testmedium für das Glutamat- und Argininsystem eingesetzt. Der Säuretest wurde bei 37°C für 2 Stunden durchgeführt.

<sup>3</sup> Die Stämme wurden bei 37°C jeweils in LB-MES-Medium (pH 5,5) über Nacht kultiviert. Anschließend wurde der Säuretest in EG-Medium (pH 2,5) bei 37°C für 2 Stunden durchgeführt.

### 4.1.1.2 Bestimmung der Säureresistenzantwort von *E.coli*

Es wurden insgesamt 86 *Escherichia coli* Stämme einschließlich der 5 bereits geprüften Stämme auf eine induzierbare, durch das Oxidativsystem vermittelte Säureresistenz geprüft. Für die Induktion der Säureresistenz wurde eine Adaptation in mild gesäuertem Komplexmedium (LB-MES, pH 5,5) durchgeführt. Derselbe Stamm wurde als Kontrolle in pH-neutralem Minimalmedium (EG, pH 7) vorbebrütet. Anschließend wurde die Säureresistenzantwort über die Überlebensrate nach 2-stündigem Säureschock bei pH 2,5 ermittelt. Die Ergebnisse wurden in Klassen mit einer Breite von 1,5 log eingeteilt (Abb. 4-1).

Die Überlebensraten der unter Kontrollbedingungen (pH 7) gewachsenen Stämme schwankten im breiten Bereich zwischen 0,8 und 5,3 log-Reduktion (Abb. 4-1(a)). 50,0% (43 Stämme) der geprüften Stämme zeigten eine Reduktion im Bereich von 1,5 bis 3 log. Bei 29,1 % (25 Stämme) reduzierte sich die Keimzahl um mehr als 3 log. Der Stamm ATCC25922 zeigte mit 5,3 log die größte Log-Reduktion. Der VTEC-Stamm 16.1, der aus einem Lebensmittel isoliert wurde, wies die höchste Resistenz unter diesen Kontrollbedingungen auf. Insgesamt 18 der Stämme (20,9%) zeigten eine Reduktion von weniger als 1,5 log auf.

Auch die durch das Oxidativsystem induzierten Säureresistenzantworten bei den Stämmen zeigten eine große Schwankungsbreite, aber überwiegend lagen die Überlebensraten unter 1,5 log (Abb. 4-1(b)). 2 VTEC-Stämme, Stamm W238/1 und Stamm 98-04391, die aus einem Lebensmittel bzw. von einem Patienten isoliert wurden, zeigten mit 0,7 Log-Reduktion die größte Säureresistenz. Auch der nicht-VTEC Stamm 213/009 hatte eine vergleichbare Überlebensrate. Nur bei 2 Stämmen, Stamm HUS CL 18 (VTEC) und Stamm ATCC25922 (nicht-VTEC), reduzierte sich die Keimzahl durch Säureschock um mehr als 4 log.

Die Stämme wurden nach ihrer Säureresistenzantwort im Oxidativsystem in drei Kategorien klassifiziert: die Stämme, deren Keimzahl sich um weniger als 1,5

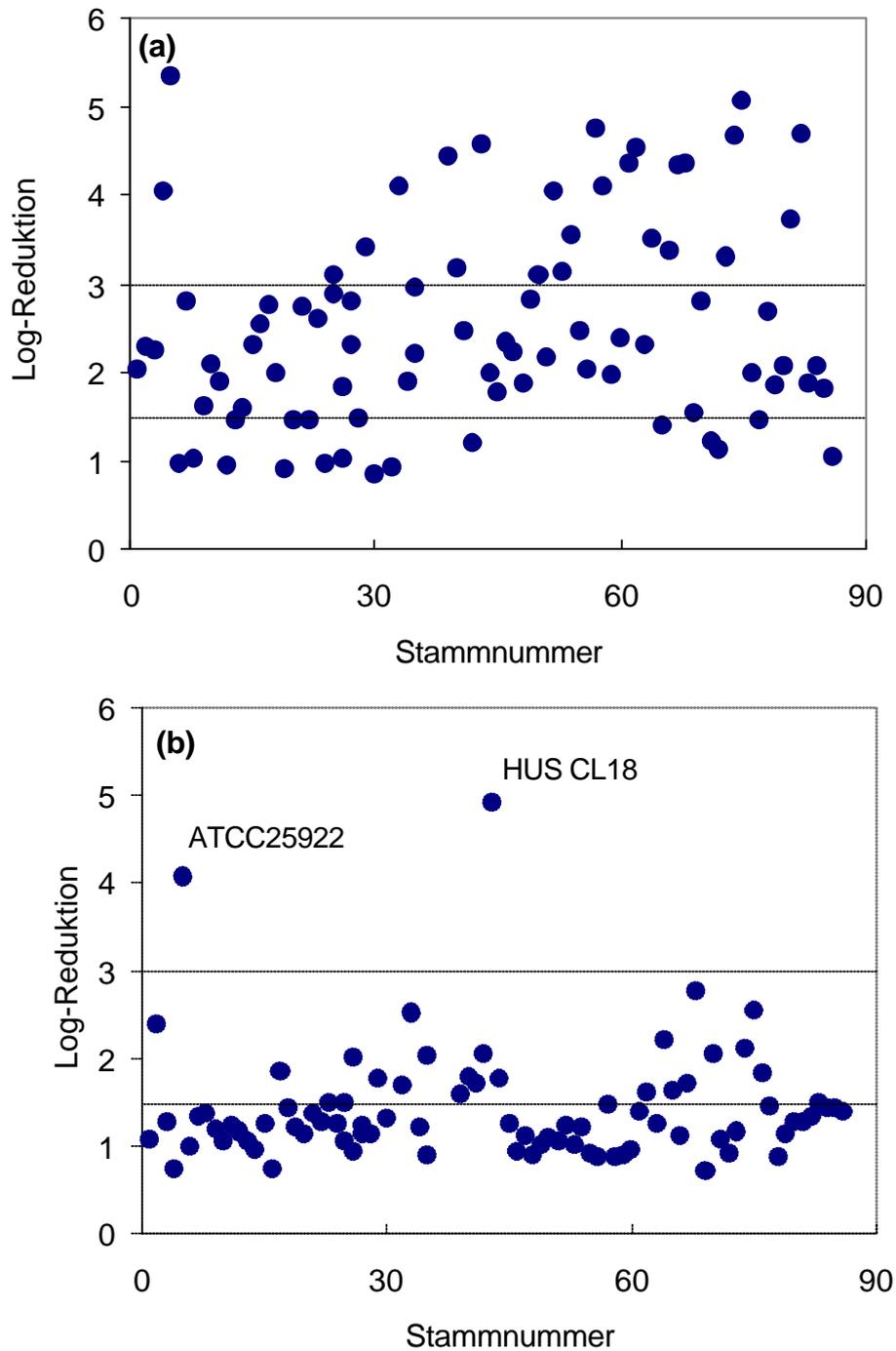


Abb.4-1: Säureresistenzantwort von 86 *Escherichia coli* Stämmen. Die Überlebensrate wurde nach 2-stündigem Säureschock im EG-Medium (pH 2,5) berechnet. Die Stämme wurden vorher entweder (a) in neutralen EG-Medium (pH 7,0) für die Kontrolle oder (b) in LB-MES-Medium (pH 5,5) für das Oxidativsystem kultiviert. Jeder Punkt stellt den Mittelwert der Log-Reduktion jedes Stammes aus mindestens zweifachem Wiederholungsansatz dar.

log nach dem Säuretest reduzierte, wurden als resistent klassifiziert. Die Stämme mit einer Reduktion zwischen 1,5 und 3 log wurden als schwach resistent definiert und jene mit einer Reduktion von mehr als 3 log als sensibel. Insgesamt waren 73,3% (63 Stämme) der geprüften Stämme (N=86) resistent im Säuretest, 24,4% (21 Stämme) waren schwach resistent, und 2,3% (2 Stämme) waren sensibel. Die Mehrheit der Stämme war somit in der Lage, über das Oxidativsystem ihre Säureresistenz zu erlangen.

Der Einfluss der Kultivierungsmedien auf die Säureresistenzantwort wurde durch einen Vergleich der Überlebensrate im Oxidativsystem mit dem in der Kontrolle überprüft (Tabelle 4-2). Die Stämme, die vorher in saurem Komplexmedium (LB-MES) adaptiert wurden, zeigten eine um mehr als 1 log verbesserte Überlebensrate nach dem Säuretest als jene Stämme, die vorher in neutralem Minimalmedium kultiviert wurden. Der Einfluss der Vorkultivierungsbedingungen auf das Säureverhalten von *E.coli* war signifikant ( $P < 0,001$ ).

Tabelle 4-2. Säureresistenzantwort von *E.coli*-Stämmen in Abhängigkeit von den Vorkultivierungsbedingungen

Bezeichnung	Kultivierung <sup>1</sup>		Säuretest in EG-Medium ( pH2,5, 2 Std.)		
			Anzahl		Log-Reduktion <sup>2</sup>
	Medium	pH	Stämme	Wiederholung	(S.E. <sup>3</sup> )
Oxidativsystem	LB-MES	5,5	86	248	1,4 (0,1) A
Kontrolle	EG	7,0	86	270	2,5 (0,1) B

<sup>1</sup> Die Stämme wurden vor dem Säuretest über Nacht bei 37°C entweder in saurem Komplexmedium (LB- MES) oder in neutralem Minimalmedium (EG) kultiviert.

<sup>2</sup> Mittelwerte mit unterschiedlichen Buchstaben in einer Spalte (z.B. A, B) kennzeichnen signifikante Differenzen ( $P < 0,001$ )

<sup>3</sup> Standardfehler

Der paarweise Vergleich der Überlebensraten eines einzelnen Stammes im Oxidativsystem mit dem im Kontrollansatz zeigte einen variierenden Induktionsgrad der durch das Oxidativsystem vermittelten Säureresistenz bei den *E.coli* Stämmen. Der Induktionsgrad, d.h. die Differenz der Log-Reduktion bei dem Oxidativsystem und bei der Kontrolle, lag im Bereich von -0,8 log und 3,3 log. Die gesamten Stämme wurden mit Hilfe einer Clusteranalyse ihrem Induktionsgrad entsprechend einer der 3 Kategorien, wenig induzierbar, induzierbar oder stark induzierbar zugeordnet (Tabelle 4-3). Fast zwei Drittel der Stämme wurden als „induzierbar“ oder „stark induzierbar“ klassifiziert. Die meisten Stämme erlangten also durch die Adaptation in mild gesäuertem Komplexmedium eine verbesserte Säureresistenzantwort.

Im Folgenden wurden nur die Stämme, die eindeutig resistent oder sensibel in ihrer Säureresistenzantwort waren, unter Berücksichtigung ihres Induktionsgrades weiter charakterisiert. Entsprechend ihres Säureverhaltens charakterisierte Stämme sind beispielhaft in Abbildung 4-2 dargestellt.

Induzierbar resistent (pH<sub>ir</sub>) waren Stämme, die hinsichtlich ihrer Überlebensrate im Oxidativsystem resistent waren und einen induzierbaren oder stark induzierbaren Induktionsgrad hatten. Wie in Abbildung 4-2 dargestellt, wurde sowohl Stamm 98-04391 als auch Stamm K15.7 als induzierbar resistent klassifiziert. Diese Stämme benötigten das Oxidativsystem zur Erlangung der

Tabelle 4-3. Induktionsgrad der Säureresistenz durch das Oxidativsystem in *E.coli*

Kategorie <sup>1</sup>	Anzahl der Stämme (%)
Wenig induzierbar	27 (31,4)
Induzierbar	41 (47,7)
Stark induzierbar	18 (20,9)

<sup>1</sup> Für die Gruppierung nach dem Induktionsgrad wurde eine Clusteranalyse durchgeführt. Die 3 Gruppen unterschieden sich hochsignifikant ( $P < 0,001$ ). Die Klassen wurden folgendermaßen definiert:  $< 0,5$ , wenig induzierbar;  $0,5$  bis  $2$ ; induzierbar;  $= 2$ , stark induzierbar.

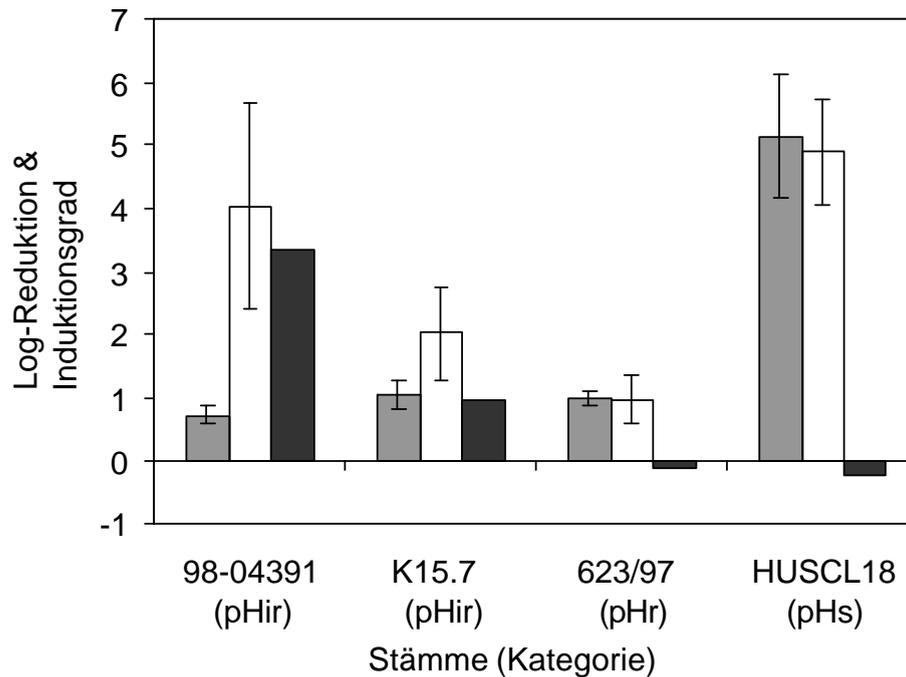


Abb. 4-2. Charakterisierung der Stämme hinsichtlich ihrer Säureresistenzantwort. Vor dem Säuretest (pH 2,5, 2 Std.) wurden die Stämme entweder in LB-MES (pH 5,5) für das Oxidativsystem (hell gefüllte Säule) oder in EG-Medium (pH 7) für die Kontrolle (leere Säule) aktiviert. Die Fehlerbalken stellen Standardabweichungen dar. Der Induktionsgrad (dunkel gefüllte Säule) stellt die Differenz der Log-Reduktion zwischen Oxidativsystem und Kontrollansatz dar (pHir, induzierbar säureresistent; pHr, inhärent säureresistent; pHs, säuresensibel).

Säureresistenz, aber in unterschiedlichen Maße, d.h. ihr Induktionsgrad war unterschiedlich. Zu dieser Gruppe gehörten 36 (41,9 %) der Stämme.

13 Stämme (15,1 %) erwarben Säureresistenz durch das Oxidativsystem, aber benötigten keine Induktion zur Erlangung der Resistenz. Derartige Stämme wie z.B. Stamm 623/97 in Abb. 4-2, wurden als inhärent resistent (pHr) kategorisiert.

Schließlich zeigten 2 Stämme, der VTEC-Stamm HUS CL18 und der *E.coli* Stamm ATCC25922 (kein VTEC) weder mit dem Oxidativsystem noch im Kontrollansatz Resistenz. Sie wurden ohne Berücksichtigung des Induktionsgrades als säuresensibel klassifiziert. Die Klassifizierung der Stämme entsprechend ihres kombinierten Säureverhaltens erleichterte die Stammauswahl für die Versuche mit den Sauermilcherzeugnissen.

#### 4.1.1.3 Beziehung zwischen Verotoxinbildungsvermögen und Säureresistenz

Die Stämme HUS CL8 und ATCC25922 zeigten eine extreme Säureempfindlichkeit beim Oxidativsystem. Diese zwei Stämme wurden als Ausreißer betrachtet und von der Varianzanalyse ausgeschlossen. Die übrigen *E.coli* Stämme wurden in 2 Gruppen eingeteilt (VTEC und nicht-VTEC). Mittels Varianzanalyse wurde das Säureverhalten der zwei Gruppen vergleichend untersucht (Tabelle 4-4). VTEC-Stämme zeigten tendenziell eine höhere Überlebensrate im Oxidativsäureresistenzsystem als nicht-VTEC-Stämme, aber der Unterschied zwischen den zwei Gruppen war nicht signifikant ( $P > 0,05$ ). Das Maß, in dem die Säureresistenz durch das Oxidativsystem im Vergleich zur Kontrolle induziert wurde, d.h. der Induktionsgrad, war auch nicht signifikant unterschiedlich zwischen den beiden Gruppen. Ein signifikanter Einfluss des Toxinbildungsvermögens auf das Säureverhalten von *E.coli* war somit nicht feststellbar.

Tabelle 4-4. Säureverhalten der VTEC- und der nicht-VTEC -Stämme

Bezeichnung	Anzahl der Stämme	Anzahl der Wiederholung	Gruppenmittelwert (S.E.) <sup>1</sup>	
			Log-Reduktion <sup>2</sup>	Induktionsgrad <sup>3</sup>
VTEC	64	195	1,3 (0,1)	1,1 (0,1)
nicht-VTEC	20	53	1,5 (0,1)	1,2 (0,2)

<sup>1</sup> Die Mittelwerte und die Standardfehler des Mittelwerts (S.E.) wurden für jede Gruppe berechnet.

<sup>2</sup> Zellen wurden in LB-MES-Medium (pH5,5) für das Oxidativsystem kultiviert. Die Log-Keimzahl direkt nach dem Säureschock (pH 2,5, 2 Std.) wurde von der logarithmierten Ausgangskeimzahl subtrahiert.

<sup>3</sup> Die Log-Reduktion im Oxidativsystem wurde von der Log-Reduktion in der Kontrolle subtrahiert.

#### **4.1.2 Zytotoxizität**

##### **4.1.2.1 Effekt von Verotoxin auf Verozellen**

Das Toxin jedes VTEC-Stammes wurde durch Filtrierung der Kulturüberstände gewonnen und dessen zytotoxischer Effekt auf Verozellen wurde mikroskopisch beobachtet. In Abb. 4-3. ist als ein Beispiel die Zytotoxizität von Stamm EDL933 dargestellt. Die morphologischen Veränderungen der Zellen reichten von Abrundung und Schrumpfung der Zellen, Abtrennung der Zellen, bis hin zu Lysis und Vakuolenbildung. Beobachtet wurde immer eine progressive Erhöhung der Toxizität im Verlauf der Inkubationsdauer, aber der zytotoxische Effekt der verschiedenen VTEC-Stämme variierte. Während einige der aus den Stämmen gewonnenen Toxine schon innerhalb von 24 Stunden eine erkennbare Wirkung auf Verozellen zeigten, wirkten andere Toxine langsamer, sie steigerten ihre Toxizität über einem Zeitraum von bis zu 4 Tagen.

##### **4.1.2.2 Bestimmung der Zytotoxizität von VTEC-Stämmen**

Die Zytotoxizität des Toxinpräparats aus jedem VTEC-Stamm auf die Verozellen wurde mit Hilfe des MTT-Tests quantifiziert. In Abb. 4-4 (a) ist beispielhaft eine für den MTT-Zytotoxizitätstest angefertigte Verozell-Mikrotiterplatte mit 5 verschiedenen VTEC-Stämmen dargestellt. In der aktive Zellen enthaltenden Negativkontrolle erfolgte eine Transformation vom gelben Tetrazolium (MTT) zu einem lilafarbenen Formazan. In den Blanks fand keine Reaktion statt, sie bleiben blass gelb. Die direkte Betrachtung ermöglichte eine grobe Differenzierung der Toxizität in der MTT-Test- Platte. Beobachtet wurde z.B. bei den Toxinen der Stämme 238/97 und 32.1 sogar in der ersten Vertiefung mit der höchsten Toxinkonzentration eine beträchtliche Formazanbildung. Dagegen schien die erste Vertiefung mit der höchsten Toxinkonzentration bei Stamm 97-11467, Stamm 248/97 und Stamm 1272-84 beinahe formazanfrei, was auf eine Zerstörung der meisten Verozellen hinweist. Trotz Unterschieden zwischen den Stämmen war allgemein immer ein Zusammenhang zwischen der Toxinkonzentration und der Formazanbildung zu erkennen. Je niedriger die eingegebene Toxinkonzentration in einer Vertiefung

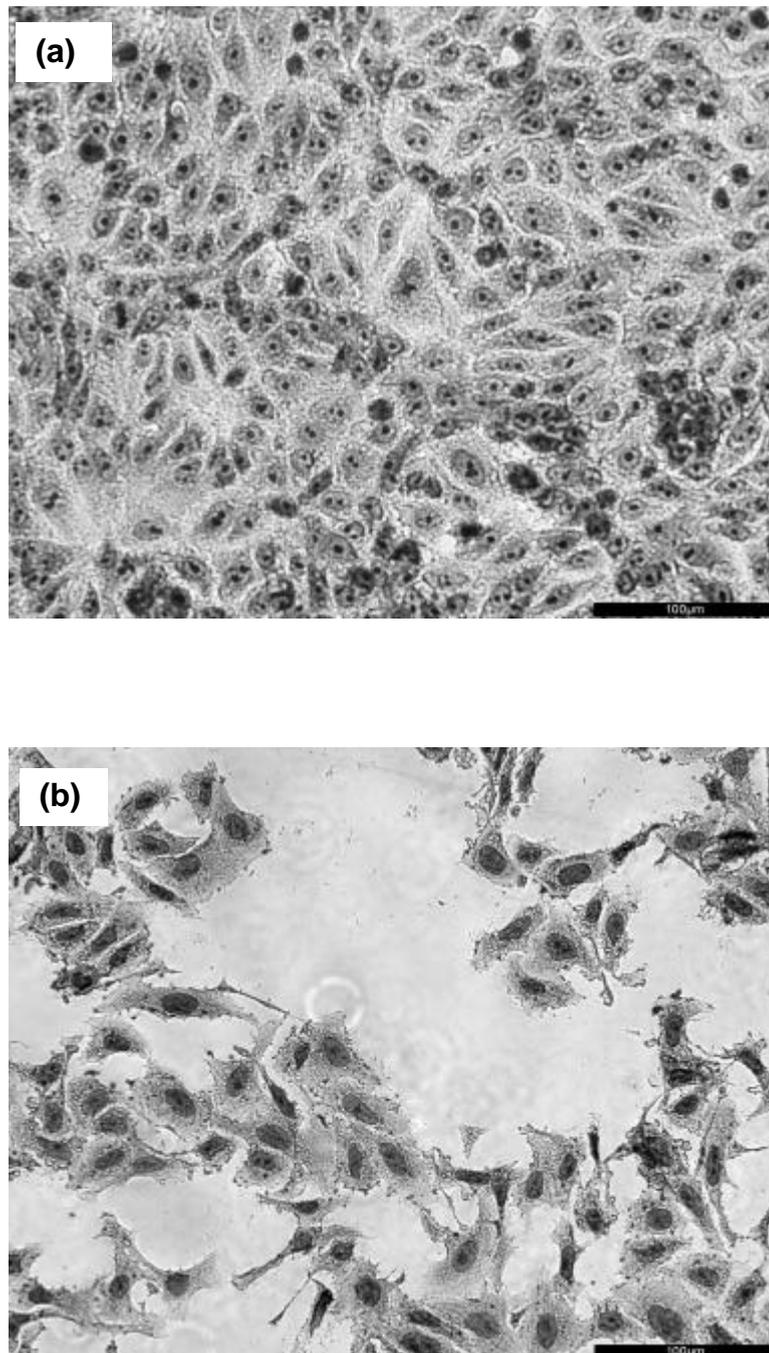


Abb. 4-3. Zytotoxizität von Verotoxin auf Verozellen. Lichtmikroskopie mit Vergrößerungsfaktor X 200. Die intakten Verozellen wurden als Kontrolle mit Giemsa gefärbt (a). Die Übernachtkultur des VTEC- Stamms EDL 933, in mTSB-Bouillon wurde zentrifugiert (17,000 g, für 30 min). Der filtrierte Überstand wurde zum Verozell Monolayer gegeben. Nach 24 Std. wurden die Zellen mit Giemsa gefärbt und fotografiert (b).

---

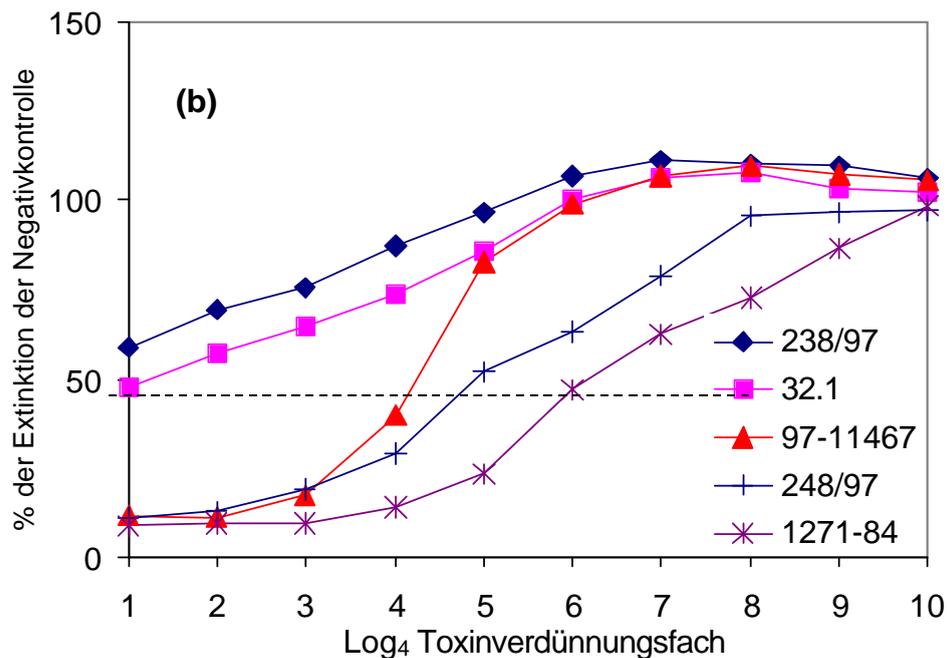
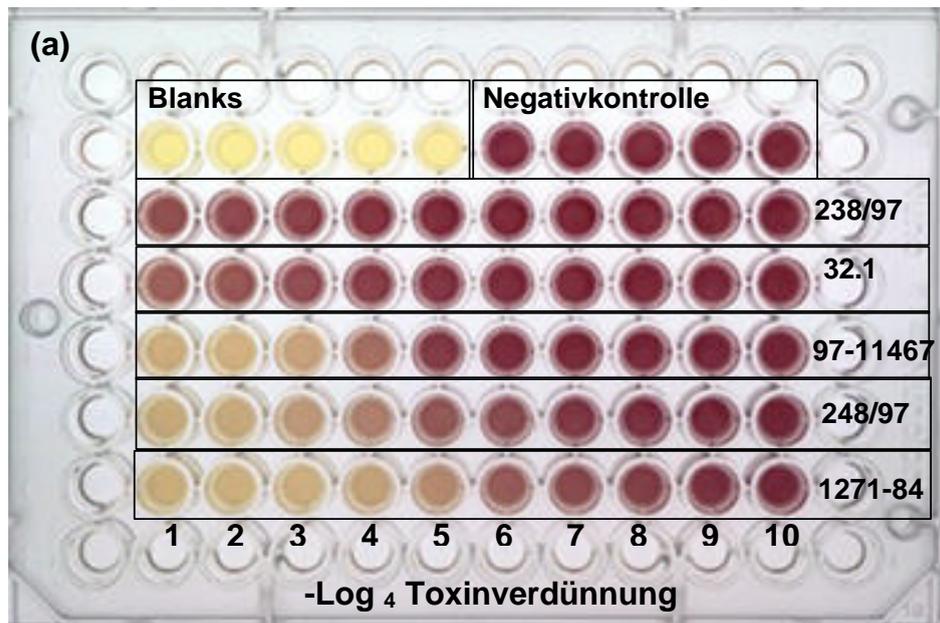


Abb. 4-4. Quantitative Bestimmung der Zytotoxizität verschiedener VTEC-Stamm-Toxine auf Verozellen. 100 $\mu$ l Verozellsuspension ( $4 \times 10^5$  Zellen / ml) und 50 $\mu$ l Toxinverdünnung in PBS wurde zusammen in jede Kavität einer Mikrotiterplatte eingegeben und in 5%  $\text{CO}_2$  bei 37°C für 4 Tage bebrütet. Blanks: 100 $\mu$ l Anzuchtmedium mit 50 $\mu$ l PBS pro Vertiefung. 100 $\mu$ l Zellsuspension mit 50 $\mu$ l PBS wurde für die Negativkontrollen eingegeben. Die Platte wurde nach Eingabe der 20 $\mu$ l MTT-Lösung (5mg/ml in PBS) für 4 Std. weiter bebrütet (a). Photometrische Messung der MTT-Test Platte bei 550 /630 nm. Alle Werte werden in Bezug zur Blank und der Negativkontrolle angegeben (b).

war, d.h. je höher die Toxinverdünnung war, desto mehr lilafarbenes Formazan als Maß der Transformation von MTT wurde gebildet.

In Abb. 4-4 (b) ist die relative optische Dichte nach photometrischer Messung einer MTT-Platte (Abb. 4-4(a)) gegen die Toxinverdünnung dargestellt. Für alle Verotoxine wurden klare Dosis-Wirkungs-Effekte auf Verozellen nachgewiesen. Die relativen Extinktionswerte stiegen mit Erhöhung der Toxinverdünnung und näherten sich dem Wert der Negativkontrolle. Die photometrische Auswertung zeigte, dass alle getesteten Toxinpräparate zytotoxisch waren, aber das Ausmaß der Zytotoxizität war stammabhängig. Der Stamm 238/97 (Herkunft: Hackfleisch) wies das geringste und der Stamm 1271-84 (Mensch) das größte zytotoxische Potential auf. Noch einfacher konnten die Isolate anhand ihrer  $CD_{50}$ , d.h. durch die mit 50% Zytotoxizität übereinstimmende Verdünnung differenziert werden. Die Stämme ließen sich anhand der  $CD_{50}$  in die Reihenfolge Stamm 238/97, 32.1 (Hackfleisch), 97-11467 (Mensch), 248/97 (Rohwurst) und 1271-84 einordnen.

Die zytotoxische Aktivität auf Verozellen der 65 geprüften Stämme variierte (Abb.4-5). Der Stamm 623/97 (Lfd. Nr. 6), der aus einem Lebensmittel isoliert wurde und nur Verotoxin 2 produzieren kann, zeigte die geringste Toxinaktivität auf Verozellen. Dagegen erreichte der Stamm 1271-84 (Lfd. Nr. 40), der von einem Patienten isoliert wurde und die Gene für beide Toxintypen (*vtx1* und *vtx2*) besitzt, den höchsten gemessenen  $CD_{50}$ -Wert. Durch eine Clusteranalyse wurden die ermittelten  $CD_{50}$ -Werte aller Stämme in drei Gruppen klassifiziert. Am häufigsten traten  $\log_4 CD_{50}$ -Werte im Bereich zwischen 3 und 4,5 auf. 35 Stämme (53,8%) gehörten zu dieser Gruppe. 32,3% (21 Stämme) der VTEC-Stämme, deren  $\log_4 CD_{50}$  über 4,5 lag, wurden als stark zytotoxisch klassifiziert. Der Gruppe mit der niedrigsten Zytotoxizität gehörten 9 Stämme (13,8%) an. Ihre  $\log_4 CD_{50}$  war mit Abstand kleiner als bei den anderen Stämmen. 7 dieser Stämme waren Lebensmittelisolate und bisher noch nicht in Verbindung mit Erkrankungen beobachtet worden. Bei ihnen allen wurde nur das Gen für Verotoxin 2 (*vtx2*) und nicht für Verotoxin 1 (*vtx1*) nachgewiesen.

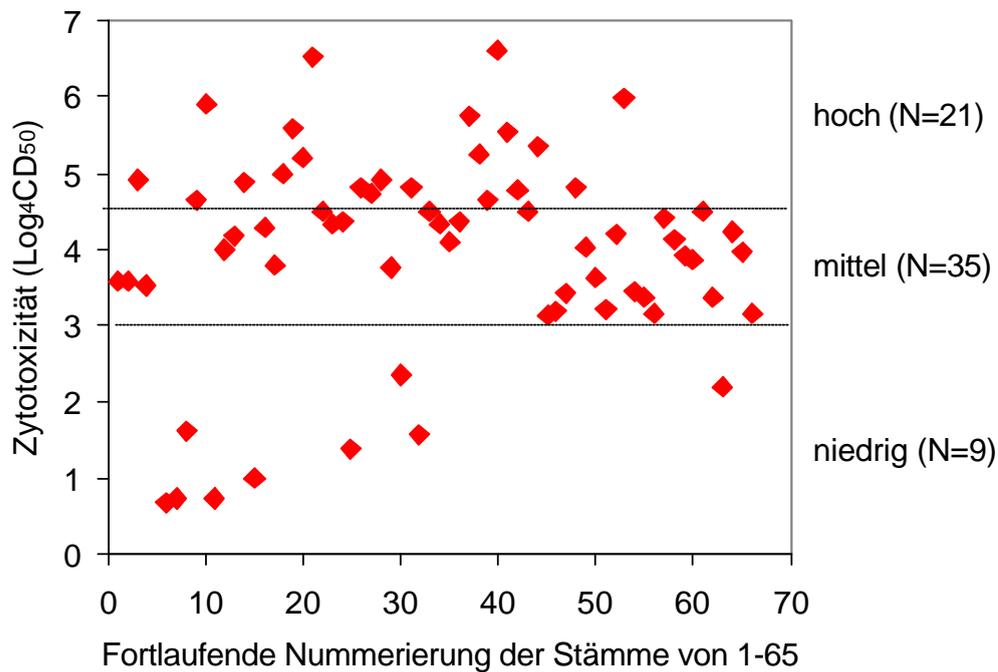


Abb. 4-5. Vero-Zytotoxizität der 65 VTEC-Stämme im MTT-Test. Verozellen wurden mit dem 4fach verdünnten Toxinpräparat für weitere 96 Stunden inkubiert. Die Zytotoxizität jedes Stammes wurde unter Verwendung von MTT bestimmt und als  $CD_{50}$  quantifiziert. Jeder Punkt stellt den Mittelwert der Zytotoxizität ( $\log_4 CD_{50}$ ) jedes Stammes aus mindestens zweifachem Wiederholungsansatz dar.

Weiterhin wurde die Zytotoxizität eines Lebensmittelstamms mit *vtx1&2*-Genen und eines Patientenstamms (*vtx1*) als niedrig klassifiziert. Während 6 der Stämme (66,6%) mit niedriger Zytotoxizität weder *eae*-Gen noch *hly*-Gen besaßen, trug nur einer von 21 VTEC-Stämmen aus Lebensmitteln (4,8%) mit der starker Zytotoxizität keine weiteren Virulenzfaktoren.

### 4.1.3 Zusammenhang zwischen verschiedenen Eigenschaften der VTEC-Stämme

#### 4.1.3.1 Verhältnis der Säureresistenzantwort zur Zytotoxizität

Zunächst wurde eine Korrelationsanalyse nach Pearson durchgeführt, um Hinweis auf eine Beziehung zwischen den drei ermittelten VTEC-Variablen Log-Reduktion beim Oxidativsystem, Induktionsgrad der Säureresistenz und Zytotoxizität zu suchen. Da Stamm HUS CL18 als Ausreißer die Ergebnisse verfälschen könnte, wurde er in dieser Analyse ausgeschlossen. In Abb. 4-6 ist das jeweilige Analysenergebnis mit Scatterplots graphisch veranschaulicht. Es wurden keine Zusammenhänge zwischen den 3 Variablen nachgewiesen. Ein im Vergleich relativ höherer Korrelationskoeffizient ( $r$ ) von 0,23 zeigte sich bei der Analyse der zwei Säureresistenzvariablen des Oxidativsystems (Log-Reduktion vs. Induktionsgrad), aber der Zusammenhang erwies sich nicht als signifikant ( $P > 0,05$ ). Die Säureresistenzantwort von VTEC zeigte auch keine Beziehung zur Zytotoxizität (extrem niedrigen Korrelationskoeffizient). Die drei VTEC-Eigenschaften beeinflussen einander kaum und sind unabhängige Variablen.

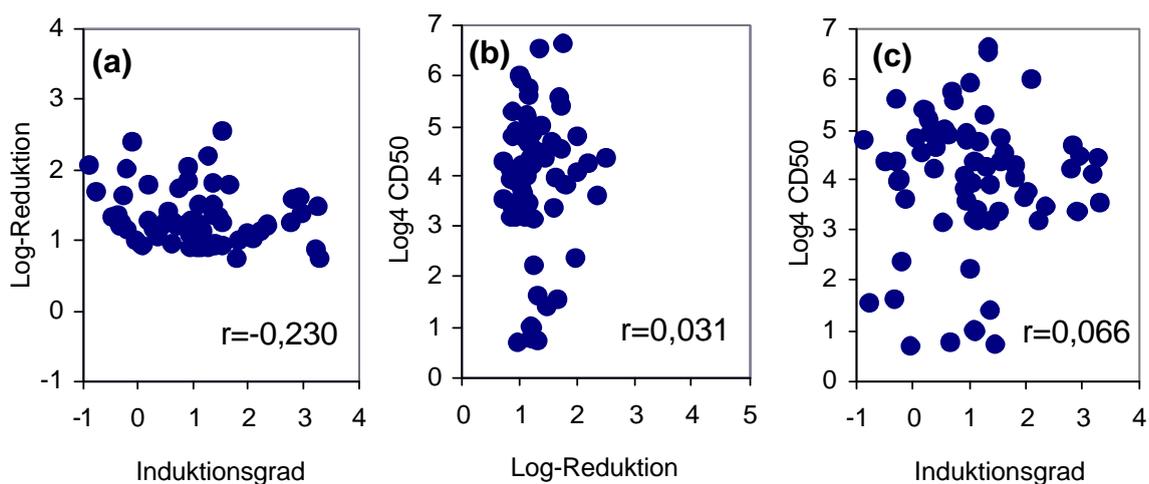


Abb. 4-6. Korrelation zwischen 3 ermittelten Variablen: Überlebensrate im Oxidativsystem vs. Induktionsgrad (a), Überlebensrate vs. Zytotoxizität (b), Induktionsgrad vs. Zytotoxizität (c). Die Korrelationskoeffizienten nach Pearson ( $r$ ) wurden nach dem Ausschluss eines Ausreißers berechnet.

#### 4.1.3.2 Vergleich der Eigenschaften nach Bildung von Untergruppen

Die Zusammenhänge zwischen den verschiedenen Eigenschaften der VTEC wurden im weiteren für verschiedene Untergruppen betrachtet, indem Gruppenmittelwerte miteinander verglichen wurden (Tabelle 4-5). Zuerst wurde die Säureresistenzantwort der aus Lebensmitteln isolierten Stämme jener der von humanen Erkrankten isolierten Stämme gegenübergestellt. Es gab keinen Unterschied zwischen Lebensmittel- und Human-Stämmen hinsichtlich der Log-Reduktion im Säuretest. Betrachtet man jedoch den Induktionsgrad der Säure-

Tabelle 4-5. Vergleich der 3 ermittelten Eigenschaften von VTEC-Stämmen nach Bildung von Untergruppen für die Herkunft, das Toxinsubtyp und Virulenzmerkmalen

Gruppierung	Bezeichnung	Anzahl der Stämme	Gruppenmittelwert (S.E) <sup>1,9</sup>		
			Säureresistenzantwort Log-Reduktion <sup>2</sup>	Induktionsgrad <sup>3</sup>	Zyto-toxizität <sup>4</sup>
Herkunft	Human	29	1,4 (0,1)	1,6 (0,2) A	4,1 (0,2)
	Lebensmittel	36	1,4 (0,1)	0,6 (0,1) B	3,9 (0,2)
Toxintyp <sup>5</sup>	<i>vtx1</i>	24	1,1 (0,1) C	1,7 (0,2) E	3,8 (0,3) G
	<i>vtx2</i>	23	1,4 (0,1) C,D	0,6 (0,2) F	3,5 (0,2) G
	<i>vtx1&amp; 2</i>	18	1,6 (0,1) D	0,8 (0,2) F	4,9 (0,3) H
<i>eae</i> <sup>6</sup>	Positiv	31	1,4 (0,1)	1,4 (0,2) I	3,9 (0,2)
	Negativ	34	1,4 (0,1)	0,8 (0,2) J	4,1 (0,2)
<i>hly</i> <sup>7</sup>	Positiv	48	1,3 (0,1)	1,2 (0,2)	4,3 (0,2) K
	Negativ	17	1,4 (0,1)	0,7 (0,2)	3,1 (0,3) M
Serotyp <sup>8</sup>	human-pathogen	44	1,4 (0,1)	1,1 (0,2)	4,1 (0,2)
	nicht-pathogen	21	1,4 (0,1)	0,9 (0,2)	3,8 (0,3)

<sup>1,2,3</sup> siehe Tabelle 4-4.

<sup>4</sup> Zur Basis 4 logarithmierten Toxinverdünnung bei 50% Zytotoxizität,

<sup>5,6,7</sup> *vtx1*, verotoxin 1-Gen; *vtx2*, verotoxin2-Gen; *vtx1&2*, verotoxin1-Gen und verotoxin2-Gen, *eae*, *E.coli* attaching and effacing-Gen; positiv=vorhanden; negativ= nicht vorhanden; *hly*, EHEC-Hämolysin-Gen

<sup>8</sup> humanpathogen: Die Serotypen (O2, O5, O22, O26, O91, O103, O111, O113, O157, O171), die im Zusammenhang mit einer Erkrankung beschrieben worden sind. nicht-pathogen: übrige Serotypen.

<sup>9</sup> Unterschiedliche Buchstaben in einer Spalte innerhalb jeder Untergruppe (z.B. A, B) kennzeichnen eine signifikante Differenz nach Varianzanalyse (P<0,05).

resistenz, so findet sich ein starker Zusammenhang mit der Herkunft ( $P < 0,01$ ). Während die Human-Stämme nach einer Adaptation in milder Säure eine erheblich verbesserte über das Oxidativsystem vermittelte Säureresistenz zeigten, war dies bei den Lebensmittel-Stämmen nicht der Fall. Die Human-Stämme zeigten eine höhere Zytotoxizität als die Lebensmittel-Stämme, aber dieser Unterschied war nicht signifikant ( $P > 0,05$ ).

Wenn die Verotoxin-Subtypen als Basis der Gruppierung herangezogen werden, können Zusammenhänge zwischen dem vorhandenen Toxintyp, dem Säureverhalten und der Zytotoxizität beobachtet werden. VTEC-Stämme, welche nur Verotoxin 1 (*vtx1*) bilden können, haben eine signifikant größere Säureresistenz und höhere Induktionsgrade als Stämme, die nur Verotoxin 2 (*vtx2*) oder beide Typen des Toxins (*vtx1&2*) produzieren ( $P < 0,05$ ). Die Zytotoxizität der VTEC-Stämme, die beide Subtypen von Verotoxin (*vtx1&2*) bilden können, war deutlich größer ( $P < 0,05$ ) als die der Stämme, die entweder nur den Genotyp *vtx1* oder nur den Genotyp *vtx2* hatten. Einige der Stämme, die nur *vtx2* bilden konnten, hatten äußerst niedrige  $CD_{50}$ -Werte. Die durchschnittliche Zytotoxizität dieser Stämme war geringer als bei anderen.

Weiterhin wurde der Einfluss des Vorhandenseins von Virulenzmerkmalen, wie dem „*E.coli* attaching and effacing“-Gen (*eae*) und dem EHEC-Hämolyisin-Gen (*hly*) auf andere Eigenschaften geprüft. Beobachtet wurde ein Zusammenhang zwischen *eae* und dem Induktionsgrad. Die Überlebensrate der *eae*-positiv-Stämme wurde im Säuretest mehr von den Vorkultivierungsbedingungen beeinflusst als die der *eae*-negativ-Stämme ( $P < 0,01$ ). Die Zytotoxizität der VTEC-Stämme stand im Zusammenhang mit dem EHEC-Hämolyisin-Gen. Die *hly*-positiven-Stämme hatten eine signifikant höhere Zytotoxizität als die *hly*-negativen-Stämme ( $P < 0,01$ )

Die in der Studie geprüften VTEC-Stämme gehörten insgesamt 19 verschiedenen Serotypen an. 10 der Serotypen, die schon einmal in der Literatur im Zusammenhang mit einer Erkrankung beschrieben worden waren, wurden der Untergruppe „humanpathogen“ zugeordnet. Die Stämme mit humanpathogenen Serotypen hatten tendenziell einen höheren Induktionsgrad

und eine höhere Zytotoxizität als die Stämme mit nicht-pathogenen Serotypen, der Unterschied war jedoch nicht signifikant ( $P>0,05$ ).

Weiterhin wurden die VTEC nach Serotypen gruppiert und die Eigenschaften einer Varianzanalyse unterzogen (Tabelle 4-6). Die O157-VTEC-Stämme zeigten im Vergleich zu anderen Serogruppen die geringste Überlebensrate. Der einzige äußerst säuresensible Stamm gehörte zur O157-Gruppe. Hingegen konnten O103- VTEC-Stämme allgemein am besten bei Säurestress überleben. Signifikant war der Unterschied der Säureresistenzantwort nach Duncan's Test nur zwischen den Serotypen O103 und O157 ( $P<0,05$ ). Außerdem konnte ein Zusammenhang zwischen den Serotyp und dem Induktionsgrad der Säureresistenz festgestellt werden ( $P<0,01$ ). Für O26-Stämme und O22-Stämme wurde der größte beziehungsweise der kleinste Induktionsgrad ermittelt. Zwischen Serotyp und Zytotoxizität von VTEC konnte kein Zusammenhang beobachtet werden. Bei O157-Stämmen war die Toxizität am höchsten, der allerdings nicht signifikant ( $P>0,05$ ).

Tabelle 4-6. Vergleich der ermittelten Eigenschaften der Serotypen

Serotyp (O-Gruppe)	Anzahl der Stämme	Gruppenmittelwert (S.E) <sup>1,6</sup>		
		Säureresistenzantwort		Zytotoxizität <sup>4</sup>
		Log-Reduktion <sup>2</sup>	Induktionsgrad <sup>3</sup>	
O6	3	1,1 (0,2) A,B	0,4 (0,5) C	3,9 (0,8)
O22	4	1,2 (0,2) A,B	0,2 (0,5) C	4,6 (0,7)
O26	5	1,1 (0,2) A,B	2,4 (0,4) D	4,2 (0,6)
O91	6	1,5 (0,1) A,B	0,6 (0,4) C	4,1 (0,5)
O103	15	1,0 (0,1) A	1,5 (0,2) C,D	3,6 (0,3)
O111	2	1,6 (0,2) A,B	1,0 (0,6) C	3,1 (0,9)
O116	2	1,4 (0,2) A,B	1,6 (0,6) C,D	4,8 (0,9)
O157	9	1,9 (0,2) B	0,5 (0,3) C	4,9 (0,4)
Andere <sup>5</sup>	19	1,4 (0,1) A,B	1,0 (0,2) C	3,7 (0,3)

<sup>1,2,3,4</sup> siehe Tabelle 4-5.

<sup>5</sup> Serotypen, die nur einmal vorkamen oder Isolate, die nicht typisierbar waren. Unterschiedliche Buchstaben in einer Spalte (z.B. A, B) kennzeichnen eine signifikante Differenz zwischen den Gruppen nach der Varianzanalyse ( $P<0,05$ ).

#### 4.1.3.3 Modell für die Schätzung der Erkrankungswahrscheinlichkeit durch einen VTEC

Nach der Charakterisierung der VTEC-Stämme hinsichtlich verschiedener Virulenzeigenschaften wurde der Einfluss dieser Merkmale ( $X_1, X_2, \dots, X_7$ ) auf eine Zielvariable (Y), die Erkrankung, überprüft. Definiert ist die Zielvariable Y durch die Herkunft des jeweiligen Isolates (human oder Lebensmittel). Durch die bisherigen Ergebnisse ist bekannt, dass sich die pathogenen und nicht-pathogenen Stämme nicht hinsichtlich der Log-Reduktion im Säuretest unterscheiden (Tabelle 4-5). Deshalb wurde die Überlebensrate als Virulenzfaktor für das Modell ausgeschlossen. Die Erstellung des Modells zur Schätzung der Erkrankungswahrscheinlichkeit über eine multiple logistische Regressionsanalyse ist in Tabelle 4-7 dargestellt. Bei Klassifizierung der Schätzung für die Erkrankungswahrscheinlichkeit (p) für einen VTEC-Stamm mit einem Wert von  $>0,5$  als Erkrankung verursachend (=krankheitserregend),

Tabelle 4-7. Multiple logistische Regressionsanalyse für die Erkrankungswahrscheinlichkeit

Unabhängige Variablen <sup>2</sup>	Modell <sup>1</sup> : abhängige Variable = $\log(p/(1-p))$			
	$\beta$	S.E.	P-Wert	O.R. <sub>j</sub>
<i>vtx1</i>	- <sup>3</sup>	-	-	-
<i>vtx2</i>	-2,29	1,09	0,0351	0,1009
<i>eae</i>	2,27	0,99	0,0220	9,7035
<i>hly</i>	-	-	-	-
Serotyp	2,83	1,38	0,0403	16,8630
Induktionsgrad	1,53	0,63	0,0154	4,6062
Zytotoxizität	-	-	-	-
Konstante	-3,48	1,56	0,0256	

<sup>1</sup> Das Modell wurde unter Anwendung von Rückwärtseliminierung mit 5 % Signifikanzgrenze erstellt.  $\beta$ , Regressionskoeffizient; S.E., Standardfehler; P-Wert, Signifikanzniveau; O.R.<sub>j</sub>, adjustierte Odds Ratio.

<sup>2</sup> *vtx1*, *vtx2*, *eae*, *hly* (vorhanden 1, nicht vorhanden 0); Serotyp (humanpathogen, 1, nicht-pathogen, 0), Induktionsgrad und Zytotoxizität (siehe Tabelle 4-5).

<sup>3</sup> Nicht signifikante Eigenschaften ( $P > 0,05$ ), wurden aus dem Endmodell entfernt.

(Rate korrekter Klassifikationen=84,6%)

konnte das Modell 55 Stämme (84,6%) korrekt als krankheitserregend oder nicht vorhersagen. Jeweils 5 Stämme wurden falsch positiv oder falsch negativ eingeschätzt.

Beim Rückwärtseliminations-Prozess wurden die 3 Faktoren *vtx1*, Zytotoxizität und *hly* schrittweise aus dem Modell entfernt, denn sie hatten keinen signifikanten Einfluss auf die Erkrankungswahrscheinlichkeit. Die Ergebnisse zeigen, dass das Vorhandensein des *vtx2*-Gens und des *eae*-Gens, die Zugehörigkeit zur potentiell humanpathogenen Serogruppe und der Induktionsgrad der Säureresistenz signifikant die Erkrankungswahrscheinlichkeit beeinflussen. Die Regressionskoeffizienten belegen die positiven Effekte des *eae*-Gens, des humanpathogenen Serotyps und des Induktionsgrades der Säureresistenz auf die Erkrankungswahrscheinlichkeit. Das Vorhandensein des *eae*-Gens, eines humanpathogenen Serotyps und eines hohen Induktionsgrades ist somit eng mit der Verursachung einer Erkrankung verbunden. Dagegen zeigte *vtx2* einen negativen Effekt.

Die Stärke des Effekts eines jeden Faktors lässt sich mit Hilfe eines nach den anderen Variablen adjustierten Odds Ratio (O.R.<sub>j</sub>) des Regressionskoeffizienten angeben. So war z.B. die O.R.<sub>j</sub> der Variable *eae* 9,7. Die Erkrankungswahrscheinlichkeit ist somit für *eae*-positive Stämme fast 10-fach höher als für *eae*-negative Stämme. Die O.R.<sub>j</sub> des potentiell humanpathogenen Serotyps war mit 16,8 noch größer, diese Eigenschaft beeinflusst entscheidend die Erkrankungswahrscheinlichkeit. Bei der O.R.<sub>j</sub> der stetigen Variable des Induktionsgrades der Säureresistenz erhöht sich bei einem Anstieg des Induktionsgrades um eine Log-Stufe die Wahrscheinlichkeit, eine Erkrankung zu verursachen, um den Faktor O.R.<sub>j</sub>=4,6.

Abb. 4-7 zeigt weiterhin eine Simulation für das Verhältnis zwischen Induktionsgrad und Erkrankungswahrscheinlichkeit (p) im Vergleich mit allen anderen Kombinationen signifikanter Variablen. Eine Zunahme des Induktionsgrades führte generell zu einer Erhöhung der Erkrankungswahrscheinlichkeit, aber die Größe des Effektes variierte je nach der Kombination der anderen Variablen. Stämme mit *eae*-Gen, aber ohne *vtx2*-

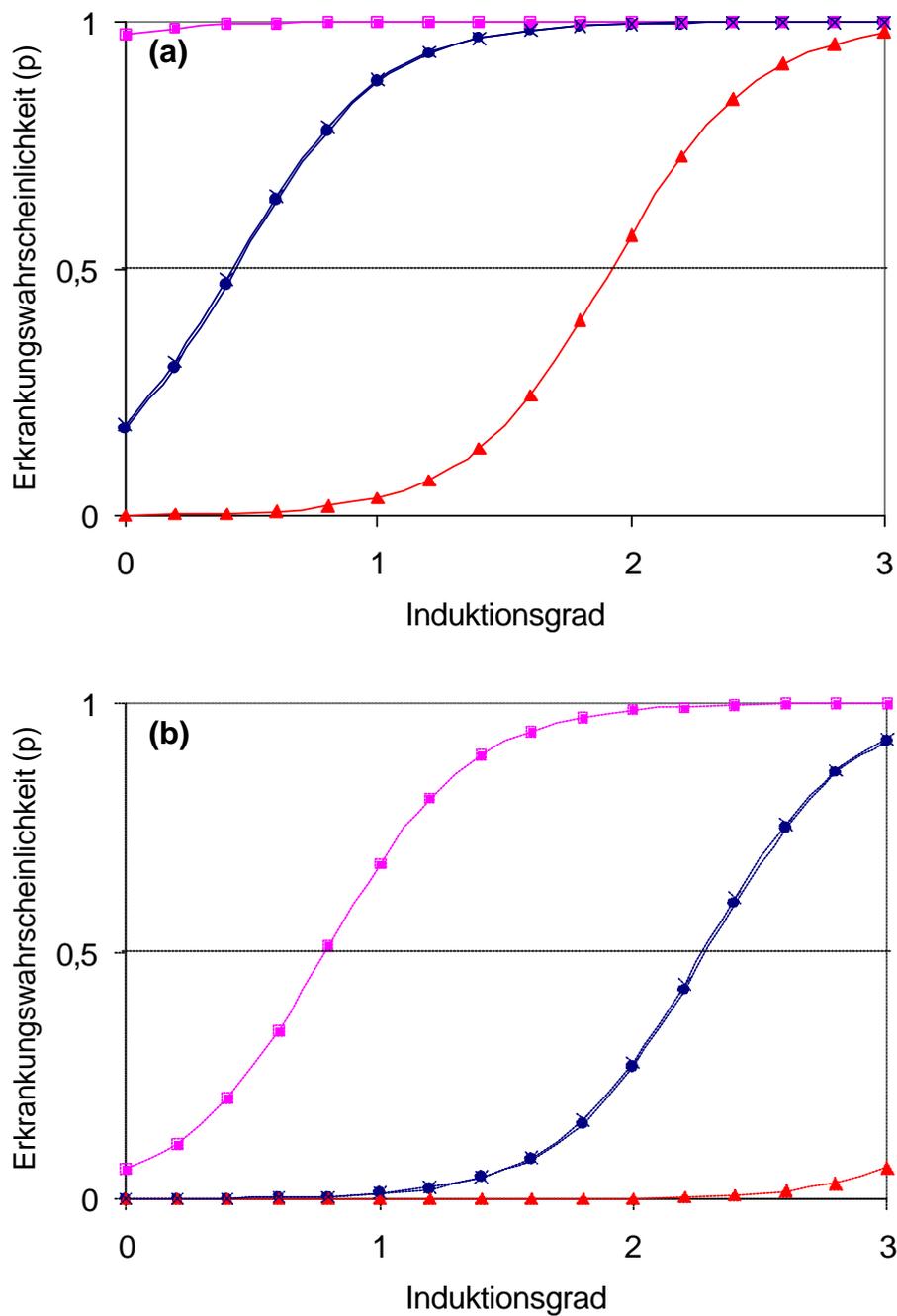


Abb. 4-7. Die simulierte Erkrankungswahrscheinlichkeit von VTEC-Stämmen, die zu potentiell humanpathogenen Serogruppen gehören (a) und von Stämmen, die der nicht-pathogenen Serogruppe angehörten (b). Weiterhin wurden die Stämme nach dem Vorhandensein von *vtx2* und von *eae* klassifiziert: *vtx2*- positiv und *eae*-positiv (●), *vtx2*-positiv und *eae*-negativ (▲), *vtx2*-negativ und *eae*-positiv (■) und *vtx2*-negativ und *eae*-negativ (x).

Gen zeigten ohne Rücksicht auf den Induktionsgrad eine sehr hohe Erkrankungswahrscheinlichkeit (p-Wert von fast 1). Im Gegenteil scheinen die Stämme, die kein *eae*-Gen haben und nur das *vtx2*-Gen besitzen, kaum Erkrankungen zu verursachen. Abgesehen von der Gruppierung nach Serotyp unterschied sich der Verlauf des Induktionsgrades kaum zwischen den Stämmen, die sowohl *eae* als auch *vtx2* positiv waren und jenen, die weder das *eae*- noch das *vtx2*-Gen besaßen.

## **4.2 HERSTELLUNG UND LAGERUNG VON MIT VTEC-STÄMMEN KONTAMINIERTEN SAUERMILCHERZEUGNISSEN**

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung des Verhaltens von VTEC-Stämmen, die bereits in Kap. 4.1. hinsichtlich ihrer Säureresistenzantwort charakterisiert wurden, in Sauermilcherzeugnissen. Weiter wurde der Einfluss von verschiedenen Parametern auf das Verhalten von VTEC geprüft.

### **4.2.1 Herstellung und Lagerung von Sauermilcherzeugnissen aus VTEC-kontaminierter Milch mit hohem Kontaminationsniveau**

#### **4.2.1.1 Gesamtuntersuchungsergebnisse von Joghurtherzeugnissen mit thermophilen Starterkulturen**

##### **4.2.1.1.1 Klassischer Joghurt**

Durch Vergärung mit einer prosymbiotischen, gemischten Starterkultur aus *Streptococcus thermophilus* und *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* wurden klassische stichfeste Joghurt hergestellt. Die Untersuchungsparameter sind in Abbildung 4-8 zusammengefasst dargestellt.

Der pH-Wert fiel während der 5 Stunde Fermentationszeit von 6,7 auf 4,6. Zwischen der dritten und der vierten Stunde war die Säuerungsrate am größten, der pH- Wert sank pro Stunde um 0,9. Während der anschließenden Kühlagerung bei +7°C stabilisierte sich der pH-Wert innerhalb von 3 Tagen auf einem Wert von 4,2 und veränderte sich danach kaum.

Die Keimzahlen von *S.thermophilus* und *L.bulgaricus* lagen unmittelbar nach Zugabe der Starterkultur bei 5,5 und 6,2 log KbE/g. Die Bakterienarten vermehrten sich während der Fermentation in unterschiedlicher Weise. *S.thermophilus* zeigte eine typische sigmoide Wachstumskurve mit einem maximalen Wert von 8,6 log KbE/g bei 4 Std. nach Beginn der Fermentation und zeigte danach kaum noch eine Veränderung bis zum Ende des letzten Lagerungstages. Dagegen begann die Vermehrung von *L.bulgaricus* erst nach 2 Stunden. Die Keimzahl stieg bis zum Ende der Fermentation auf 7,9 log KbE/g an. Im Anschluss an die Fermentation zeigte sich bei *L.bulgaricus* eine

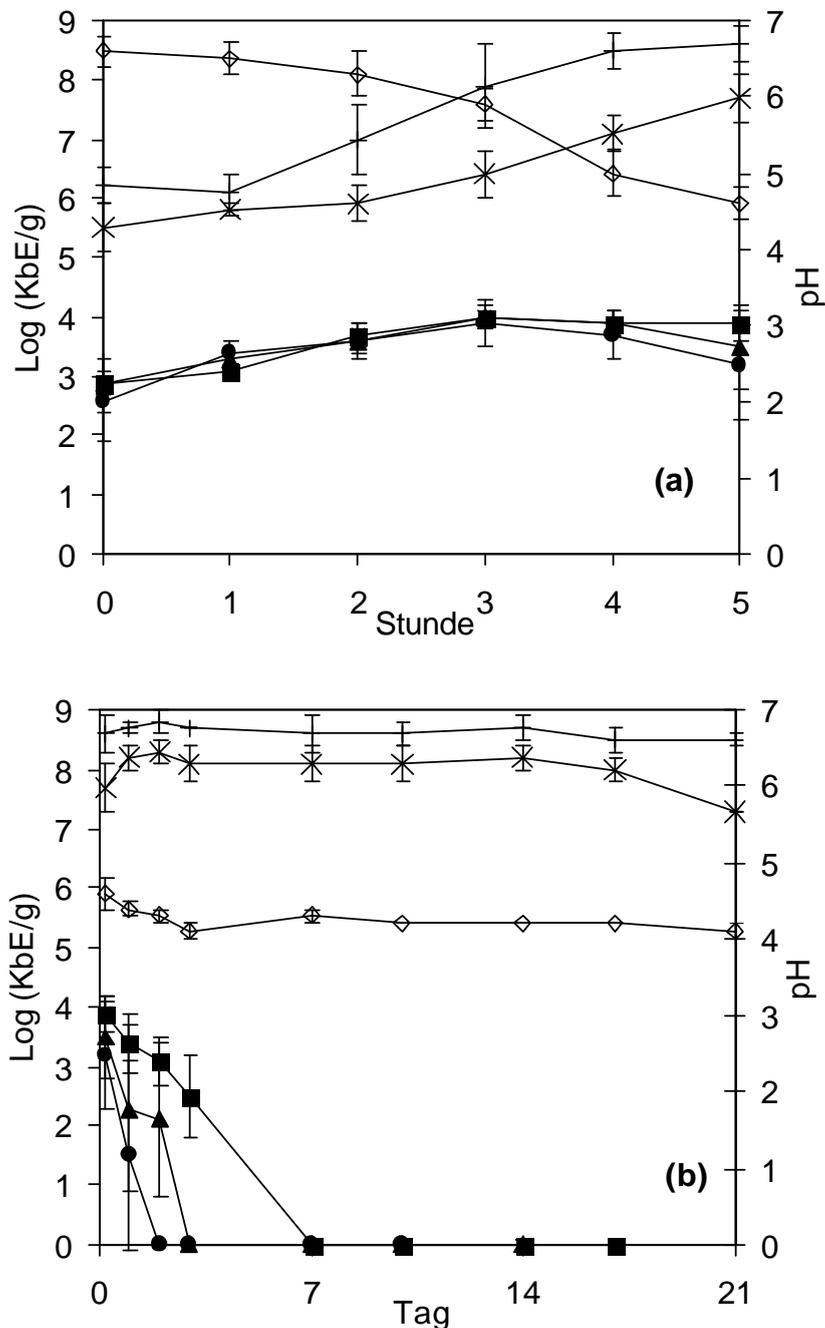


Abb. 4-8. Verlauf der pH-Werte (à), Verhalten von *Lactobacillus delbrueckii* subsp. bulgaricus (x) und von *Streptococcus salivarius* subsp. thermophilus (-), Verhalten der VTEC-Stämme 161-84(■), EDL933 (▲), und HUS CL8 (●) während der Fermentation bei +42°C für 5 Stunden (a) und der Lagerung bei +7°C für 21 Tage (b) in klassischem Joghurt. Aus 5 unabhängigen Versuchsreihen wurden jeweils die Mittelwerte und die Standardabweichungen dargestellt. Der Wert 0 log KbE/g wurde für die Keimzahl der Proben eingesetzt, die nicht quantitativ, aber nach der Anreicherung qualitativ nachweisbar waren.

weitere Vermehrung bis zum 1. Lagerungstag um ca. 0,5 log KbE/g. Danach veränderte sich die Keimzahl unter Kühlbedingungen kaum.

Der Keimgehalt der 3 VTEC-Stämme mit einer Zunahme von ca. 1 log KbE/g Joghurt erreichte 3 Stunden nach Beginn der Fermentation den höchsten Wert, wobei die Stämme ein einheitliches Wachstum aufwiesen. Erst danach verhielten sich die 3 Stämme geringfügig unterschiedlich. Die Keimzahl des Stammes HUS CL8 verminderte sich allmählich bis zum Ende der Säuerungsphase. Der Stamm EDL933 zeigte ebenfalls eine geringe Absterberate, während die Keimzahl des Stammes 161-84 bis zum Ende der Fermentation auf demselben Niveau blieb. Die Überlebensdauer von VTEC während der Kühlung war stammabhängig. Der induzierbar säureresistente Stamm 161-84 wurde nach Anreicherung noch am 17. Lagerungstag nachgewiesen, wohingegen der säuresensible Stamm HUS CL8 nur bis zum 10. Lagerungstag isoliert werden konnte. Die Überlebensfähigkeit des inhärent säureresistenten Stammes EDL933 lag in der Mitte. Durch eine einfache lineare Regressionsanalyse wurde die Dezimalreduktionszeit (D- Wert) jedes einzelnen Stammes aus der Überlebenskurve berechnet. Der induzierbar säureresistente Stamm 161-84 hat den signifikant größten D- Wert (2,9 Tage) im Vergleich zum D-Wert des inhärent säureresistenten Stammes EDL933 (1,4 Tage) und des säuresensiblen Stammes HUS CL8 (1,1 Tage) ( $P < 0,05$ ). Damit wurde der Einfluss des Säureverhaltens auf die Überlebensfähigkeit von VTEC in klassischem Joghurt bestätigt.

### 4.2.1.1.2 Joghurt mild

Eine weitere Standardsorte unter den Joghurterzeugnissen stellt Joghurt mild dar. Wie der Name besagt, weist dieser Produkt ein mildes Aroma auf, außerdem überwiegt hier der L-Milchsäureanteil. Zur Herstellung der Produkte wurden der Ausgangsmilch mit den Milchsäurebakterien *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus lactis* und *Bifidobacterium* andere Starterkulturen als bei klassischem Joghurt zugesetzt. Die im Versuch hergestellten Joghurt mild-Produkte waren sehr cremig und wiesen eine hohe

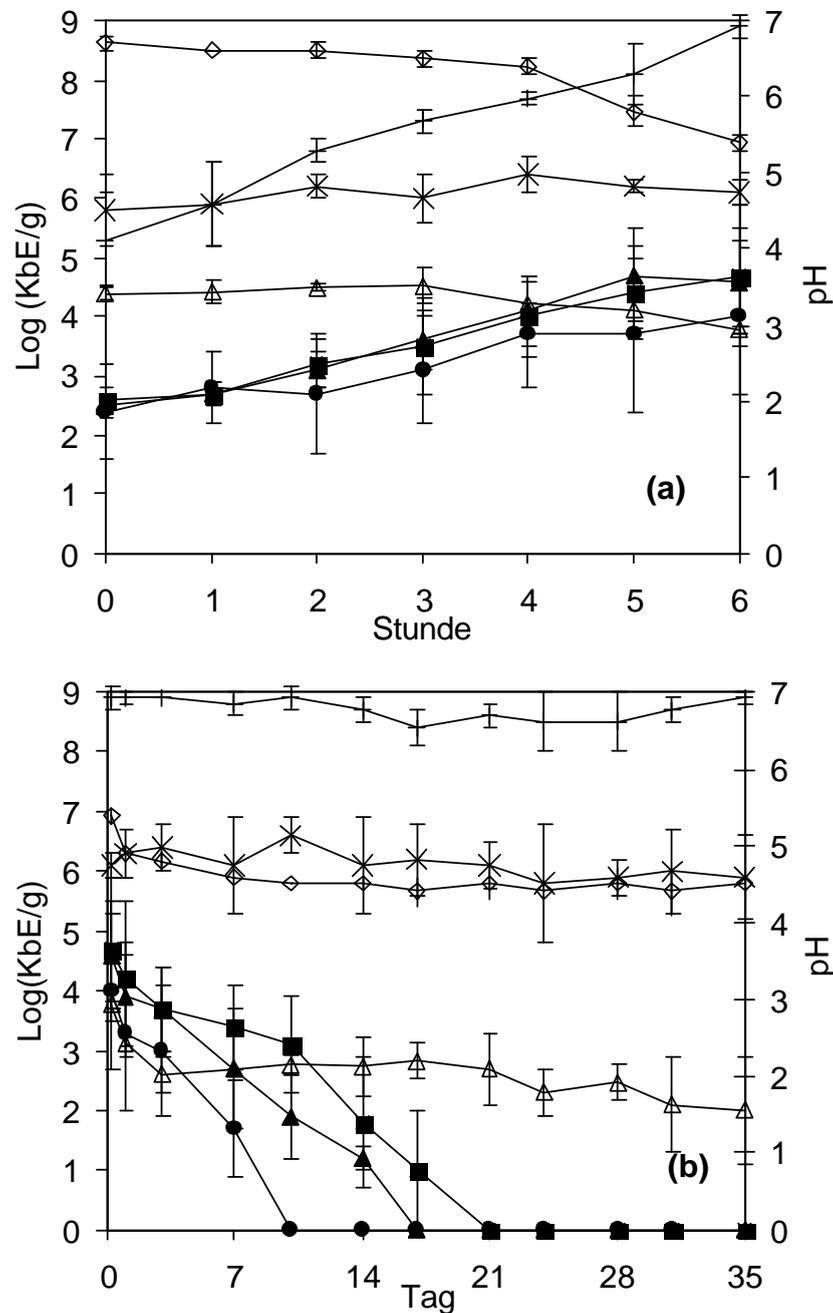


Abb. 4-9. Verlauf der pH-Werte (à), Verhalten von *Lactobacilli* (x), *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* (-), und von Bifidobakterium (Δ) und Verhalten der VTEC-Stämme 161-84 (■), EDL933 (▲), und HUS CL8(●) während der Fermentation bei +42°C für 6 Stunden (a) und der Lagerung bei +7°C für 35 Tage (b) in Joghurt mild. Aus 3 unabhängigen Versuchsreihen wurden jeweils die Mittelwerte und die Standardabweichungen dargestellt. Der Wert 0 log KbE/g wurde für die Keimzahl der Proben eingesetzt, die nicht quantitativ, aber nach der Anreicherung qualitativ nachweisbar waren.

Viskosität auf. In Abb. 4-9 werden die Untersuchungsergebnisse zu Joghurt mild dargestellt.

Bis 4 Std. nach Beginn der Fermentation blieb der pH-Wert unverändert. Danach erfolgte ein Abfall, der am Ende der Fermentation den Wert von 5,4 erreichte. Während der ersten sieben Tage Lagerung im Kühlschrank sank der pH- Wert auf 4,6, danach blieb er stabil. Die Starterkultur für Joghurt mild weist trotz gleicher Fermentationstemperatur einen deutlich unterschiedlichen Säuerungsprozess im Vergleich zu klassischem Joghurt auf.

Direkt vor der Fermentation wurde die Milch mit der Starterkultur, die ca. 5 log KbE Streptokokken, 6 log KbE Laktobazillen und 4 log KbE Bifidobakterien enthielt, versetzt. Im Verlauf der Fermentation stieg die Keimzahl der Streptokokken fast linear bis auf ca. 9 log KbE/g an, während der Keimgehalt an Laktobazillen sich kaum änderte und die Keimzahl der Bifidobakterien sich um 0,5 log KbE/g verringerte. Während des gesamten Lagerungszeitraumes unter Kühlbedingungen veränderte sich die Keimzahl der Streptokokken und der Laktobazillen in Joghurt mild kaum. Dagegen wurde der Keimgehalt der Bifidobakterien bereits innerhalb von 3 Lagerungstagen nahezu bis zur Nachweisgrenze reduziert.

Alle 3 VTEC-Stämme vermehrten sich um ungefähr 1,5 bis 2 log KbE/g während der Fermentation in Joghurt mild. Bereits nach einer Stunde befanden sich der Stamm EDL933 (VTEC-pHr) und der Stamm 161-84 (VTEC-pHir) in der Lag- Phase, danach stieg die Keimzahl fast linear. Der Stamm HUS CL8 (VTEC-pHs) brauchte eine Stunde länger als die beiden anderen. Am Ende der Fermentation erreichten die Keimgehalte des Stammes 161-84 und des Stammes EDL933 ein ähnliches Niveau, während die Keimzahl des Stammes HUS CL8 weniger stark anstieg. Die Unterschiede der Vermehrungsrate während der gesamten Fermentation zwischen den Stämmen waren jedoch nicht signifikant ( $P > 0,05$ ). Während der Lagerung reduzierte sich die Population des Stammes HUS CL8 rasch, sie war ab dem 10. Lagerungstag quantitativ nicht mehr bestimmbar. Im Vergleich dazu zeigten der Stamm 161-84 und der Stamm EDL933 langsamere Absterberaten. Die D-Werte in Joghurt mild lagen bei  $D=5,0$ ,  $D=4,3$ , und  $D=3,3$  Tage für die als pHir, pHr und pHs klassifizierten

VTEC- Stämme. Der Unterschied der D-Werte der Stämme war allerdings nicht signifikant ( $P > 0,05$ ). Alle 3 VTEC-Stämme konnten noch am 30. Lagerungstag nach Anreicherung mit Hilfe der PCR in Joghurt mild nachgewiesen werden. Damit wiesen sie eine wesentlich längere Überlebensdauer in Joghurt mild als in klassischem Joghurt auf.

### 4.2.1.1.3 Probiotischer Joghurt

Als probiotische Bakterien werden diejenigen Bakterienarten bezeichnet, die in ausreichender Menge in aktiver Form in den Darm gelangen und hierbei eine positive gesundheitliche Wirkung erzielen können. Hierzu werden auch Stämme von *L. acidophilus* und *Bifidobacterium* gerechnet, die in der hier eingesetzten Starterkultur in einer hohen Ausgangskeimzahl enthalten waren. Probiotische Joghurts wiesen im Vergleich mit Joghurt mild ebenfalls vorwiegend L-Milchsäure, ein mittleres Joghurtaroma und eine niedrigere Viskosität auf. Die Ergebnisse bei der Herstellung dieser Produkte werden in Abb. 4-10 dargestellt. Bis 6 Std. nach Fermentationsanfang reduzierte sich der pH-Wert fast linear mit der Geschwindigkeit von ca. 0,3 Einheiten pro Stunde, danach wurde die Säuerung langsamer. Am Ende der Fermentation lagen die Werte bei 4,7. Während der anschließenden Lagerung erfolgte eine geringe Nachsäuerung. Der pH- Endwert lag bei ca. 4,4.

Bei der Herstellung von probiotischem Joghurt wurden die Keimzahlen für Streptokokken, Laktobazillen und Bifidobakterien differenziert ermittelt. Die 3 Milchsäurebakterien zeigten zu Beginn der Fermentation ein ähnliches Keimzahlniveau von 7 log KbE/g. Der Ausgangskeimgehalt der Bifidobakterien in diesem Produkt war deutlich höher als im Joghurt mild, stieg aber während der 8 Stunden Fermentation bei +38°C kaum an. Das Keimzahlniveau der Streptokokken dagegen erhöhte sich fast um 2 log KbE/g, das der Laktobazillen um 1 log KbE/ g. Während der gesamten Kühlagerung bei +7°C veränderte sich die Keimzahl der Streptokokken und der Laktobazillen kaum, wohingegen der Keimgehalt der Bifidobakterien nur bis zum 7. Lagerungstag konstant blieb

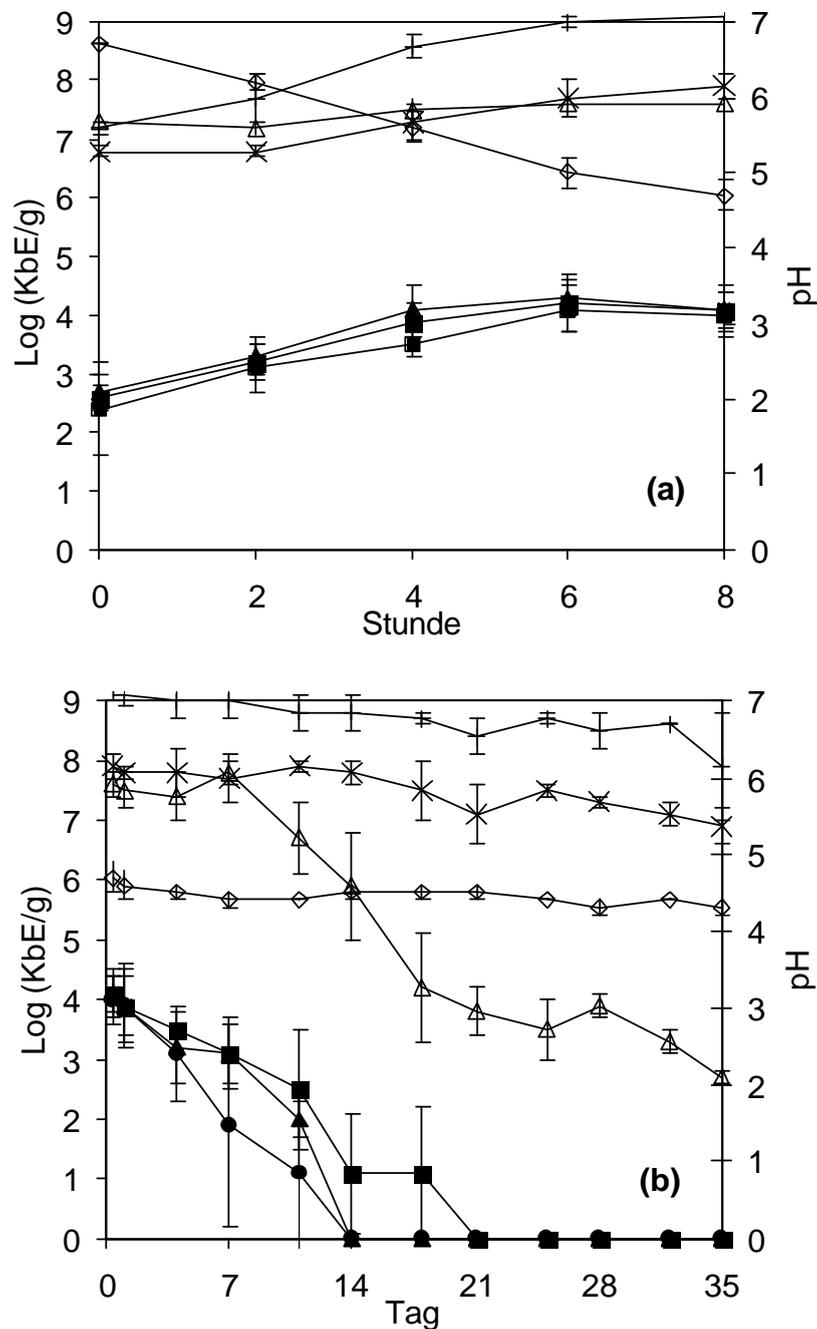


Abb. 4-10. Verlauf der pH-Werte ( $\hat{a}$ ), Verhalten von *Lactobacillus acidophilus* (x), von *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* (-), und von Bifidobacterium ( $\Delta$ ), Verhalten von VTEC-Stämmen 161-84 ( $\blacksquare$ ), EDL933 ( $\blacktriangle$ ), HUS CL8 ( $\bullet$ ) während der Fermentation bei +38°C für 8 Stunden und der Lagerung bei +7°C für 35 Tage in probiotischem Joghurt. Aus 3 unabhängigen Versuchsreihen wurden jeweils die Mittelwerte und die Standardabweichungen dargestellt. Der Wert 0 log KbE/g wurde für die Keimzahl der Proben eingesetzt, die nicht quantitativ, aber nach der Anreicherung qualitativ nachweisbar waren.

und sich dann ständig reduzierte.

Der Stamm 161-84 (pHir) und der Stamm EDL933 (pHr) verhielten sich während der Fermentation ähnlich, wobei der Keimgehalt bis zur vierten Stunde fast linear stieg und danach konstant blieb. Der Stamm HUS CL8 (pHs) zeigte bis zur sechsten Stunde Wachstum. Trotzdem wiesen alle 3 Stämme während der gesamten Fermentation eine fast gleiche Vermehrungsrate mit dem Wert von ca. 1,5 Log KbE/g auf. Der Keimzahlverlauf der 3 VTEC-Stämme während der Kühlung zeigte eine stärkere Parallelität als beim Joghurt mild, während die Reihenfolge des Absterbens der Stämme dieselbe war wie bei anderen Joghurterzeugnissen. Die D-Werte im probiotischen Joghurt lagen bei 7,4, 4,7 und 3,5 Tagen für die als pHir, pHr und pHs klassifizierten VTEC-Stämme. Die Unterschiede waren nicht signifikant ( $P > 0,05$ ). Der Stamm 161-84 und der Stamm EDL933 waren bis zum 35. Lagerungstag qualitativ nachweisbar, während der Stamm HUS CL8 nur bis 32. Lagerungstag nachgewiesen werden konnte.

### **4.2.1.2 Technologische Parameter in Joghurterzeugnissen**

#### 4.2.1.2.1 Milchsäuregehalt

In Abb. 4-11 wird der Milchsäuregehalt, gemessen an 4 Untersuchungstagen, für jeden Produkttyp dargestellt. Die Bildung von L-Milchsäure konnte bei allen Produkten nicht nur direkt nach der Fermentation, sondern auch im Verlauf der Kühlung beobachtet werden. Am Ende der Fermentation war der L-Milchsäuregehalt bei Joghurt mild geringer als bei klassischem und probiotischem Joghurt. Während der Lagerung erhöhte sich der Gehalt jedoch ständig und erlangte am 21. Tag ein gleiches Niveau wie die anderen Produkte. Die Bildung von D-Milchsäure und ein Anstieg des Wertes konnte bedingt durch die D-Milchsäure bildenden *Lactobacillus bulgaricus* Bakterien nur beim klassischen Joghurt festgestellt werden. Das Verhältnis zwischen L- und D-Milchsäuregehalt betrug am 21. Lagerungstag 7:3. Die vorrangig L-Milchsäure produzierenden anderen Laktobazillen waren Hauptbestandteil der Starterkulturen für Joghurt mild und probiotischen Joghurt.

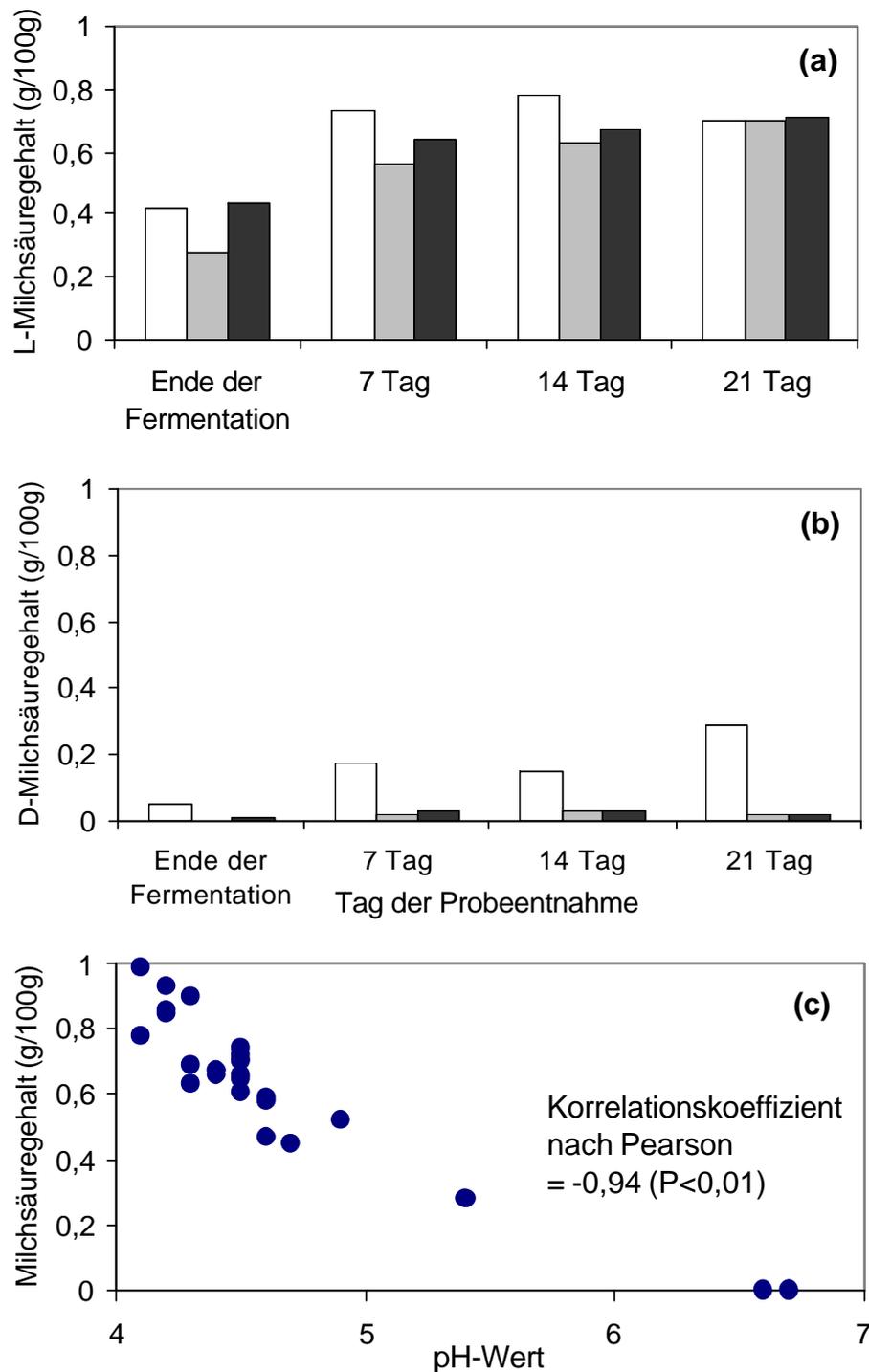


Abb.4-11. L- (a) und D- (b) Milchsäuregehalt in 3 Joghurtherzeugnissen, klassischer Joghurt (ungefüllte Säulen), Joghurt mild (hell gefüllte Säulen) und probiotischer Joghurt (dunkel gefüllte Säulen) an ausgewählten Untersuchungstagen. Zusätzlich wurde der Zusammenhang zwischen pH- Wert und Milchsäuregehalt (L- und D-) in Joghurtherzeugnissen beobachtet (c).

Der hohe Korrelationskoeffizient von 0,94 belegt den deutlichen Zusammenhang zwischen dem pH-Wert-Abfall und dem Anstieg an Milchsäure.

#### 4.2.1.2.2 Säuerungsparameter

In Tabelle 4-7 werden die verschiedenen Säuerungsparameter während der Fermentation und der Lagerung von 3 Joghurtherzeugnissen gegenübergestellt. Joghurt mild hatte signifikant höhere pH-Werte als der klassische und der probiotische Joghurt am Ende der Fermentation ( $P < 0,001$ ). Dagegen zeigte der klassische Joghurt den schnellsten Säuerungsverlauf während der Fermentation im Vergleich mit den anderen Joghurtherzeugnissen ( $P < 0,001$ ). Die Säuerung in den Produkten verlief in Abhängigkeit von der zugesetzten Starterkultur. Nach Abbruch des Fermentationsschritts kam es bei den 3 Produkten zu einer Nachsäuerung, wobei der pH-Wert bei Joghurt mild innerhalb der ersten 7 Lagerungstage deutlicher abfiel als bei klassischem und

Tabelle 4-7. Technologische Parameter während Fermentation und Lagerung.

	Fermentation <sup>1</sup>				Lagerung <sup>2</sup>			
	Temp. (°C)	Dauer (Std.)	$\Delta \text{pH}_{\text{fer}}$	$\overline{\text{pH}}_{\text{fer}}$ (pH·Std. <sup>-1</sup> )	Temp. (°C)	Dauer (Std.)	$\Delta \text{pH}_{\text{lag}}$	$\overline{\text{pH}}_{\text{lag}}$ (pH·Std. <sup>-1</sup> )
Joghurt	42	5	2,05 A	0,41 A	7	163	0,42 A	0,0026 A
Joghurt mild	42	6	1,35 B	0,22 B	7	162	0,79 B	0,0048 B
Probiotischer Joghurt	38	8	2,00 A	0,25 C	7	160	0,28 A	0,0017 A

<sup>1</sup>  $\Delta \text{pH}_{\text{fer}}$ , gesamte Reduktion der pH-Werte während der Fermentation;  $\overline{\text{pH}}_{\text{fer}}$ , Säuerungsgeschwindigkeit während der Fermentation ( $\Delta \text{pH}_{\text{fer}}$  wurde durch Fermentationsdauer dividiert.).

<sup>2</sup>  $\Delta \text{pH}_{\text{lag}}$ , Nachsäuerungsgrad vom Ende der Fermentation bis zum 7. Lagerungstag. Der pH-Wert am Ende der Fermentation wurde von dem pH-Wert am 7. Lagerungstag subtrahiert.;  $\overline{\text{pH}}_{\text{lag}}$ , Nachsäuerungsgeschwindigkeit ( $\Delta \text{pH}_{\text{lag}}$  dividiert durch Lagerungsdauer).

<sup>3</sup> Unterschiedliche Buchstaben in einer Spalte (z.B. A, B, A) kennzeichnen signifikante Differenzen zwischen den Produkten nach Duncan's Test ( $P < 0,01$ )

probiotischem Joghurt ( $P < 0,01$ ). Im Joghurt mild wurde auch die höchste Nachsäuerungsgeschwindigkeit beobachtet ( $P < 0,01$ ). Danach war die Nachsäuerung bei allen Produkten relativ gering und der pH-Wert blieb konstant.

#### 4.2.1.3 Verhalten von VTEC

##### 4.2.1.3.1 Einfluss des Säureverhaltens der VTEC-Stämme auf ihr Verhalten in Joghurtherzeugnissen

Ein Vergleich des Verhaltens von VTEC sowohl während der Fermentation als auch während der Lagerung erfolgte durch die Varianzanalyse verschiedener kinetischer Variablen in Joghurtherzeugnissen (Tabelle 4-8). Wegen des unterschiedlichen Verhaltens der VTEC-Stämme während der Fermentation wurden die Vermehrungsrate von VTEC während des gesamten Fermentationsprozesses als kinetische Variablen umgerechnet. Der induzierbar resistente Stamm 161-84 hatte die größte Vermehrungsrate, d.h. der Stamm 161-84 konnte sich während des Säuerungsprozesses besser anpassen und vermehren als andere Stämme. Im Gegensatz dazu wurde bei dem säuresensiblen Stamm HUS CL8 die kleinste Vermehrungsrate ermittelt. Die

Tabelle 4-8. Kinetische Variablen der 3 VTEC-Stämme in Joghurtherzeugnissen mit Bezug auf ihr Säureverhalten.

Stämme (Säureverhalten)	Anzahl der Chargen	Fermentation	Lagerung
		Vermehrungsrate <sup>1</sup> (Log KbE/g)	D-Werte <sup>2,3</sup> (Tag)
161-84 (pHir)	11	1,4	4,7 A
EDL933 (pHr)	11	1,2	3,1 A, B
HUS CL8 (pHs)	11	1,1	2,4 B

<sup>1</sup> Log-Keimzahl am Ende der Fermentation wurde von logarithmierten Ausgangskeimzahlen subtrahiert.

<sup>2</sup> Dezimalreduktionszeit.

<sup>3</sup> Unterschiedliche Buchstaben in einer Spalte (z.B. A, B) kennzeichnen signifikante Differenzen zwischen den Stämmen nach Duncan's Test ( $P < 0,05$ )

Unterschiede waren allerdings nicht signifikant ( $P > 0,05$ ). Im Verlauf der Kühlungslagerung wurde eine abweichende Keimreduktion der VTEC-Stämme beobachtet. Der statistische Vergleich erfolgte über die Dezimalreduktionsdauer (D- Wert). Es dauerte bei dem Stamm 161-84 durchschnittlich 4,7 Tage, bis die Keimzahl in Joghurtherzeugnissen um eine Zehnerpotenz abnahm, wohingegen der Stamm HUS CL8 bereits in 2,4 Tagen gleichermaßen inaktiviert wurde. Die Stämme wurden anhand der ermittelten D- Werte abstuft in die Reihenfolge pHir, pHr, und pHs eingeordnet ( $P < 0,05$ ). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Säureresistenzantwort der Stämme die Überlebensfähigkeit in Joghurtherzeugnissen entscheidend beeinflussen können.

#### 4.2.1.3.2 Einfluss des Produkttyps auf das Verhalten von VTEC

In Tabelle 4-9 wurden die kinetischen Variablen der VTEC- Stämme ohne Rücksicht auf ihr Säureverhalten für die verschiedenen Produkttypen verglichen. Während des Fermentationsprozesses vermehrten sich die VTEC-Stämme bei Joghurt mild und probiotischem Joghurt erheblich stärker als bei klassischem Joghurt ( $P < 0,001$ ).

Die Überlebensfähigkeit von VTEC-Stämmen während der Lagerung stand unter dem Einfluss der unterschiedlichen technologischen Parameter bei der

Tabelle 4-9. Kinetische Variablen von VTEC-Stämmen in 3 verschiedenen Produkttypen von Joghurtherzeugnissen.

Produkttyp	Anzahl der Chargen	Fermentation	Lagerung
		Vermehrungsrate <sup>1,3</sup> (Log KbE/g)	D-Werte <sup>2,3</sup> (Tag)
Joghurt	15	0,7 A	1,8 A
Joghurt Mild	9	1,9 B	4,2 B
Probiotischer Joghurt	9	1,5 B	5,2 B

<sup>1,2</sup> siehe Tabelle 4-8.

<sup>3</sup> Unterschiedliche Buchstaben in einer Spalte (z.B. A, B) kennzeichnen signifikante Differenzen zwischen den Produkten nach Duncan's Test ( $P < 0,001$ )

Herstellung der Produkte. Die VTEC-Stämme starben bei der Lagerung des klassischen Joghurts deutlich schneller als bei den anderen Joghurtherzeugnissen ab ( $P < 0,001$ ). In probiotischem Joghurt zeigten die VTEC-Stämme tendenziell eine größere Überlebensfähigkeit während der Kühlung als in Joghurt mild, obwohl die Vermehrungsrate während der Fermentation in Joghurt mild größer als in probiotischem Joghurt war.

#### 4.2.1.3.3 Analyse des Einflusses der verschiedenen Parameter auf die Überlebensrate von VTEC in Joghurtherzeugnissen

Beobachtet wurde bereits der Einfluss des Joghurtprodukttyps auf die Überlebensrate von VTEC (Tabelle 4-9). Im Folgenden wird der Einfluss aller Parameter auf die Überlebensrate von VTEC während der Kühlung zusammenhängend mittels einer Varianzanalyse nach dem Ansatz einer „allgemeinen linearen Regression“ überprüft. Die Ergebnisse werden in Tabelle 4-10 dargestellt. Die Varianzanalyse bestätigt, dass das Säureverhalten der VTEC der entscheidende Einflussfaktor für den D-Wert ist. Die pH-Reduktion

Tabelle 4-10. Varianzanalyse (Allgemeine lineare Regression) für die Überlebensrate (D-Wert) von VTEC in Joghurtherzeugnissen.

Quelle <sup>1</sup>	Quadratsumme von Typ III	df <sup>2</sup>	Mittelwert der Quadrate	F	P
Korrigiertes Modell	120,601	6	20,100	10,086	,000
Säureverhalten	37,260	1	37,260	18,696	<b>,000</b>
$\Delta pH_{fer}$	4,637	1	4,637	2,327	,139
$\overline{pH}_{fer}$	37,300	1	37,300	18,716	<b>,000</b>
VERMEHR	9,069	1	9,069	4,551	<b>,043</b>
$\Delta pH_{lag}$	2,174	1	2,174	1,091	,306
$\overline{pH}_{lag}$	2,176	1	2,176	1,092	,306

<sup>1</sup>Säureverhalten: pH<sub>ir</sub> (1), pH<sub>r</sub> (2), pH<sub>s</sub> (3);  $\Delta pH_{fer}$ , gesamte Reduktion der  $\overline{pH}$ -Werte während der Fermentation;  $\overline{pH}_{fer}$ , Säuerungsgeschwindigkeit während der Fermentation; VERMEHR, Vermehrungsrate der VTEC-Stämme während der Fermentation;  $\Delta pH_{lag}$ , Nachsäuerungsgrad;  $\overline{pH}_{lag}$ , Nachsäuerungsgeschwindigkeit.

<sup>2</sup> Freiheitsgrad (R-Quadrat = 0,7)

während der Fermentation und die Nachsäuerungsparameter waren nur schwach signifikant. Das heißt, dass die unterschiedliche pH-Reduktion während der Fermentation und der unterschiedliche Nachsäuerungsgrad während der Lagerung der 3 Produkttypen die Unterschiede in der Überlebensfähigkeit von VTEC während der Lagerung nicht hinreichend erklären. Es zeigte sich, dass die Säuerungsgeschwindigkeit und die Vermehrungsrate der Stämme signifikant im Zusammenhang mit dem D-Wert der VTEC standen ( $P < 0,01$ ). Das bedeutet, dass das Verhalten von VTEC im Verlauf der Lagerung von Joghurtherzeugnissen entscheidend dadurch beeinflusst wurde, wie schnell oder wie langsam sich der pH-Wert während der Fermentation reduzierte.

### **4.2.1.4 Sauermilch mit mesophiler Starterkultur**

#### 4.2.1.4.1 Gesamtergebnisse der Sauermilchversuche

Für die Herstellung von stichfester Sauermilch wurde der Ausgangsmilch eine mesophile Mischstarterkultur aus verschiedenen Lactokokken und *Leuconostoc mesenteroides subsp. cremoris* zugesetzt. Bei niedriger Fermentationstemperatur (23°C) und einer Bebrütungszeit von 18 Stunden entstand ein Produkt mit mildem Aroma und leicht cremigem Geschmack. Die Untersuchungsparameter werden in Abb. 4-12 dargestellt.

Der pH-Wert fiel bis 14 Stunden nach dem Fermentationsbeginn bei 23 °C permanent ab. Danach stabilisierte sich der Wert bei 4,5 und veränderte sich während der Kühlagerung nicht mehr.

In dieser Versuchsreihe wurde jeweils die Keimzahl für die Gesamtheit aller Milchsäurebakterien ermittelt, es erfolgte keine Speziesdifferenzierung. Nach Zugabe der Starterkultur lag die Keimzahl vor der Fermentation bei ca. 7 log KbE/g und stieg bis zum Ende der Fermentation auf ca. 9 log KbE/g an. Das Verhalten der Milchsäurebakterien während der Fermentation war durch eine typische mikrobielle Wachstumskurve gekennzeichnet, die aus einer 2-stündigen Lag-Phase, einer 8-stündigen exponentiellen Phase und aus einer Stationärphase bestand. Die Keimzahl der Milchsäurebakterien reduzierte sich während der Kühlagerung ständig und erreichte am 35. Lagerungstag einen

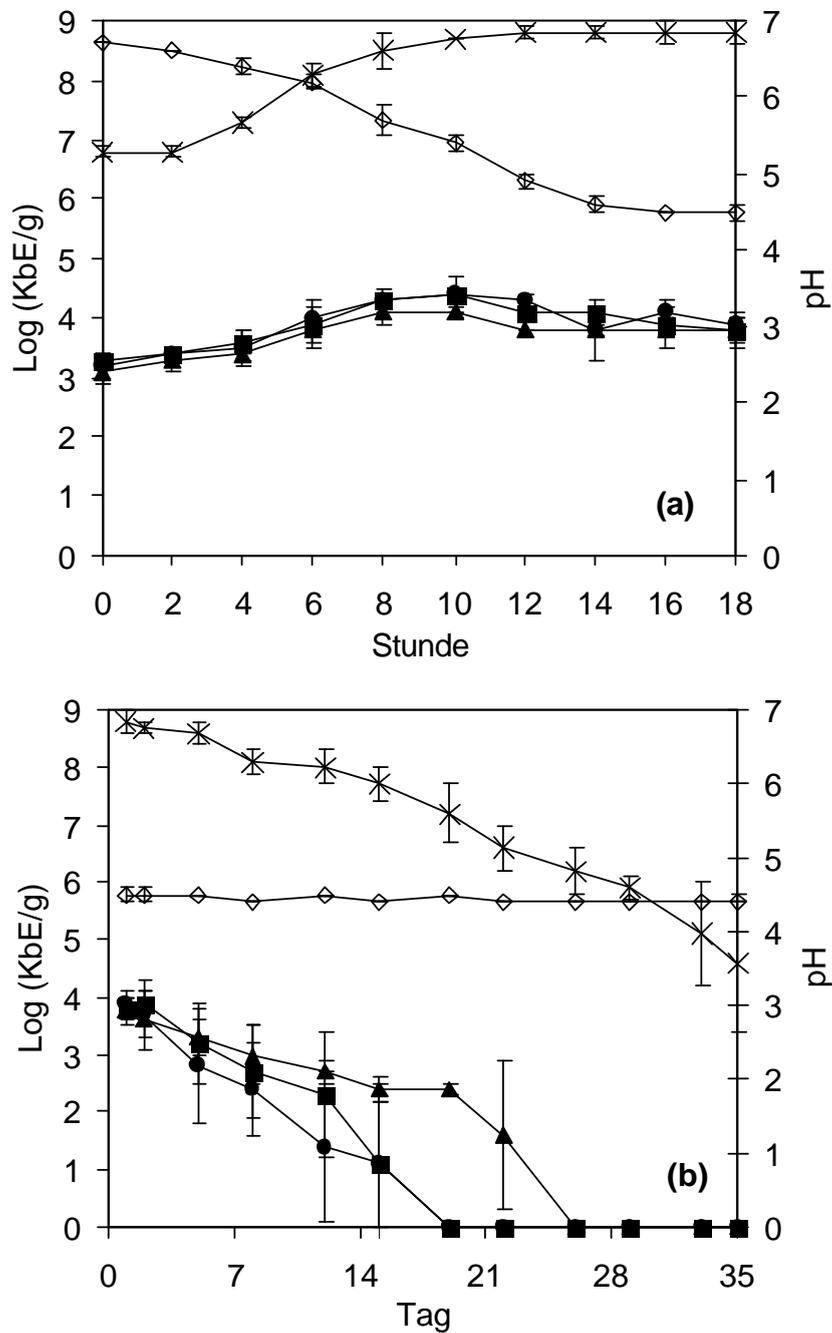


Abb.4-12. Verlauf der pH-Werte (x), Verhalten von Milchsäurebakterien (x) und Verhalten der VTEC-Stämme 161-84 (■), EDL933(▲) und HUS CL8(●) während der Fermentation bei +23°C für 18 Stunden (a) und der Lagerung in Sauermilch bei +7°C für 35 Tage (b). Aus mind. 4 unabhängigen Versuchsreihen wurden jeweils die Mittelwerte und die Standardabweichungen dargestellt. Der Wert 0 log KbE/g wurde für die Keimzahl der Proben eingesetzt, die nicht quantitativ, aber nach der Anreicherung qualitativ nachweisbar waren.

Wert von 5 log KbE/g.

Alle 3 VTEC-Stämme zeigten eine ähnliche Verhaltenstendenz während der Fermentation. In den ersten 4 Stunden nahm die Keimzahl der VTEC nur langsam zu und begann erst danach deutlich zu steigen. 10 Stunden nach Beginn der Fermentation erreichte der Keimgehalt mit einer Gesamtzunahme von ca. 1 log KbE/g Sauermilch den höchsten Wert. Bis zum Ende der Fermentation reduzierte sich die Keimzahl danach leicht. Je länger die kontaminierte Sauermilch kühl gelagert wurde, desto deutlicher wurde ein Unterschied im Verhalten der 3 VTEC-Stämme. Es wurde eine andere Rangfolge für die Überlebensrate der 3 Stämme in Sauermilch als in den Joghurtprodukten festgestellt. Die höchste Überlebensrate zeigte der säureresistente Stamm EDL933, wohingegen in den thermophil fermentierten Joghurtprodukten die Überlebensrate des induzierbar resistenten Stammes 161-84 am größten gewesen war. Trotz der Unterschiede zwischen den Stämmen konnten alle noch bis zum 32. Tag der Lagerung nach einer Anreicherung qualitativ nachgewiesen werden. Die Dezimalreduktionszeit (D-Wert) des säureresistenten Stammes war mit einem Wert von 8,1 Tagen signifikant am größten. Im Vergleich dazu betrug der D-Wert 4,8 Tage beim adaptierbaren Stamm und 4,4 Tage beim säuresensiblen Stamm ( $P < 0,05$ ).

### 4.2.1.4.2 Einfluss des Starterkulturtyps auf die Säuerungsparameter und das Verhalten der VTEC- Stämme

Insgesamt wurden 4 verschiedene Starterkulturen bei den Untersuchung eingesetzt, die, entsprechend der Temperaturoptima für das Wachstum, in die 2 Gruppen thermophile Kulturen (Joghurtherzeugnissen) und mesophile Kulturen (Sauermilch) unterschieden werden. In Tabelle 4-11 wird eine Übersicht über den Zusammenhang zwischen den technologischen Parametern, dem Verhalten der VTEC-Stämme und dem Starterkulturtyp gegeben. Die Mittelwerte der einzelnen Variablen wurden mit Hilfe einer Varianzanalyse verglichen. Es ist deutlich zu sehen, dass der Starterkulturtyp einen signifikanten Einfluss auf alle Variablen hat. Obwohl der pH-Wert-Abfall

während der Fermentation unter Verwendung der mesophilen Starterkultur deutlich größer war als bei den thermophilen Starterkulturen, zeigte sich wegen der längeren Fermentationsdauer bei niedrigerer Temperatur eine langsamere Säuerungsgeschwindigkeit unter den mesophilen als bei den thermophilen Fermentationsbedingungen. Daraus ergab sich eine stärkere Vermehrung der VTEC- Stämme bei den thermophilen als bei den mesophilen Starterkulturen ( $P < 0,05$ ). Im Gegensatz dazu konnten die 3 VTEC-Stämme während der Kühlung in der mit mesophilen Starterkulturen fermentierten Sauermilch besser überleben als in Joghurtherzeugnissen ( $P < 0,05$ ). Es zeigt sich klar, dass die Säuerungsgeschwindigkeit während der Fermentation ohne Rücksicht auf den verwendeten Starterkulturtyp eine sehr wichtige Rolle für die Überlebensrate von VTEC spielt.

Tabelle 4-11: Beziehung zwischen dem Säuerungsparameter und den kinetischen Variablen der VTEC bei Anwendung verschiedener Starterkulturentypen

Starterkultur- Typ	Anzahl der Chargen	Säuerungsparameter		Kinetische Variablen der VTEC	
		$\Delta\text{pH}_{\text{fer}}^1$	$\overline{\text{pH}}_{\text{fer}}^2$ (pH • Std <sup>-1</sup> )	Vermehrungsrate <sup>3</sup> (Log KbE/g)	D-Werte <sup>4</sup> (Tag)
Mesophil	12	2,20 A <sup>5</sup>	0,12 A	0,6 A	5,8 A
Thermophil	33	1,85 B	0,32 B	1,3 B	3,4 B

<sup>1</sup> pH- Werte am Ende der Fermentation wurden von Initial- pH- Werten abgezogen.

<sup>2</sup> Reduktion der pH-Werte wurde durch die Fermentationsdauer geteilt.

<sup>3</sup> Log-Keimzahlen am Ende der Fermentation wurden von logarithmierten Ausgangskeimzahlen subtrahiert.

<sup>4</sup> Dezimalreduktionszeit

<sup>5</sup> Unterschiedliche Buchstaben in einer Spalte (z.B. A, B) kennzeichnen signifikante Differenz zwischen dem Starterkulturtyp nach Duncan's Test ( $P < 0,05$ )

## **4.2.2 Herstellung und Lagerung von Sauermilcherzeugnissen aus mit niedrigem Kontaminationsniveau von VTEC kontaminierter Milch**

### **4.2.2.1 Verhalten der VTEC**

In diesem Versuch wurden dieselben Sauermilcherzeugnisse wie in Kap. 4.2.1. hergestellt, aber ein niedrigeres Kontaminationsniveau für die VTEC- Stämme im Bereich von ca.  $1,0 \pm 0,5$  Log KbE/g erzielt. Der Keimgehalt schwankte innerhalb der einzelnen Produktchargen für alle VTEC Stämme erheblich, so dass nur wenige aussagekräftige quantitative Tendenzen erkannt werden konnten. Manchmal konnte zwar eine Vermehrung der VTEC-Stämme während der Fermentation der Joghurtprodukte beobachtet werden, aber nie in der Sauermilch. Im Verlauf der Kühlungslagerung war die Keimzahl der VTEC- Stämme nicht mehr zu ermitteln, wobei dieser Effekt je nach Stamm und Produkt an unterschiedlichen Lagerungstagen auftrat. In der Regel konnten die VTEC-Stämme lange Zeit nach Anreicherung qualitativ nachgewiesen werden.

### **4.2.2.2 Einfluss des Kontaminationslevels auf die Überlebensfähigkeit von VTEC**

In der Abbildung 4-13 wird der Einfluss der unterschiedlichen Kontaminationsniveaus auf die Überlebensfähigkeit der VTEC-Stämme, differenziert nach Säureverhalten und Produkttyp graphisch dargestellt. Die Überlebensfähigkeit in den 4 Sauermilcherzeugnissen bei hoher ( $3 \pm 0,5$  Log KbE/g) Kontamination (Kap. 4.2.1) wird der bei niedriger ( $1 \pm 0,5$  Log KbE/g) Kontamination mit VTEC-Stämmen gegenübergestellt. Die Überlebensfähigkeit des induzierbar resistenten Stammes war in allen Produkttypen unabhängig vom Kontaminationsniveau. Auch der inhärent säureresistente Stamm wies nur eine geringfügig unterschiedliche Überlebensfähigkeit bei beiden Kontaminationsniveaus auf. Dagegen war der säureempfindliche Stamm in allen Produkten mit hohem Kontaminationsniveau tendenziell länger nachweisbar als in Produkten mit niedrigem Kontaminationsniveau.

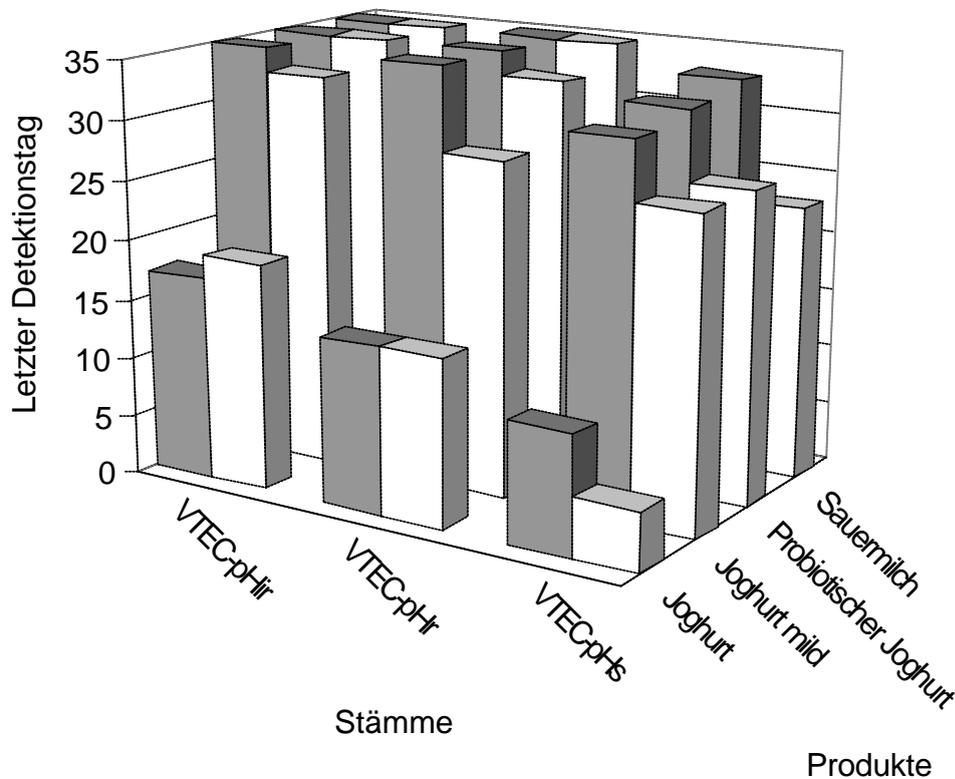


Abb.4-13. Überlebensfähigkeit von 3 VTEC-Stämmen in 4 verschiedenen Sauermilcherzeugnissen während der Lagerung bei hohem Kontaminationsniveau (gefüllte Säule) und bei niedrigem Kontaminationsniveau (leere Säule).

#### 4.2.3 Verhalten der VTEC in postfermentativ kontaminierten Joghurtherzeugnissen

##### 4.2.3.1 Einfluss der Wachstumsphase des VTEC-Stammes auf das Verhalten zum Zeitpunkt der Kontamination

Die bisherigen Untersuchungen haben gezeigt, dass sich verotoxigene *E.coli* während der Fermentation von Sauermilcherzeugnissen vermehren und in Abhängigkeit von ihrem Säureverhalten unterschiedlich lang überleben können. In diesem Versuch wurde geprüft, wie sich ein VTEC-Stamm nach der Fermentation in kontaminierten Joghurtherzeugnissen verhält. Die Fragestellung

wurde beispielhaft nur an 2 Joghurtherzeugnissen, klassischem Joghurt und Joghurt mild, getestet. Im Anschluss an die Fermentation wurden die Produkte mit dem induzierbar resistenten VTEC-Stamm 161-84 kontaminiert, der in den vorangegangenen Untersuchungen die stärkste Überlebensfähigkeit aufgewiesen hatte. Die Kontamination mit dem Stamm erfolgte entweder mit einer Kultur in der exponentiellen oder in der stationären Wachstumsphase. In Abb. 4-14 wird der Einfluss der Wachstumsphase zum Kontaminationszeitpunkt auf das Verhalten des VTEC-Stammes in den beiden Joghurtherzeugnissen graphisch veranschaulicht. Unabhängig vom Produkttyp zeigte der in der stationären Phase befindliche Stamm eine deutlich langsamere Absterberate als in der exponentiellen Phase. In klassischem Joghurt konnte der Stamm aus der stationären Phase noch bis zum 35. Lagerungstag qualitativ nachgewiesen werden, wohingegen der Stamm aus der exponentiellen Phase nur bis zum 3. Tag detektiert werden konnte. In Joghurt mild konnten beide Stämme dank des höheren pH-Wertes wesentlich besser überleben als in klassischem Joghurt. Der Keimgehalt des Stammes aus der stationären Phase reduzierte sich nur um 1,5 log KbE/g während der gesamten Kühllagerungszeit von Joghurt mild. Der Stamm aus der exponentiellen Phase wurde jedoch schneller inaktiviert und war nur bis zum 21. Tag nach einer Anreicherung nachweisbar.

### **4.2.3.2 Einfluss des Kontaminationszeitpunktes auf das Verhalten der VTEC während der Lagerung**

In der Tabelle 4-12 wird die Dezimalreduktionszeit (D-Wert) des VTEC-Stammes in den beiden Joghurtherzeugnissen mit Bezug auf den Kontaminationszeitpunkt dargestellt. Für diese Analyse wurden Teilergebnisse desselben Stammes aus Kap. 4.2.1 verwendet, wo der Stamm in seiner stationären Phase der Ausgangsmilch zugesetzt worden war. In klassischem Joghurt zeigte sich eine bessere Überlebensfähigkeit (größerer D-Wert) des VTEC-Stammes in dem nach der Fermentation kontaminierten Produkt als im vor der Fermentation kontaminierten Produkt. Der Unterschied war allerdings nicht signifikant ( $P > 0,05$ ). Diese Tabelle bestätigt nochmals, dass der Stamm in

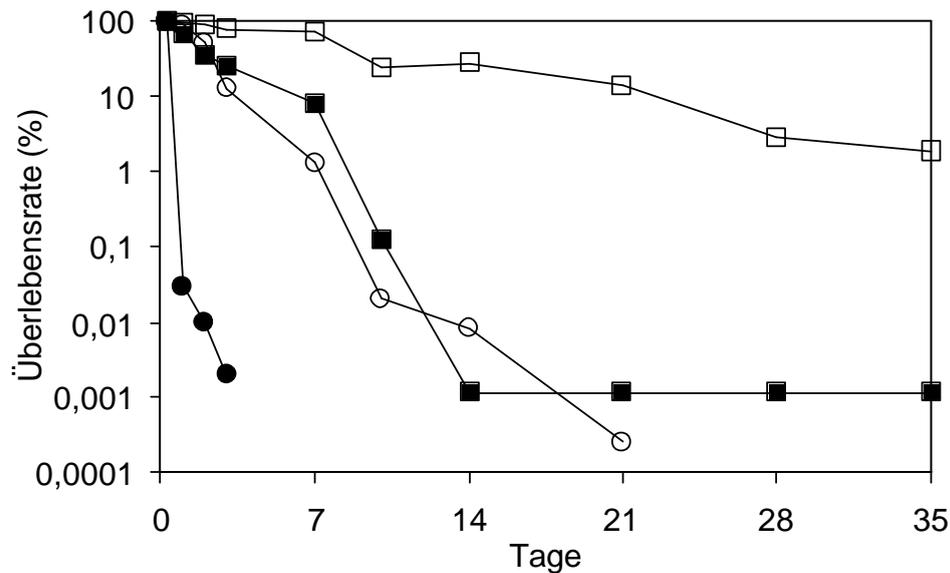


Abb. 4-14. Verhalten des VTEC- Stammes 161-84, mit dem entweder klassischer Joghurt (●, ○) oder Joghurt mild (■, □) nach der Fermentation kontaminiert wurde. Zum Kontaminationszeitpunkt befand sich der Stamm entweder in der exponentiellen Wachstumsphase (●, ■) oder in der stationären Wachstumsphase (○, □).

seiner stationären Phase deutlich größere D-Werte als in seiner exponentiellen Phase aufweist.

In Joghurt mild konnte statistisch gesichert belegt werden, dass bei Kontamination mit dem in stationärer Phase befindlichen Stamm und nach der Fermentation eine Überlebensfähigkeit mit einem D- Wert von 19 Tage auftritt ( $P < 0,05$ ).

Tabelle 4-12. D- Werte des VTEC-Stammes 161-84 in klassischem Joghurt und in Joghurt mild

Kontaminations- Zeitpunkt	Wachstumsphase	Klassischer Joghurt	Joghurt Mild
vor Fermentation	Stationäre Phase	2,9 A B <sup>1</sup>	5,0 A
nach Fermentation	Stationäre Phase	3,3 A	9,0 B
	Exponentielle Phase	0,5 B	3,6 A

<sup>1</sup>Unterschiedliche Buchstaben in einer Spalte (z.B. A, B) kennzeichnen signifikante Differenz zwischen den Kontaminationszeitpunkten nach Duncan's Test ( $P < 0,05$ )

## 5 DISKUSSION

### 5.1 CHARAKTERISIERUNG VON VTEC- STÄMMEN DURCH BESTIMMUNG DER SÄURERESISTENZ UND DER ZYTOTOXIZITÄT

#### 5.1.1 Säureresistenz

Es ist bekannt, dass *Escherichia coli* in der stationären Wachstumsphase einige Stunden lang unter äußerst sauren Bedingungen lebensfähig bleiben. Ihre Säureresistenz bewirkt eine verbesserte Überlebensfähigkeit während der Magenpassage beim Menschen und trägt somit zur Effektivität von nur geringen Infektionsdosen bei (Gorden und Small, 1993). Eine gesteigerte Überlebensfähigkeit von *E.coli* unter extrem sauren Bedingungen kann auch bei Zellen aus der exponentiellen Phase induziert werden, indem man sie einer milden Säure aussetzt. Diese Widerstandsfähigkeit wird „Acid Habituation“ genannt (Goodson und Rowbury, 1989). Es ist jedoch anzunehmen, dass sich der in den Wirt eindringende Erreger in der Stationärphase befindet. In mehreren Studien wurde bisher mit Hilfe verschiedener Testmethoden eine höhere Überlebensfähigkeit von *E.coli* aus der Stationärphase in extremen Säuren nachgewiesen als bei Zellen aus der Exponentialphase (Gorden und Small, 1993, Arnold und Kaspar, 1995, Benjamin und Datta, 1995). Lin et al (1995) haben bereits drei verschiedene Säureresistenz-Systeme in *E.coli* identifiziert, die während der Stationärphase wirksam sein können. Castanie-Cornet et al (1999) haben darauf hingewiesen, dass durch diese drei Systeme alle beschriebenen Resistenzphänotypen von *E coli* erklärt werden.

Die eigenen Untersuchungen bestätigten das Vorhandensein der drei verschiedenen Systeme bei den vier ausgewählten VTEC-Stämmen, die Effektivität jedes Systems war jedoch unterschiedlich. Das Glutamatsystem und das Argininsystem waren in allen VTEC-Stämmen sehr effektiv zur Erlangung der Säureresistenz. Diese zwei Decarboxylasesysteme binden in die Zellen eindringende Protonen durch eine Aminosäuredecarboxylierung entweder von

Glutamat oder Arginin, wodurch ein Absinken des pH-Wertes innerhalb der Bakterienzelle verhindert wird (Lin et al, 1995; Hersh et al, 1996).

Das dritte Säureresistenzsystem ist ein Oxidativsystem, welches zur Induktion zwingend einen Stationärphase-Sigma-Faktor RpoS benötigt. Das Eintreten von *E.coli* in die Stationärphase wird von bedeutenden physiologischen Änderungen begleitet, die durch ein allgemeines Regulatorsystem, in dem ein putativer RpoS eine wichtige Rolle spielt, gesteuert wird. Dadurch werden die Bakterienzellen vor Stressfaktoren, einschließlich des Säurestress, geschützt (Hengge-Aronis, 1993). Der genaue Mechanismus ist jedoch noch unklar. Die eigenen Studien zeigten, dass die Effektivität des Oxidativsystems zur Erlangung der Säureresistenz bei den verschiedenen Stämmen unterschiedlich ist. Die Stämme können somit hinsichtlich der Wirksamkeit ihres Oxidativsystems zur Erlangung der Säureresistenz differenziert werden. Die Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit jenen von Lin et al (1996), welche ebenfalls herausfanden, dass das Oxidativsystem bei den Stämmen variabler ist als jene der Decarboxylasesysteme.

Der *E.coli* Kontrollstamm ATCC 25922 (nicht-VTEC) konnte nicht über das Oxidativsystem Resistenz erlangen, eine gewisse Resistenz wurde aber durch die Decarboxylasesysteme erreicht. Im Vergleich mit den geprüften VTEC-Stämmen war die Säureresistenz des Kontrollstammes deutlich geringer ( $P < 0,01$ ). Dieses beobachtete besondere Säureverhalten des Stammes ATCC 25922 steht im Einklang mit Ergebnissen der Studie von Buchanan und Edelson (1996). Sie haben beobachtet, dass unter fermentativen Bedingungen gewachsene Zellen nach dem 2 Stunden Säureschock kaum abstarben, wohingegen ohne Glukose oxidativ gewachsene Zellen im Säureschock stark reduziert wurden.

Die Untersuchungsergebnisse deuten an, dass das Vorkultivierungsmedium eine wichtige Rolle für die Überlebensrate von *E.coli* Stämmen während des Säureschocks spielt. Die sauren Komplexmedien bewirkten eine höhere Überlebenschance bei dem Säuretest als die neutralen Minimalmedien ( $P < 0,001$ ). Mehre Autoren haben bestätigt, dass eine Adaptation in milder

Säure den Zellen eine höhere Säureresistenz vermittelt, wobei es Unterschiede je nach der Methode der Adaptation gibt (Goodson und Rowbury, 1989; Small et al., 1994; Benjamin und Datta, 1995; Lin et al., 1995). Für *Salmonella* ist beschrieben worden, dass die adaptierte Säureresistenz im Zusammenhang mit der Induktion des Produktes des *rpoS*-Gens erworben wird (Foster und Hall, 1991). In einigen umstrittenen Studien wird die von *rpoS* regulierte Säureresistenz in *E.coli* als eine allgemeine Stressantwort der Stationärphase angesehen, die unabhängig vom pH-Wert der Vorkultivierungsmedien ist. (Gorden und Small, 1993; Small et al., 1994). Castanie-Cornet et al.(1999) berichteten hingegen, dass die Induktion des *rpoS*-benötigenden Oxidativsystems durch mild saure Bedingungen begünstigt wird, während die Niveaus von *RpoS* in den Stationärphase-Zellen gleichbleiben. Die anscheinende pH-Abhängigkeit des Oxidativsystems wird darauf zurückgeführt, dass Inhibitoren, welche die Aktivität des Säureresistenzsystems beeinträchtigen, eher bei pH 8 als bei pH 5,5 produziert werden. Weiterhin deutete sich das Erfordernis der Komplexmediumadaptation für die optimale Funktion des Oxidativsystems an, wobei dem im Komplexmedium enthaltenen Glutamat und Glutamin die wichtigste Rolle zufällt (Castanie-Cornet et al.,1999; Chang und Cronan, 1999). Tao et al. (1999) haben einen Unterschied in der Expression von funktionellen Genen in Minimalmedium und in Komplexmedium belegt.

Sowohl die Säureresistenzausprägung im Oxidativsystem als auch die Induktionsgrade der Säureresistenz der 86 geprüften *E.coli* Stämme variierten in diesen Untersuchungen. Unterschiedliche Säureresistenz bei *E.coli* Stämmen wurde bereits von verschiedenen Autoren beschrieben, ein direkter Vergleich mit den eigenen Ergebnissen ist wegen unterschiedlicher Säureresistenztestmethoden aber nicht möglich (Arnold und Kaspar, 1995; Benjamin und Datta, 1995; Buchanan und Edelson, 1996; Lin et al., 1996; Waterman und Small, 1996). Unter Berücksichtigung der Säureresistenz und ihres Induktionsgrades wurden die Stämme weiter charakterisiert und in die Kategorien inhärent resistent, induzierbar resistent oder sensibel eingeordnet. Unterschiedliche Adaptationsfähigkeit von *E.coli* O157:H7 Stämmen mit

ähnlicher Kategorisierung wurde übereinstimmend auch in Studien anderer Autoren gefunden (Berry und Cutter, 2000; Uyttendaele, et al., 2001).

Das *rpoS*-Gen ist in der Natur ein hoch mutables Gen und es mutiert auch häufig während ausgedehnter Subkultivierung im Labor (Zambrano et al, 1993). Abweichendes Säureverhalten von Stämmen soll durch die Variation von *rpoS*-Allelen, z.B. durch heterogene *rpoS*-Sequenzen (Ferreira et al.,1999) und daraus folgender abweichender RpoS-Aktivität zustande kommen (Jishage et al., 1996). Weiterhin wird die RpoS-Aktivität von verschiedenen Faktoren beeinflusst (Small et al., 1994).

Bei den eigenen Untersuchung erwiesen sich 2 Stämme als extrem säureempfindlich im Oxidativsystem. Dieser Phänotyp ist anscheinend auf einen völligen Defekt der Funktion von *rpoS* zurückzuführen. Diese äußerst empfindlichen Stämme könnten eine Läsion im *rpoS*-Gen aufweisen, oder es könnte sein, dass zwar funktionelle *rpoS*-Gene vorhanden sind, aber die *rpoS*-regulierenden Gene fehlen (Waterman und Small, 1996). Unter den resistenten Stämmen war auch der Induktionsgrad der Säureresistenz stammabhängig.

Die inhärent säureresistenten Stämme (pHr) brauchten keine speziellen Induktionsbedingungen, sie waren sogar unter Kontrollbedingungen säureresistent. Dies weist darauf hin, dass die induzierbare Säureresistenz in diesen Stämmen konstitutiv ist (Buchanan und Edelson, 1999). Es ist auch möglich, dass infolge des Nährstoffmangels durch die Kultivierung in Minimalmedium ein generelles Stressresistenzsystem aktiviert wird, welches einen ausreichenden Schutz für diese Stämme bereitstellt (Brudzinski und Harrison, 1998). Tao et al. (1999) haben spekuliert, dass die in Minimalmedium gewachsenen Zellen durch die Bildung und den Stoffwechsel von Acetat gegen Säurestress geschützt werden könnten.

Die Zusammensetzung der Zellmembran ist ein weiterer bedeutender physiologischer Faktor in der Säureresistenz von *E.coli*-Stämmen. Beobachtet wurde eine Umwandlung von ungesättigten Fettsäuren (UFAs) zu Cyclopropan-Fettsäuren (CFAs) in den Doppelmembranlagen, wenn die Zellen in die stationäre Phase übergehen oder während sie an niedrige pH-Werte adaptiert werden (Brown et al.,1997). Das Ausmaß der Modifikation von UFAs zur CFAs

steht möglicherweise im Zusammenhang mit der Variabilität der Stressresistenzantwort verschiedener Stämme (Benito et al., 1999). Auch hierbei spielt RpoS eine Rolle (Chang und Cronan, 1999).

Es wurde herausgefunden, dass RpoS mehr als 50 verschiedene funktionelle Gensets und Regulatoren in *E.coli* kontrolliert oder reguliert (Loewen et al., 1998). Das beobachtete unterschiedliche Säureverhalten der *E.coli* Stämme ist im Hinblick auf die komplexe RpoS vermittelte Resistenzstrategie nicht überraschend. Es deutet sich an, dass die Abweichungen des Säureverhaltens der VTEC-Stämme eine Rolle bei ihrer Virulenz spielen und dass ein Zusammenhang mit unterschiedlichen Infektionsdosen verschiedener Stämme existiert (Waterman und Small, 1996). Es ist jedoch unklar, ob die in vitro beobachtbaren unterschiedlichen Säureresistenzen der Stämme in direktem Zusammenhang mit den in vivo auftretenden unterschiedlichen Überlebensfähigkeiten bei der Infektion von Menschen stehen.

Einige Autoren haben beschrieben, dass enterohämorrhagische *E.coli*-Stämme des Serovars O157:H7 säureresistenter sind als nicht pathogene *E.coli*-Stämme (Miller und Kaspar, 1994; Arnold und Kaspar, 1995). Die Untersuchungen wurden jedoch nur mit einer beschränkten Anzahl von Stämmen und unter Verwendung eines häufig mutierenden Laborstamms als Kontrolle durchgeführt. In den eigenen Untersuchungen wurde kein signifikanter Unterschied zwischen VTEC-Stämmen und nicht-VTEC-Stämmen festgestellt. Bisherige Studien zeigten nie eine Beeinflussung der Säureresistenz bei *E.coli* durch ihr Toxinbildungsvermögen (Garren et al., 1998; Duffy et al., 2000b; Yokoigawa et al., 2003). Während die Säureresistenz in nicht-VTEC-Stämmen nicht mehr als ein allgemeines Überlebensverfahren der Zellen darstellte, könnte die Säureresistenz bei VTEC-Stämmen zusammen mit anderen Virulenzmerkmalen ein wichtiger Pathogenitätsfaktor sein.

### 5.1.2 Zytotoxizität

Die Untersuchungen demonstrieren, dass sich die mitochondriale Transformationsrate von MTT zu Formazan sowohl als Indikator für den Nachweis der Verotoxinbildung als auch für die Quantifizierung der Zytotoxizität von Verotoxin eignet (Mosmann, 1983). Gegenüber gentechnischen Verfahren wie dem Nachweis von Toxingenen ermöglicht der MTT-Test nicht nur den Nachweis einer potentiellen Toxinbildungsfähigkeit, sondern darüber hinaus den Beleg, ob eine Toxinproduktion stattfindet oder nicht. Im Vergleich zur klassischen Zytotoxizitätsprüfung wie der mikroskopischen Beurteilung und einer Messung mittels Isotrophen hat der MTT-Zytotoxizitätstest viele Vorteile (Kreft et al., 1992; Hörmansdorfer et al., 1995). Im MTT-Test sind mit Hilfe der Mikrotiterplatte und des automatischen Ablesungsverfahrens gleichzeitige große Ansätze möglich. Da kein radioaktives Material benötigt wird, ist der MTT-Test auch ökologisch und gesundheitlich unbedenklich. Weiterhin kann der MTT-Test mit Hilfe von Antikörpern zur Differenzierung der Toxinsubtypen (vtx1 oder vtx2) eingesetzt werden.

Die Zytotoxizität der auf Verozellen geprüften VTEC-Stämme war variabel. Die Stämme wurden hinsichtlich ihrer  $CD_{50}$ -Werte klassifiziert und in die drei Gruppen niedrig, mittelmäßig und hoch zytotoxisch eingeteilt. Von Pradel et al. (2000) wurden VTEC-Stämme, die ein Jahr lang von verschiedenen Quellen in Frankreich isoliert wurden, auch nach ihrer Vero-Zytotoxizität klassifiziert. Die Stämme verteilten sich hierbei jedoch unterschiedlich in die Klassen, da ein abweichender experimenteller Ansatz mit einer kleineren Toxinverdünnung (2-fach) und einer kürzeren Einwirkungsdauer (1 Tag) des Toxins auf die Verozellen im Vergleich zu der eigenen Untersuchung (4-fach und 4 Tage) gewählt wurde. Variierende Vero-Zytotoxizität von Stämmen wurde auch in anderen Studien beobachtet (Paton et al., 1995; Bertin et al., 2001; Whiting et al., 2002). Verursacht wird sie vermutlich durch einen unterschiedlichen Hemmungsgrad der Eiweißsynthese (Yamasaki et al., 1991). Diese Abweichung in der Vero-Zytotoxizität ist wahrscheinlich durch eine heterogene Aminosäuresequenz im Toxinsubtyp (insbesondere bei vtx2) und durch

unterschiedliche Konzentration des Toxins im Präparat zu erklären (Lindgren et al., 1994; Paton et al., 1995). Im Gegensatz zu Verotoxin 1 (VT1) handelt es sich bei Verotoxin 2 (VT2) um eine heterogene Gruppe mit verschiedenen Genotypen wie z.B. VT2, VT2c, VT2d, VT2e, VT2vh etc. Im Rahmen dieser Studie war es leider nicht möglich, eine Subdifferenzierung der VT2-Variante in den *vtx2*-positiven Stämmen vorzunehmen. Die zum Nachweis von *vtx2*-Gen eingesetzten PCR-Primer LP43/LP44 erfassen die meisten VT-Varianten (VT2, VT2c, VT2d, VT2e) (Gallien et al., 1999a). Von 9 VTEC-Stämmen, die in dieser Untersuchung als niedrig zytotoxisch klassifiziert wurden, trugen 7 nur das *vtx2*-Gen. Es ist zu vermuten, dass diese Stämme eine VT2-Variante wie z.B. VT2d/O111 besitzen, deren Zytotoxizität auf Verozellen nur gering ist (Paton et al., 1995).

In dieser Studie konnte nicht der direkte Zusammenhang zwischen der Zytotoxizität auf Verozellen und der *in vivo* Toxizität von VTEC-Stämmen ermittelt werden, jedoch kann über die *in-vitro* Zytotoxizität eine Abschätzung der potentiellen Virulenz von VTEC erfolgen. 88,8% der Stämme mit der niedrigen Zytotoxizität wurden bisher noch nie in Verbindung mit einer Erkrankung beobachtet. Weiterhin besaßen 66,6% der Stämme mit niedriger Zytotoxizität weder das *eae*-Gen noch das *hly*-Gen. Im Gegenteil dazu trugen 95,2 % der VTEC-Stämme mit starker Zytotoxizität wenigstens eines der beiden Virulenzgene. Eine hohe Vero-Zytotoxizität wurde auch von Pradel et al. (2000) in aus HUS-Patienten isolierten VTEC-Stämmen beobachtet. Paton et al. (1995) beobachteten einen klaren Zusammenhang zwischen Vero-Zytotoxizität und intraperitonealer Toxizität in Mäusen, eine Korrelation zwischen der *in-vitro* Zytotoxizität und oraler Virulenz bestand bei dem Mäusen jedoch nicht.

### **5.1.3 Zusammenhang zwischen verschiedenen Eigenschaften der VTEC-Stämme und Schätzung der Erkrankungswahrscheinlichkeit**

Im Rahmen der Studie wurden 65 VTEC-Stämme hinsichtlich eines Zusammenhangs zwischen den drei variablen Eigenschaften Säureresistenz, Induktionsgrad der Säureresistenz und Vero-Zytotoxizität geprüft, welche bei

der Charakterisierung der VTEC als potentielle Virulenzfaktoren ermittelt wurden. Es gab keinen korrelativen Zusammenhang zwischen den 3 Eigenschaften. Da jede VTEC-Eigenschaft unabhängig von den anderen ausgeprägt war, ist anzunehmen, dass diese phänotypischen Eigenschaften der VTEC von unterschiedlichen Mechanismen beeinflusst werden. Tatsächlich wird die Verotoxinexpression in VTEC durch RpoS, welches eine wichtige Rolle in der Säureresistenzantwort spielt, kaum beeinflusst (Yokoyama et al., 2000), aber es wurde ein Einfluss von RpoS auf die Zellinvasion beobachtet (Wang und Kim, 2000). Kenntnisse über die Ausprägung jeder dieser Eigenschaften und ihre Betrachtung im Zusammenhang mit weiteren Virulenzmerkmalen könnte eine bessere Abschätzung der potentiellen Pathogenität von VTEC-Stämmen ermöglichen.

Die 65 VTEC-Stämme wurden nach ihren verschiedenen Merkmalen, wie Serotyp, Toxintyp, Herkunft, Vorkommen des *eae*-Gens und des *hly*-Gens in Untergruppen eingeteilt und es wurde der Zusammenhang der in ihrer Ausprägung ermittelten VTEC-Eigenschaft mit jedem weiteren Merkmal untersucht.

In bisherigen Studien konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Säureresistenz von VTEC und ihrer Herkunft, des Toxintyps oder des Serotyps gefunden werden (Benjamin und Datta, 1995; McKellar und Knight, 1999). Die eigenen Ergebnisse zeigten mit Ausnahme bei der Gruppierung nach dem Toxintyp kaum Unterschiede in der Säureresistenz unter den Isolaten einer Merkmalsuntergruppe. Human- und Lebensmittel-Stämme unterscheiden sich nicht in ihrer Säureresistenz. Ein einziger der 65 VTEC-Stämme war äußerst säuresensibel. Er gehörte zur Humangruppe. Wenn dieser säuresensible Stamm bei der Analyse ausgeschlossen wurde, zeigte sich eine signifikant höhere Säureresistenz bei den Human-Stämmen als bei jenen, die bisher nur aus Lebensmitteln isoliert wurden. Die VTEC-Stämme, welche nur mit *vtx1* ausgestattet waren, wiesen eine größere Säureresistenz auf als jene mit *vtx2* oder mit *vtx1/2* ( $P < 0,01$ ). Dieser scheinbare Einfluss des Toxintyps auf die Säureresistenz könnte eventuell nur aufgrund dessen zustande gekommen

sein, dass der überwiegende Anteil der Stämme (71,4%), die nur VT 1 produzieren, humanen Ursprungs ist.

Es wurde beobachtet, dass der Induktionsgrad der Säureresistenz über das Oxidativsystem im Zusammenhang mit verschiedenen Merkmalen wie der Herkunft, dem Besitz des *eae*-Gens und dem Toxintyp stand. Wie in Kap. 5.1.1. diskutiert, ist diese durch induzierbare Säureresistenz anscheinend abhängig von RpoS. Humanstämme und *eae*-positive Stämme, deren potentielle Pathogenität als hoch einzuschätzen ist, zeigten im Vergleich zu Lebensmittelstämmen und *eae*-negativen Stämmen eine signifikant größere Effektivität des Oxidativsystems für die Erlangung der Säureresistenz ( $P < 0,01$ ). Für *Salmonella* wurde bereits gezeigt, dass es nach der Induktion von *rpoS* zur Aktivierung eines Virulenzregulators *spvR* kommt (Hiskanen et al., 1994). Weitere Forschungsarbeiten sind jedoch notwendig, um zu klären, ob die RpoS-vermittelte Genexpression in-vivo eine Rolle bei der Pathogenität von VTEC spielt. VTEC-Stämme, welche nur mit VT1 ausgestattet sind, zeigten einen größeren Induktionsgrad als jene mit VT2 oder mit VT1/2 ( $P < 0,05$ ). Dieser Zusammenhang mit dem Toxintyp ist möglicherweise aufgrund der Herkunft und mit dem Besitz des *eae*-Gens zu erklären. 87,0% der *vtx1*-Stämme waren *eae*-positive Humanisolate.

Die Zytotoxizität der VTEC-Stämme stand im Zusammenhang mit dem gebildeten Verotoxintyp. Die VTEC-Stämme, die beide Toxintypen (VT1/2) bilden konnten, hatten die höchste Vero-Zytotoxizität ( $P < 0,05$ ). Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit jenen von Bertin et al. (2001). Bei der eigenen Studie zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Zytotoxizität bei Stämmen, die nur VT1 oder nur VT2 hatten. Head et al. (1998) haben berichtet, dass die zytotoxische Wirkung auf Verozellen von VT2 circa 1000 mal niedriger ist als die von VT1. Im Gegensatz dazu haben Louise und Obrig (1995) eine höhere Zytotoxizität von VT2 als von VT1 beobachtet. Diese unterschiedlichen Ergebnisse können dadurch entstanden sein, dass in diesen Studien keine Subdifferenzierung der VT2-typen durchgeführt wurde. VT2-Subtypen variieren stark in ihrer Zytotoxizität (Paton et al., 1995). Weiterhin zeigten die hly-positiven-Stämme eine signifikant höhere Zytotoxizität, als die hly-negativen.

Dieser Zusammenhang könnte darauf beruhen, dass 94,1% der Stämme mit VT1/2 hly-positiv waren.

Mittlerweile sind über 200 verschiedene Serotypen von VTEC-Isolaten aus Tieren, Lebensmitteln und von Menschen bekannt (WHO, 1995). Etwa 50 dieser VTEC-Serotypen sind in Verbindung mit HC oder HUS beschrieben worden (Johnson et al., 1996). Bei den eigenen Untersuchungen zeigte der O157-Serotyp, der allgemein als Prototyp für humanpathogene VTEC angesehen wird, im Vergleich mit den anderen Hauptserogruppen die niedrigste Säureresistenz ( $P < 0,05$ ). Dies ergab sich vermutlich wegen der großen Vielfalt der Virulenzdeterminanten innerhalb der Gruppe der O157-VTEC-Stämme (Datz et al., 1996). Auch McKellar und Knight (1999) fanden eine relativ niedrigere Säureresistenz bei O157-Stämmen im Vergleich zu Isolaten anderer Serogruppen. Bei den O103-Stämmen und den O26-Stämmen wurde die größte Säureresistenz, sowie der größte Induktionsgrad ermittelt. O103 und O26 gehören in Europa zu den häufigsten Serogruppen, die beim Menschen eine klinische Erkrankung auslösen (Beutin et al., 1998). Die Unterschiede der Zytotoxizität der verschiedenen Serotypen in der eigenen Studie waren nicht signifikant.

Es gibt ein breites Spektrum der Variabilität bei den Virulenzfaktoren von VTEC-Stämmen. Verschiedene Autoren haben Zusammenhänge zwischen der Erkrankung oder der Erkrankungsschwere mit bestimmten Virulenzfaktoren untersucht. Dabei wurde zweifellos herausgefunden, dass die Human-Pathogenität von VTEC-Stämmen von multiplen Faktoren abhängt (Scotland et al., 1987; Karmali, 1989; Ostroff et al., 1989; Schmidt und Karch, 1996; Piérard et al., 1997; Gyles et al., 1998). In dieser Arbeit erfolgte eine Schätzung der menschlichen Erkrankungswahrscheinlichkeit für ein VTEC-Isolat mit Hilfe eines logistischen Modells, welches 7 verschiedene Eigenschaften der Isolate berücksichtigt. Mit dem Modell kann geschätzt werden, wie wahrscheinlich es ist, dass ein Isolat eine humane Erkrankung verursachen kann. Stammt das betreffende Isolat von einem erkrankten Menschen, so ist es als humanpathogen definiert. Der mit dem Modell ermittelte Schätzwert kann so

validiert werden. Es wurden 4 Eigenschaften identifiziert, die einen signifikanten Einfluss auf die Verursachung einer menschlichen Erkrankung haben: das Vorhandensein von *vtx2* und des *eae*-Gens, die Zugehörigkeit zu einer potentiell humanpathogenen Serogruppe und der Induktionsgrad der Säureresistenz.

Das Fehlen von *vtx2*-Gen wirkt sich positiv auf die Erkrankungswahrscheinlichkeit aus. Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit vielen Inzidenzstudien, in welchen VTEC-Stämme, die nur *vtx2* tragen, überwiegend in Rinderbeständen, Hackfleisch, Rohmilchprodukten und in der Molkereiumgebung auftreten, während im Vergleich nur mit *vtx1* oder mit *vtx1/2* ausgestattete Isolate hier selten sind (Beutin et al., 1993; Zschöck et al., 2000; Fach, 2001; Rogerie et al., 2001; Fantelli und Stephan, 2001; McKee et al., 2003). Obwohl die Genotypen *vtx1* und *vtx1/2* bei den unkomplizierteren humanen Infektionen dominierten (Head et al., 1998; Böckenmühl et al., 1996), wurde eine Korrelation zwischen dem Genotyp *vtx2* und dem Auftreten von HUS nachgewiesen (Scotland et al., 1987; Ostroff et al., 1989; Tesh et al., 1993; Boerlin et al., 1999). Weiterhin ist in zwei Arbeiten eine unterschiedliche Erkrankungsschwere von Infektionen mit *vtx2*-variante-Gen tragenden Isolaten beschrieben worden (Paton et al., 1995; Friedrich et al., 2002). Leider fehlte in diesen Arbeiten die Subdifferenzierung innerhalb der verschiedenen *vtx2*-Varianten. Die Subdifferenzierung dieser Verotoxingene ist für epidemiologische Zwecke wichtig und könnte insbesondere auch für klinische Zwecke zur Einschätzung der Gefährlichkeit einer VTEC-Infektionen verwendet werden (Fruth et al., 2002).

Der enge Zusammenhang zwischen der Pathogenität eines VTEC und dem Vorhandensein der Virulenzgene *eae* und *hly* ist bekannt (Schmidt und Karch, 1996; Piérard et al., 1997). Die multivariate Analyse mit dem logistischen Modell bestätigte den signifikanten Einfluss des *eae*-Gens auf die Erkrankungswahrscheinlichkeit, aber nicht den Einfluss des *hly*-Gens. Im Gegensatz zum *eae*-Gen ist das *hly*-Gen unter den VTEC-Isolaten weit verbreitet. Möglicherweise würde die Untersuchung einer größeren Anzahl von VTEC-Isolaten die signifikante Beziehung des Vorhandenseins eines *hly*-Gens mit

einer erhöhten Erkrankungswahrscheinlichkeit in der Varianzanalyse ebenfalls bestätigen.

Obwohl die Serotypisierung allein nicht ausreichend ist, um die Pathogenität eines VTEC einschätzen zu können (Datz et al., 1996), könnte die Zugehörigkeit zu einer potentiell humanpathogenen Serogruppe im Zusammenhang mit weiteren Determinanten entscheidende Hinweise auf die Pathogenität eines Stammes liefern. In die eigene Studien wurden zwei weitere stetige unabhängige Variablen, der Induktionsgrad der Säureresistenz und die Zytotoxizität für die Abschätzung der Erkrankungswahrscheinlichkeit des VTEC-Stammes einbezogen. Während der Induktionsgrad der Säureresistenz klar mit dem Eintreten einer Erkrankung zusammenhing, konnte kein signifikanter Bezug mit der Vero-Zytotoxizität festgestellt werden. Die Säureresistenz gilt als ein potentieller Virulenzfaktor, weil sie die Infektionsdosis für die Erkrankung eines Menschen vermindern könnte (Gorden et al., 1993). Darüber hinaus wurde hier festgestellt, dass die Erkrankungswahrscheinlichkeit umso größer wird, je stärker die Säureresistenz durch Adaptation in mild saurem und nährstoffreichem Milieu induziert werden kann. Die VTEC-Isolate aus Patienten zeigen in der Regel eine höhere Zytotoxizität als Rinder- oder Lebensmittel-Stämme (Pradel et al., 2000), aber die Erkrankungswahrscheinlichkeit korreliert nicht unbedingt mit der in-vitro Zytotoxizität (Paton et al., 1995).

Mit dem Modell konnte die Erkrankungswahrscheinlichkeit eines VTEC-Stammes mit einer Korrektheit von etwa 85% eingeschätzt werden, aber es war nicht möglich, eindeutig vorherzusagen, ob ein VTEC-Stamm humanpathogen bzw. nicht-pathogen ist. Dabei ist zu beachten, dass in diesem Modell alle Erkrankungen mit Symptomen von wässriger Diarrhoe bis hin zu HUS gemeinsam betrachtet werden. Für eine genauere Schätzung wären detailliertere Studien notwendig, welche die Schwere der Erkrankung berücksichtigen und in welchen eine Subdifferenzierung von *vtx2* erfolgt.

---

## 5.2 HERSTELLUNG UND LAGERUNG VON MIT VTEC-STÄMMEN KONTAMINIERTEN SAUERMILCHERZEUGNISSEN

### 5.2.1 Herstellung und Lagerung von Sauermilcherzeugnissen aus VTEC-kontaminierter Milch mit hohem Kontaminationsniveau

Im Rahmen der Untersuchungen zeigte sich, dass der Säuerungsprozess und die Milchsäurebildung bei der Herstellung von Sauermilcherzeugnissen sowohl von der Spezies und der Aktivität der als Starterkultur eingesetzten Milchsäurebakterien als auch von der Dauer und der Temperatur bei der Fermentation abhängen. Im Vergleich mit anderen Produkten fiel der pH-Wert beim klassischen Joghurt am schnellsten (größte Säuerungsgeschwindigkeit) und stabilisierte sich bei dem niedrigsten Wert während der anschließenden Kühlung. Die Sauermilch zeigte die größte pH-Wert-Absenkung unter den Fermentationsbedingungen, die durch eine vergleichsweise lange Dauer und niedrige Temperaturen gekennzeichnet waren. Während der Kühlung reduzierte sich der pH-Wert in diesem Produkt kaum. Obwohl Joghurt mild am Ende der Fermentation signifikant höhere pH-Werte als die andere Produkte zeigte ( $P < 0,001$ ), erreichte der pH-Wert aufgrund der großen Nachsäuerungsfähigkeit von Joghurt mild während der Kühlung ein ähnliches Niveau wie in probiotischem Joghurt oder Sauermilch. Kurmann (1982) und Wegner (1996) haben ebenfalls eine abweichende Säuerungsaktivität der bei der Sauermilcherzeugnisherstellung verwendeten Milchsäurebakterienarten beobachtet. *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* erreichte die niedrigsten End-pH-Wert und bildete die größten Mengen von Milchsäure, während *Leuconostoc mesenteroides subsp. cremoris* den höchsten End-pH-Wert erzeugte.

Der L(+)- Milchsäure wird eine besondere ernährungsphysiologische Bedeutung beigemessen, da dieses Isomer im menschlichen Körper schnell und restlos abgebaut wird, D(-)- Milchsäure hingegen nur ungenügend und sehr langsam (Klupsch, 1982). Es wird deshalb empfohlen, zur Fermentation von Sauermilcherzeugnissen möglichst Starterkulturen mit L(+)- Milchsäurebildnern

einzusetzen (Kunath und Kandler, 1980). Bei den hergestellten Sauermilchprodukten wurde D-Milchsäurebildung nur bei klassischem Joghurt nachgewiesen, welches mit dem D(-)-milchsäurebildenden *L.bulgaricus* fermentiert wurde. In den anderen Produkten wurde eine überwiegende Bildung von L- Milchsäure festgestellt. In allen Produkten konnte eine starke Korrelation zwischen dem pH-Wert und dem Gesamtgehalt an Milchsäure nachgewiesen werden ( $P < 0,001$ ).

In klassischem Joghurt zeigten 2 Milchsäurebakterien, *S. thermophilus* und *L. bulgaricus*, ein typisches symbiotisches Verhalten während der Fermentation. Lactobazillen bauen Milcheiweiß zu freien Aminosäuren und Peptiden ab, was Streptokokken stimuliert. Andererseits werden Laktobazillen durch von den Streptokokken gebildeten Produkten Ameisensäure und  $\text{CO}_2$  aktiviert (Driessen et al., 1982). In dem Bemühen des Starterkulturherstellers, eher von den Verbrauchern geschmacklich bevorzugten mild-sauren Joghurt herzustellen, wurden andere Zusammensetzungen für die Starterkulturen für Joghurt mild und probiotischen Joghurt eingeführt. In diesen Produkten zeigt sich kein symbiotisches Verhalten. Während der Lagerung bei  $+7^\circ\text{C}$  sind die Keimzahlen der Streptokokken und der Laktobazillen in allen Joghurterzeugnissen relativ stabil. Dagegen erwiesen sich die Bifidobakterien als weniger stabil. In Joghurt mild erreichte die Keimzahl der Bifidobakterien bereits nach 3 Tagen Lagerung die Nachweisgrenze. Im probiotischen Joghurt reduzierte sich die Bifidobakterien-Keimzahl nach 7 Tagen rasch. Die International Dairy Federation (IDF, 1992b) schreibt vor, dass in als probiotisch deklarierten Sauermilcherzeugnissen mit Bifidobakterien zum Zeitpunkt des Verkaufes mindestens  $10^6$  KbE/g lebende Bifidobakterien vorliegen müssen. Der im Versuch hergestellte probiotische Joghurt kann diese Voraussetzung nur bis zum 14. Lagerungstag erfüllen.

Die Untersuchungen haben belegt, dass die drei eingesetzten VTEC-Stämme nicht nur während der Fermentation in allen Sauermilcherzeugnissen überleben, sondern sich auch vermehren können. Die Bedingungen zu Beginn der Fermentation der Joghurtprodukte waren unzureichend, um die

Vermehrung von VTEC zu hemmen. Der Keimzahlanstieg schwankte von 0,6 - 2,1 Log KbE/g je nach VTEC-Stamm und Produkt. Eine Vermehrung von VTEC- Stämmen während der Milchfermentation wurde ebenfalls von anderen Autoren beobachtet (Arocha et al., 1992; McIngvale et al., 2000; Chang et al., 2000; Maher et al., 2001). Dineen et al. (1998) haben festgestellt, dass die Vermehrung der VTEC-Stämme unter Fermentationsbedingungen mit einer Starterkultur wegen der Konkurrenz um Nährstoffe und des Vorkommens antibakterieller Substanzen inhibiert wird. Ohne Starterkultur würden sich die VTEC bei den gleichen Bedingungen stärker vermehren. Massa et al. (1997) konnten unter gleichen Fermentationsbedingungen wie in den eigenen Experimenten keine Vermehrung von *E.coli* O157:H7 beobachten. Dieses abweichende Ergebnis kann durch eine unterschiedliche Anwendung der VTEC-Teststämme und die Verwendung anderer Selektivmedien bei der Keimzahlbestimmung erklärt werden.

Im Verlauf der Kühlung bei +7°C zeigten die VTEC-Stämme je nach hergestelltem Produkttyp und eingesetztem Stamm unterschiedliche Absterberaten. Beim klassischen Joghurt wiesen die VTEC- Stämme die geringste Überlebensfähigkeit (10 - 17 Tage) auf. Dagegen konnten alle VTEC-Stämme in Joghurt mild, in probiotischem Joghurt und in Sauermilch nach einer Anreicherung über 30 Tage lang qualitativ nachgewiesen werden. McIngvale et al. (2000) konnten einen *E.coli* O157:H7, welcher während der Fermentation in Buttermilch inokuliert wurde, noch bis zu 22 Tagen Kühlung wiederfinden. In den Studien von Massa et al. (1997) und von Dineen et al. (1998) beschränkte sich der Nachweis von VTEC nur auf eine quantitative Bestimmung ohne Anreicherung und es wurden kürzere Kühlungzeiten gewählt. Die Resultate dieser Studien können nicht mit den eigenen Ergebnissen verglichen werden.

Die Untersuchungen haben belegt, dass die Vermehrungsrate der VTEC-Stämme während der Fermentation und ihre Überlebensfähigkeit während der Lagerung durch die unterschiedlichen Fermentationsbedingungen bei der Herstellung der Joghurtprodukte beeinflusst wurden. Die VTEC- Stämme

vermehrten sich beim klassischen Joghurt geringer während der Fermentation und sie starben während der Lagerung schneller ab als bei anderen Joghurtprodukten ( $P < 0,001$ ). Der unterschiedliche Inaktivierungseffekt der Starterkulturen ist auf die Unterschiede in der Milchsäurebildung und dementsprechend unterschiedliche pH-Reduktion zurückzuführen (Ogawa et al., 2001). Es gibt Hinweise darauf, dass auch das unterschiedliche Vermögen der verschiedenen Starterkulturen, weitere Metabolite wie Wasserstoffperoxyd und Bacteriocin zu bilden, einen Einfluss ausübt (Pulusani et al., 1979; Attaie et al., 1987; Motlagh et al., 1991; Nettles und Barefoot, 1993). Dineen et al. (1998) beobachteten eine unterschiedliche Hemmungswirkung von Milchsäurebakterien auf *E.coli* O157:H7, wobei eine Mischkultur aus *L. bulgaricus* und *S. thermophilus* VTEC-Stämme am stärksten inhibierte.

In Verbindung mit der Zusammensetzung der Starterkulturen wurde die Säuerungsgeschwindigkeit während der Fermentation als ein weiterer Einflussfaktor auf das Verhalten der VTEC-Stämme in Joghurtprodukten identifiziert ( $P < 0,001$ ). Je schneller die Säuerung während der Fermentation verlief und je niedriger der pH-Wert wurde, desto stärker wurden die VTEC-Stämme inaktiviert (Hudson et al., 1997; Lahti et al., 2001). Es wird berichtet, dass probiotische Milchsäurebakterien den menschlichen Darm besiedeln können und dass dadurch unerwünschte Keime in der Darmflora zurückgedrängt werden können (Weber, 1996). Der Vergleich von zwei Joghurtprodukten mit einander ähnlichen Säuerungsgeschwindigkeiten, wie Joghurt mild und probiotischer Joghurt, zeigte jedoch keinen besseren Hemmungseffekt der probiotischen Starterkultur auf VTEC.

Die eingesetzten Starterkulturen wurden in thermophile und mesophile differenziert und der Einfluss der Art der Starterkultur auf das Verhalten der VTEC-Stämme untersucht. Die VTEC-Stämme wiesen eine signifikant stärkere Vermehrung während der Fermentation und eine schnellere Absterberate während der Lagerung bei thermophilen als bei mesophilen Starterkulturen auf ( $P < 0,05$ ). Obwohl sich die VTEC-Stämme wegen der größeren Reduktion des pH-Wertes während der mesophilen Fermentation weniger vermehrten, konnten

sie dank der langsameren Säuerungsgeschwindigkeit bei den mesophilen Starterkulturen während der Lagerung besser überleben als bei den thermophilen Starterkulturen. Dineen et al. (1998) beobachteten ebenfalls eine stärkere Inaktivierung von VTEC-Stämmen durch die thermophilen Kulturen *L. bulgaricus* als durch die mesophilen *L. lactis spp. lactis* oder *L. lactis spp. cremoris*. Weiterhin stellten McIngvale et al. (2000) ebenfalls eine längere Überlebensfähigkeit von *E.coli* O157:H7 während einer Lagerung bei +5 °C von mit mesophilen Starterkulturen fermentierter Buttermilch im Vergleich zu mit thermophilen Starterkulturen fermentiertem klassischen Joghurt fest.

Durch die Varianzanalyse konnte das Verhalten der 3 VTEC-Stämme, die bereits nach ihrer Säureresistenzantwort als inhärent säureresistent (pHr), als induzierbar säureresistent (pHir) und als säuresensibel (pHs) differenziert wurden (siehe Kap. 4.1.1.2), verglichen werden. Die eigenen Studien zeigten keine signifikanten Unterschiede in den Vermehrungsraten der Stämme ( $P > 0,05$ ). Dagegen wurde ein signifikanter Einfluss des Säureverhaltens der Stämme auf ihre Überlebensrate während der Kühlung aller Produkte gefunden ( $P < 0,05$ ). Es ist bekannt, dass die Art der eingesetzten Säure das Verhalten der VTEC-Stämme beeinflusst (Buchanan und Edelson, 1999). Die eigenen Untersuchungen haben belegt, dass die Charakterisierung der Säureresistenz der Stämme mittels anorganischer Salzsäure für die Verhaltensstudien von VTEC in den organische Milchsäure enthaltenden Sauermilcherzeugnissen anwendbar war.

Die Stämme konnten anhand der ermittelten Dezimalreduktionsdauer (D-Wert) in einer abstuften Reihenfolge als pHir, pHr und pHs in den mit thermophilen Starterkulturen fermentierten Joghurtherzeugnissen zugeordnet werden. In vielen Studien wurde nachgewiesen, dass sich eine abweichende Resistenz der VTEC-Stämme aufgrund verschiedener Säurestressbedingungen von Lebensmitteln ergibt (Miller und Kaspar, 1994; Leyer et al., 1995). Der induzierbare resistente Stamm (pHir) könnte sich durch seinen von *rpoS* regulierten alternativen Sigmafaktor besonders effektiv vor Säurestress

schützen (Hengge-Aronis, 1993; Cheville et al., 1996; Lin et al., 1996). Im Gegensatz dazu ist anzunehmen, dass die vermutlich beim säuresensiblen Stamm vorhandene *rpoS*-Mutation die Stressantwort von diesem VTEC in Sauermilcherzeugnissen verhindert (Dineen et al., 1998). VTEC-Stämme haben auch eine verbesserte Überlebensfähigkeit durch die Adaptation in sauren Lebensmitteln gezeigt (Leyer et al., 1995). Die experimentellen Ergebnisse haben bestätigt, dass die von RpoS regulierte Stressantwort und die Adaptationsfähigkeit der Stämme eine bedeutende Rolle für ihr Überleben unter sauren und kühlen Lagerungsbedingungen in Joghurtherzeugnissen spielen.

In der mit mesophilen Starterkulturen fermentierten Sauermilch wies nicht der induzierbar resistente Stamm, der in Joghurtherzeugnissen am besten überleben konnte, sondern der inhärent säureresistente Stamm (pHr) die größte Überlebensrate während der Kühlung auf ( $P < 0,001$ ). Es ist anzunehmen, dass unter der lang andauernden Fermentation der Sauermilch bei niedrigeren Temperaturen die Stressantwort der Stämme im Vergleich zu Joghurtherzeugnissen nicht über RpoS reguliert wird, sondern durch einen anderen Mechanismus, wie z.B. ein generelles Stressresistenzsystem, welche beispielsweise infolge des Nährstoffmangels induziert worden sein könnte (Brudzinski und Harrison, 1998).

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Variabilität der Säureresistenzantwort der Stämme bei der Stammauswahl für die Erstellung eines prädiktiven Modells berücksichtigt werden muss, wenn man das Überleben von VTEC während der Herstellung von sauren Lebensmitteln realistisch modellieren möchte. Zur Klärung der Frage, ob die abweichende Säureresistenzantwort von VTEC-Stämmen sowohl in saurem Medium als auch in sauren Lebensmitteln im Zusammenhang mit einer unterschiedlichen in-vivo Überlebensrate unter Stressbedingungen im Magen-Darm-Trakt bei der Infektion des Menschen steht, besteht weiterer Forschungsbedarf.

Das bei den Untersuchungen in Kap. 3.1.1. eingesetzte VTEC-Kontaminationsniveau von 3 Log KbE/g ist zwar bedeutend höher als das in der Realität anzunehmende Kontaminationsniveau bei kommerziell produzierten

Sauermilcherzeugnissen, doch war es zur Charakterisierung der VTEC entsprechend ihrer Säureresistenzausprägung erforderlich. Datta und Benjamin (1999) haben eine Abhängigkeit der Säureresistenzantwort von der Zelldichte bei *E.coli* O157:H7 beobachtet. Deshalb wurden zusätzlich Sauermilcherzeugnisse aus Milch mit einem niedrigen VTEC-Kontaminationsniveau (ca. 1 Log KbE/g) hergestellt und der Einfluss des Kontaminationsniveaus auf die Überlebensfähigkeit von VTEC überprüft. Die Überlebensfähigkeit der induzierbar resistenten und der inhärent resistenten Stämme war jedoch fast unabhängig vom Kontaminationsniveau. Es wurde festgestellt, dass die VTEC-Stämme trotz des niedrigen Inokulumsniveaus in einigen Sauermilcherzeugnissen bis zum 35. Kühllagerungstag überleben können. Reitsma und Henning (1996) stellten Cheddar-Käse aus mit sehr niedrigem VTEC-Kontaminationsniveau (1 KbE/ml) kontaminierter Milch her und konnten in diesem Produkt bis zu 60 Tage lang überlebende VTEC nachweisen. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass sogar eine Kontamination mit nur einer einzigen koloniebildenden Einheit ein potentielles Risiko für die menschliche Gesundheit darstellen kann.

### **5.2.2 Verhalten der VTEC in postfermentativ kontaminierten Joghurtherzeugnissen**

Für diese Versuche wurden die Joghurtherzeugnisse nach der Fermentation mit dem induzierbar resistenten VTEC-Stamm kontaminiert. Das Verhalten des postfermentativ zugesetzten VTEC-Stammes wurde mit jenem bei prefermentativer Kontamination verglichen. Bei der postfermentativen Kontamination wurde das Verhalten des VTEC-Stammes von der Art des Joghurttyps beeinflusst. Der VTEC-Stamm wies in Joghurt mild eine wesentlich größere Überlebensrate als in klassischem Joghurt auf ( $P < 0,05$ ). Auch Hudson et al. (1997) fanden unterschiedliche Überlebensraten von *E.coli* O157:H7 bei postfermentativer Kontamination in Abhängigkeit vom pH-Wert des Joghurts. In Übereinstimmung mit McIngvale et al. (2000) zeigten die Untersuchungen eine deutlich bessere Überlebensrate des VTEC-Stammes bei der postfermentativen Kontamination als bei einer Kontamination vor der Fermentation.

Der Einfluss des Kontaminationszeitpunktes auf die Überlebensrate ist dadurch zu erklären, dass sich der Stamm in verschiedenen Wachstumsphasen befindet. Der vor der Fermentation in seiner stationären Phase zugesetzte VTEC-Stamm konnte sich während der Fermentation vermehren und ist dabei in die exponentielle Phase übergegangen. Dagegen blieb der postfermentativ zugesetzte Stamm in der stationären Phase. VTEC-Stämme weisen im Zusammenhang mit dem alternativen Sigmafaktor während der stationären Phase eine bessere Stressresistenz, einschließlich der Säureresistenz auf als in exponentiellen Phase (Small et al., 1994; Arnold und Kaspar, 1995; Benjamin und Datta, 1995; Rowburry, 1996; Cheng und Kaspar, 1998). Dieser Einfluss der Wachstumsphase auf die Überlebensfähigkeit des VTEC-Stammes während der Lagerung von Joghurtprodukten wurde bei den eigenen Untersuchungen bestätigt. Der Stamm aus der exponentiellen Wachstumsphase (postfermentative Kontamination) starb signifikant schneller ab als jener, welcher sich in der stationären Phasen befand ( $P < 0,05$ ).

Wenn man die vor der Fermentation zugesetzten Stämme mit den in der exponentiellen Phase befindlichen postfermentativ zugefügten Stämmen vergleicht, erkennt man eine tendenziell bessere Überlebensfähigkeit der vor der Fermentation inokulierten Stämme während der an die Fermentation anschließende Kühlagerung in den Joghurterzeugnissen. Es ist anzunehmen, dass beide Stämme zu Beginn der Kühlagerung in der exponentiellen Wachstumsphase waren, jedoch sie waren zuvor unterschiedlichen Bedingungen ausgesetzt. Die postfermentativ zugesetzten VTEC-Stämme waren vorher unter optimalen Bedingungen gewachsen, d.h. sie hatten keine Gelegenheit sich an die sub-optimalen Verhältnisse zu adaptieren. Die vor der Fermentation inokulierten Stämme konnten sich hingegen an die durch die Säuerung und das Vorkommen von konkurrierender Flora bedingten, sub-optimalen Verhältnisse adaptieren und dabei für die Stressantwort zuständige Gene wie *rpoS* hoch regulieren (Dodd und Aldsworth, 2002). Durch diese Adaptation könnte sich auch die Überlebensfähigkeit der VTEC-Stämme unter weiteren Stressbedingungen wie niedrige pH-Werte und niedrige Temperaturen in Sauermilcherzeugnissen oder in Magensäure verbessern (Goodson und

Rowbury, 1989; Layer et al., 1995; Buncic und Avery, 1998; Gahan und Hill, 1999). Möglicherweise kommt es bei dem Vorgang der Adaptation auch zu einer Erhöhung der Virulenz der VTEC-Stämme. Derart adaptierte Stämme stellen somit ein gesteigertes Risiko für die menschliche Gesundheit dar, wenn sie den Herstellungsprozeß der Lebensmittel überstehen und mit diesen von Menschen aufgenommen werden.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Für die Analyse der Risikofaktoren von Lebensmittelinfektionen ist es notwendig, die virulenzbestimmenden Eigenschaften von Erregern und ihre Beeinflussung durch die Interaktion mit Lebensmittelmatrizes zu charakterisieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Säureresistenz verschiedener VTEC-Stämme charakterisiert und in Zusammenhang mit der Ausprägung von Virulenzfaktoren von VTEC gebracht. Des Weiteren wurde die Bedeutung der Ausprägung der Säureresistenz bei der Herstellung von Sauermilcherzeugnissen untersucht.

Für 65 VTEC und 21 nicht-VTEC *E.coli* Stämme wurde die Säureresistenz und der Grad ihrer Induzierbarkeit ermittelt. Diese Eigenschaft wurde zu weiteren potentiellen Virulenzfaktoren wie Zytotoxizität, Toxintyp oder Besitz des *eae*- und des *hly*-Gens in Beziehung gesetzt. Mit Hilfe einer multiplen logistischen Regressionsanalyse wurde die Einflussgröße jeder Eigenschaft auf die Erkrankungswahrscheinlichkeit abgeschätzt. Weiterhin wurde das Verhalten von 3 unterschiedlich säureresistenten VTEC-Stämmen während der Fermentation und Lagerung von 4 Sauermilcherzeugnissen mit zwei Kontaminationsniveaus geprüft. Exemplarisch wurde mit einem Stamm eine postfermentative Kontamination bei Joghurtprodukten durchgeführt.

73,3% der getesteten Stämme waren säureresistent und bei zwei Dritteln der Isolate (68,6%) war die Säureresistenz induzierbar. Der Induktionsgrad der Säureresistenz korrelierte lediglich signifikant ( $p < 0,01$ ) mit dem *eae*-Gen und der Herkunft von Patienten. Die Schätzung der Erkrankungswahrscheinlichkeit belegte die signifikante ( $p < 0,05$ ) Bedeutung der induzierbaren Säureresistenz und des *eae*-Gens.

Alle 3 VTEC-Stämme überlebten die Fermentation der Sauermilchprodukte, sie konnten sich vermehren und starben erst während der Kühlung ab. Die spezifischen Vermehrungs- und Überlebensraten variierten je nach Produktart. Entscheidender technologischer Parameter war die Säuerungsgeschwindigkeit. Die Überlebensrate während der Kühlung wurde auch vom Säureverhalten des VTEC-Stammes beeinflusst. In klassischem Joghurt, der die ungünstigsten Bedingungen für die VTEC bot, zeigte der induzierbar säureresistente Stamm die signifikant größte Überlebensfähigkeit ( $p < 0,05$ ). Diese steigerte sich signifikant ( $p < 0,05$ ), wenn die Kontamination postfermentativ mit einer in der stationären Wachstumsphase befindlichen Kultur erfolgte. Die Tatsache, dass alle 3 VTEC-Stämme in den meisten Sauermilchprodukten auch bei geringem Kontaminationsniveau noch nach mehr als vierwöchiger Lagerung nachweisbar waren, belegt die Relevanz dieser Produktgruppe als potentielle Quelle für humane VTEC-Infektionen.

## 7 ABSTRACT

One of the most important steps in analysis of risk factors for foodborne infections is the identification of the characteristics associated with virulence and pathogenicity and their impact on survival of the pathogenic organisms during food processing. The aim of this study was to determine the acid stress response of various VTEC-strains and to study this features' influence on the fate of VTEC throughout the production of fermented milk products. 65 VTEC and 21 non-VTEC *E. coli* strains were tested for their ability to respond to acid stress and the association of stress resistance with other potential virulence factors in VTEC like cytotoxicity, type of toxins and possession of *eae*- or *hly*-gene was analyzed. The effectiveness of each of these potential virulence factors on human pathogenicity was estimated by means of a multiple logistic regression analysis. Moreover, the fate of three VTEC-strains displaying varied acid stress responses during fermentation and storage of 4 different fermented milk products using two contamination levels was studied. Exemplarily, the effect of post fermentation contamination was examined using one strain and two yogurt products.

73.3% of isolates showed resistance to acid and in two-thirds of strains (68.6%) the acid stress response was strengthened after adaptation. Strains with an inducible acid stress response significantly ( $p < 0.01$ ) more often carried the *eae*-gene and originated from infected humans. The estimation of disease probability approved the significant ( $p < 0.05$ ) role of *eae* and the adaptive stress response for pathogenicity. All 3 VTEC strains were able to multiply during fermentation but were inactivated whilst cold storage of the fermented milk products. Growth- and survival-rates were strain specific and varied among product types. Rate of acidification was determined to be the crucial technological factor. The survival rate of VTEC during cold storage as well was influenced by the acid stress response. The strain whose acid stress response was inducible after adaptation showed the significantly ( $p < 0.05$ ) best survival in classical yogurt, the product with most adverse conditions. The survival was significantly enhanced ( $p < 0,05$ ), when contamination occurred post-fermentative with a stationary-phase culture. As all three VTEC-strains were detectable after 4 weeks of cold-storage even in case of low-level contamination in most of the tested fermented milk products, this product group should be regarded as a potential vector for foodborne VTEC infections in humans.

## 8 LITERATURVEZEICHNIS

Ackers, M.L., Mahon, B.E., Leahy, E., Goode, B., Damrow, T., Hayes, P.S., Bibb, W.F., Rice, D.H., Barrett, T.J., Hutwagner, L., Griffin, P.W. u. Slutsker, L., 1998. An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with leaf lettuce consumption. *The Journal of Infectious Disease*. 177:1588-1593

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. *European Journal of Pediatrics*. 153:650-655

Altekruse, S.F., Cohen, M.L., u. Swerdlow, D.L., 1997. Emerging foodborne disease. <http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol3no3/cohen.htm3>

Ammon, A., Petersen, L.R. u. Karch, H., 1999. A large outbreak of hemolytic uremic syndrome caused by an unusual sorbitol-fermenting strain of *Escherichia coli* O157:H-. *The Journal of Infectious Disease*. 179:1274-1277

Archer, D.L., 1996. Preservation microbiology and safety: Evidence that stress enhances virulence and triggers adaptive mutations. *Trends in Food Science & Technology*. 7:91-95

Arendt, E.K., Coffey, A.G., Fitzgerald, G.F. u. Hammes, W.P., 1994. Bakteriophage den Kampf ansagen. *Lebensmitteltechnik*. 26:40-44

Arnold, K.W. u. Kaspar, C.W. 1995. Starvation- and stationary -phase-induced acid tolerance in *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and Environmental Microbiology*. 61:2037-2039

Arocha, M.M., Mcvey, M., Loder, S.D., Rupnow, J.H. u. Bullerman, L., 1992. Behavior of hemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 during the manufacture of cottage cheese. *Journal of Food Protection*. 55: 379-381

Attaie, R., Whalen, P.J., Shahani, K.M. u. Amer, M.A., 1987. Inhibition of growth of *staphylococcus aureus* during production of acidophilus yoghurt. *Journal of Food Protection*. 50:224-228

Baird-Parker, A.C. u. Gould, G.W., Microbial response to the food environment. In *Proceeding of the 4<sup>th</sup> world congress on foodborne infections and intoxications* 7-12. June, 1998, Berlin

Baustian, H., 1981. Technologie zur Herstellung von Joghurt und Sauermilcherzeugnissen. *Deutsche Milchwirtschaft*. 32:487-493

Bearson, S., Bearson, B. u. Foster, J.W., 1997. Acid Stress response in enterobacteria. *FEMS Microbiology Letters*. 147:173-180

Bell, B.P., Goldoft, M., Griffin, P.M., Davis, M.A., Gordon, D.C., Tarr, P.I., Bartleson, C.A. u. Lewis, J.H., 1994. A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7- associated bloody diarrhea and hemolytic uremic syndrome from hamburgers. *Journal of the American Medicine Association*. 272:1349-1353

Benito, A., Ventrouira, G., Casadei, M., Robinson, T, u. Mackey, B. 1999. Variation in resistance of natural isolates of *Escherichia coli* O157 to high hydrostatic pressure, mild heat and other stresses. *Applied and Environmental Microbiology*. 65:1564-1569

Benjamin, M.M. u. Datta, A.R., 1995. Acid tolerance of enterohemorrhagic *E.coli*. *Applied and Environmental Microbiology*. 61: 1669-1672

Berry, E.D. u. Cutter, C.N. 2000. Effects of acid adaptation of *Escherichia coli* O157:H7 on efficacy of acetic acid spray washes to decontaminate beef carcass tissue. *Applied and Environmental Microbiology*. 66: 1493-1498

Bertin, Y., Boukhors, K., Pradel, N., Livrelli, V. u. Martin, C., 2001. Stx2 subtyping of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle in France: Detection of a new stx2 subtype and correlation with additional virulence factors. *Journal of Clinical Microbiology*. 39:3060-3065

Beutin, L. u. Niemer, U., 1995. Erkennung, Verhütung und Bekämpfung von Infektionen durch enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC). *Bundesgesundheitsblatt*. 11: S 420-S427

Beutin, L., Aleksic, S., Bockemühl, J., Schwarzkopf, A. u. Karch, H., 1994. Zur Epidemiologie von Infektionen durch enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC) in der Bundesrepublik Deutschland im Jahr 1993. *Bundesgesundheitsblatt*. 10: S410-S414

Beutin, L., Geier, D., Steinrück, H., Zimmermann, S. u. Scheutz, F., 1993. Prevalence and some properties of verotoxin (Shiga-like-toxin) –producing *E.coli* in seven different species of healthy domestic animals. *Journal of Clinical Microbiology*. 31:2483-2488

Beutin, L. Zimmermann, S. u. Gleier, K., 1998. Human infections with shigatoxin-producing *Escherichia coli* other than serogroup O157 in Germany. *Emerging Infectious diseases*. 4:635-639

BfR, Bundesinstitut für Risikobewertung. 1999. Abschlußberichte der Arbeitsgruppe „Probiotische Mikroorganismenkulturen in Lebensmitteln“ am BgVV. <http://www.bfr.bund.de/cms/media.php/70/probiot.pdf>

BgVV, Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin, 1987a. Bestimmung des Gehaltes an L- und D- Milchsäure (L- und D- Lactat) in Milch und Milchprodukten; Enzymatisches Verfahren. Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG. L01.10-26

BgVV, Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin, 1987b. Vorbereitung der Probe für mikrobiologische Untersuchungen; Verfahren für Milch und flüssige Milchprodukte. Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG. L01.00-1

BgVV, Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin, 1987c. Bestimmung der coliformen Keime in Milch, Milchprodukten, Butter, Käse und Speiseeis; Verfahren mit festem Nährboden. Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG. L01.00-3

BgVV, Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin, 1987d. Bestimmung der *Escherichia coli* in Milch, Milchprodukten, Butter, Käse und Speiseeis; Verfahren mit flüssigem Nährmedium. Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG. L01.00-25

Bockemühl, J. u. KARCH, H. 1996. Zur aktuellen Bedeutung der enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC) in Deutschland (1994-1995). Bundesgesundheitsblatt 8/96:290-296

Bockenmühl, J., Karch, H., u. Tschäpe, H. 1997. Infektionen des Menschen durch enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC) in Deutschland, 1996. Bundesgesundheitsblatt. 6:194-197

Boerlin, P., McEwen, S.A., Boerlin-Petzhold, F., Wilson, J.B., Johnson, R.P. u. Gyles, C.L., 1999. Association between virulence factors of Shiga toxin-

producing *Escherichia coli* and disease in human. *Journal of Clinical Microbiology*. 37:497-503

Boyd, B. u. Lingwood, C. 1989. Verotoxin receptor glycolipid in human tissue. *Nephron*. 51:207–210

Brown, J.L., Ross, T., McMeekin, T.A. u. Nichols, P.D., 1997. Acid habituation of *Escherichia coli* and the potential role of cyclopropane fatty acids in low pH tolerance. *International Journal of Food Microbiology*. 37:163-173

Brudzinski, L. u. Harrison, M.A., 1998. Influence of incubation conditions on survival and acid tolerance response of *Escherichia coli* O157:H7 and non-O157:H7 isolates exposed to acetic acid. *Journal of Food Protection*. 61:542-546

Buchanan, R.L. u. Edelson, S.G., 1996. Culturing enterohemorrhagic *Escherichia coli* in the presence and absence of glucose as a simple means of evaluating the acid tolerance of stationary-phase cells. *Applied and Environmental Microbiology*. 62:4009-4013

Buchanan, R.L. u. Edelson, S.G., 1999. pH-Dependent stationary-phase acid resistance response of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* in the presence of various acidulants. *Journal of Food Protection*. 62: 211-218

Buncic, S. u. Avery, S.M., 1998. Effects of cold storage and heat-acid shocks on growth and verotoxin 2 production of *Escherichia coli* O157:H7. *Food Microbiology*. 15:319-328

Castanie-Cornet, M.-P., Penfound, T.A. , Smith, D., Elliott, J.F. u. Foster, J.W., 1999. Control of acid resistance in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 181: 3525-3535

CDR Wkly. 1999. *Escherichia coli* O157 associated with eating unpasteurised cheese—update. CDR Wkly. 9:131

Chang, J.-H., Chou, C.-C. u. Li, C.-F., 2000. Growth and survival of *Escherichia coli* O157:H7 during the fermentation and storage of diluted cultured milk drink. Food Microbiology. 17:579-587

Chang, Y.-Y. u. Cronan, J.E.Jr., 1999. Membrane cyclopropane fatty acid content is a major factor in acid resistance of *Escherichia coli*. Molecular Microbiology. 33:249-259

Cheng, C.-M. u. Kaspar, C.W., 1998. Growth and processing conditions affecting acid tolerance in *Escherichia coli* O157:H7. Food Microbiology. 15: 157-166

Cheville, A.M., Arnold, K.W., Buchrieser, C., Chen, C.-M. u. Kaspar, C.W., 1996. rpoS regulation of acid, heat, and salt tolerance in *Escherichia coli*. Applied and Environmental Microbiology. 62:1822-1824

Cody, S.H., Glynn, M.K, Farrar, J.A., Cairns, K.L., Griffin, P.M., Kobayashi, J.; Fyfe, M. Hoffman, R., King, A.S., Lewis, J.H., Swaminathan, B., Bryant, R.G. u. Vugia, D.J., 1999. An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection from unpasteurized commercial apple juice. Annals of Internal Medicine. 130:202-209

Coleman, M. u. Marks, H., 1998. Topics in dose-response modelling. Journal of Food Protection, 61:1550-1559

Datz, M., Janetzki-Mittmann, C., Franke, S., Gunzer, F., Schmidt, H. u. Karch, H., 1996. Analysis of the enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 DNA region containing lambdoid phage gene p and Shiga-like toxin structural genes. Applied and Environmental Microbiology. 62:791.797

- Dineen, S.S., Takeuchi, K., Soudah, J.E. u. Boor, K.J., 1998. Persistence of *Escherichia coli* O157:H7 in dairy fermentation systems. *Journal of Food Protection*. 61: 1602-1608
- Dodd, C.E.R. u. Aldsworth, T.G., 2002. The importance of RpoS in the survival of bacteria through food processing. *International Journal of Food Microbiology*. 74:189-194
- Donnenberg, M.S., Yu, J. u. Kaper, J.B., 1993. A second chromosomal gene necessary for intimate attachment of enteropathogenic *Escherichia coli* to epithelial cells. *Journal of Bacteriology*. 175: 4670-4680
- Driessen, D.M., Kingma, F. u. Stadhouders, J., 1982. Evidence that *Lactobacillus bulgaricus* in yogurt is stimulated by carbon dioxide produced by *Streptococcus thermophilus*. *Netherlands Milk and Dairy Journal*. 36:136-144
- Duffy, L.L., Grau, F.H. u. Vanderline, P.B., 2000. Acid resistance of enterohemorrhagic and generic *Escherichia coli* associated with foodborne disease and meat. *International Journal of Food Microbiology*. 60:83-89
- Eberhart-Phillips, J., Besser, R.E., Tormey, M.P., Feikin, D., Araneta, M.R. u. Wells, J., 1996. An outbreak of cholera from food served on international aircraft. *Epidemiology and Infection*. 116:9-13
- Engel, G., 2002. Optimierung eines Nährbodens zum quantitativen Nachweis von Bifidobakterien in fermentierten, probiotischen Milchprodukten. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte*. 54: 107-123
- Fach, P., Perelle, S. Dilasser, F. u. Grout, J., 2001. Comparison between a PCR-ELISA test and the vero cell assay for detecting Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in dairy products and characterization of virulence traits of the isolated strains. *Journal of Applied Microbiology*. 90:809-818

Fang, F.C., Kruase, M., Roudier, C., Fierer, J. u. Guiney, D.G., 1991. Growth regulation of a *Salmonella* plasmid gene essential for virulence. *Journal of Bacteriology*. 173:6783-6789

Fantelli, K. u. Stephan, R., 2001. Prevalence and characteristics of Shigatoxin-producing *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* strains isolated from minced meat in Switzerland. *International Journal of Food Microbiology*. 70:63-69

Farewell, A., Kvint, K. u. Nyström, T. 1998. UspB, a new sigma S-regulated gene in *Escherichia coli*, which is required for stationary phase resistance to ethanol. *Journal of Bacteriology*. 180:6140-6147

Feng, P., Lampel, K.A., Karch, H. u. Whittam, T.S., 1998. Genotypic and phenotypic changes in the emergence of *Escherichia coli* O157:H7. *The Journal of Infectious Disease*. 177:1750-1753

Ferreira, A., Rendano, L., Wiedmann, M. u. Boor, K.J., 1999. Characterization of *rpoS* alleles in *Escherichia coli* O157:H7 and in other *E.coli* serotypes. *Journal of Applied Microbiology*. 86:295-301

Foster, J.W. u. Hall, H.K., 1991. Inducible pH homeostasis and the acid tolerance response of *Salmonella typhimurium*. *Journal of Bacteriology*. 173. 5129-5135

Friedmann, C., Reddy, S., Samuel, M., Marcus, R., Bender, J., Desai, S., Shiferaw, B., Helfrick, D., Carter, M., Anderson, B., Hoeskstra, M. u. the EIP working group. 2000. Risk factors for sporadic campylobacter infections in the United States: A case-control study on Foodnet sites. [http://www.cdc.gov/foodnet/pub/iceid/2000/friedman\\_c.htm](http://www.cdc.gov/foodnet/pub/iceid/2000/friedman_c.htm)

Friedrich, A.W., Bielaszewska, M., Zhang, W.L., Pulz, M, Kuczius, T., Ammon, A. u. Karch, H., *Escherichia coli* harboring shigatoxin 2 gene variants: frequency and association with clinical symptoms. *Journal of Infectious Disease*. 185:74-84

Fruth, A., Prager, R., Friedrich, A., Kuczius, T., Roggentin, P., Karch, H., Ammon, A., Bockenmühl, J. u. Tschäpe, H., 2002. Infektionen des Menschen durch enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC) in der Bundesrepublik Deutschland von 1998 bis 2001. *Bundesgesundheitsbl-Gesundheitsforsch-Gesundheitsschutz*. 45:715-721

Gallien, P., Karch, H., Perlberg, K.-W., and Protz, D., 2000. Shigatoxin – produzierende *Escherichia coli* (STEC). *BgVV Hefte*: 83-105

Gallien, P., Much, C., Perlberg, K.-W. u. Protz, D., 1999. Subtypisierung von stx-Genen in Shigatoxin-produzierenden *Escherichia coli* (STEC). *Fleischforschung und Entwicklung*. 99-103

Garren, D.M., Harrison, M.A. u. Russel, S.M., 1998. Acid tolerance and acid shock response of *Escherichia coli* O157:H7 and non-O157:H7 isolates provide cross protection to sodium lactate and sodium chloride. *Journal of Food Protection*. 61:158-161

Gehan, C.G. u. Hill, C. 1999. The relationship between acid stress responses and virulence in *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*. 50:93-100

Goodson, M. u. Rowbury, R.J., 1989. Resistance of acid-habituated *Escherichia coli* to organic acids and its medical and applied significance. *Letters in Applied microbiology*. 8: 211-214

Gorden, J. u. Small, P.L.C., 1993. Acid resistance in enteric bacteria. *Infection and Immunity*. 61:364-367

Green, L.M., Reade, J.L., u. Ware, C.F., 1984. Rapid colormetric assay for cell viability: Application to the quantitation of cytotoxic and growth inhibitory lymphokines. *Journal of Immunological Methods*. 70: 257-268

Gyles, C., Johnson, R., Gao, A., Ziebell, K., Piérard, D., Aleksic, S. u. Boerlin, P., 1998. Association of enterohemorrhagic *Escherichia coli* hemolysin with serotypes of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* of human and bovine origins. *Applied and Environmental Microbiology*. 64:4134-4141

Hacker, J. u. Kaper, J.B., 2000. Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annual Review of Microbiology*. 54:641-679

Head, S.C., Petric, M., Richardson, S., Roscoe, M. u. Karmali, M.A., 1988. Purification and characterization of verocytotoxin 2. *FEMS Microbiology Letters*. 51:211-216

Hengge-Aronis, R., 1993. Survival of hunger and stress: the role of RpoS in early stationary phase gene regulation in *Escherichia coli*. *Cell*. 72:165-168

Hengge-Aronis, R., 2000. The general stress response in *Escherichia coli*. In „Bacterial stress responses“ ed. Storz, G. u. Hengge-Aronis, R., ASM Press, Washington D.C.

Herrmann, M., Bylund, G., Damerow, G., Bake, K., Kirschenmann, B., Münster, P. u. Wilde, G., Gesäuerte Milchprodukte. Ed. Tetra Pak. in *Handbuch der Milch- und Molkereitechnik*. 2. Auflage. Th. Mann Verlag. Gelsenkirchen-Buer. 177-192

Hersh, B.M. , Farooq, F.T., Barstad, D.N., Blankenhorn, D.L. u. Slonczewski, J.L. 1996. A glutamate-dependent acid resistance gene in *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology. 178:3978-3981

Hörmansdorfer, S., Gareis, M., Bauer, J. u. Mayr, A., 1995. Zum Nachweis der Shiga-like Toxine von *Escherichia coli* mit Hilfe des MTT-Zellkulturtests. Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und –Forschung. 201:293-297  
[http://www.foodprotect.org/pdf/hazard\\_foods/chapter5.pdf](http://www.foodprotect.org/pdf/hazard_foods/chapter5.pdf)

Huber, H.C., Kugler, R. u. Liebl, B., 1997. Infektionen mit enterohämorrhgischen *Escherichia coli* (EHEC)-Ergebnisse einer epidemiologischen Erhebung in Bayern für den Zeitraum April 1996 bis März 1997. Gesundheitswesen. 60:159-165

Hudson, L.M. , Chen, J., Hill u. Griffiths, M.W., 1997. Bioluminescence: A rapid indicator of *Escherichia coli* O157:H7 in selected yogurt and cheese varieties. Journal of Food Protection. 60:891-897

IDF, International Dairy Federation. 1992a. Consumption statistics 1990. IDF-Bulletin, Brussels, No. 270

IDF, International Dairy Federation, 1992b. General standard of identity for fermented milks. International Standard: IDF 163

IDF, International Dairy Federation. 1983. Cultured dairy foods in human nutrition. IDF-Bulletin, Brussels, No.159

IFT, Institute of Food Technologists. 2000. Emerging microbiological food safety issues. Implications for control in the 21st century. 1-107.  
<http://www.ift.org/cms/?pid=1000379>

IFT, Institute of Food Technologists. 2001. Effect of preservation technologies and microbiological inactivation in foods

Iriate, M., Stainer, I. u. Cornelis, G.R., 1995. The *rpoS* gene from *Yersinia enterocolitica* and its influence on expression of virulence factors. *Infection and Immunity*. 63:1840-1847

ISO, International organization for standardization, 1998. Microbiology of food and animal feeding stuffs –Horizontal method for the enumeration of mesophilic lactic acid bacteria- Colony-count technique at 30 °C. ISO 15214:1998.

ISO, International organization for standardization, 2003. Yogurt- Enumeration of characteristic microorganisms- Colony-count technique at 37 °C. ISO 7889:2003

ISO, International organization for standardization, Fermented milk - Enumeration of *Lactobacillus acidophilus* – Colony count technique at 43 °C. ISO/TC 34 SC 5

Jarvis, K.G., Giron, J.A., Jerse, A.E., McDaniel, T.K., Donnenberg, M.S. and Kaper, J.B., 1995. Enteropathogenic *Escherichia coli* contains a putative type III secretion system necessary for the export of proteins involved in attaching and effacing lesion formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92:7996-8000

Jishage, M., Iwata, A., Uede, S. u. Ishihama, A., 1996. Regulation of RNA polymerase sigma subunits synthesis in *Escherichia coli*: intracellular levels of four species of sigma subunit under various growth conditions. *Journal of Bacteriology*. 178:5547-5451

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. u. Lior, H., 1996. Growing concerns and

recent outbreaks involving non-O157:H7 serotypes of verotoxigenic *Escherichia coli*. Journal of Food Protection. 59:1112-1122

Johnson, W.M., Lior, H. u. Bezanson, G.S., 1983. Cytotoxic *Escherichia coli* O157:H7 associated with haemorrhagic colitis in Canada. Lancet I, 76

Kaper, J.B., 1998. Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. Current Opinion in Microbiology. 1: 103-108

Karch, H. u. Meyer, T., 1989. Single primer pair for amplifying segments of distinct Shiga-like-toxin genes by polymerase chain reaction. Journal of Clinical Microbiology. 27:2751-2757

Karch, H., Wib, R., Gloning, P., Emmerich, S., Aleksic, S.u. Bockemühl, J., 1990. Hämolytische-urämisches Syndrome bei Kleinkindern durch Verotoxin-produzierende *Escherichiacoli*. Deutsche Medizinische Wochenschrift. 115: 489-495

Karmali, M.A., 1989. Infections by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. Clinical Microbiology Review. 2:15-38

Keene, W.E.; Hedberg, K., Herriott, D.E., Hancock, D.D., McKay, R.W., Barrett, T.J. u. Fleming, D.W., 1997. A prolonged outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections caused by commercially distributed raw milk. Journal of Infectious Disease. 176:815-818

Klupsch, H.J., 1980. Herstellung haltbarer saurer Milchgetränke. Grundlagen, Mikrobiologie, Technologie, Kontrolle. Molkerei-Zeitung Welt der Milch. 34:965-969

Klupsch, H.J., 1982. Deutsche Milchwirtschaft. L(+)- und D(-)-Milchsäure in Sauermilchprodukten. Deutsche Milchwirtschaft. 8:268-272

Konowalchuk, J., Speirs, J.I. u. Savric, S., 1977. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. Infection and Immunity. 18:775-779

Kreft, B., Carstensen, O., Straube, E., Bohnet, S., Hacker, J. u. Marre, R., 1992. Adherence to and cytotoxicity of *Escherichia coli* for eucaryotic cell lines quantified by MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium Bromide). Zbl. Bakt. 276:231-242

Kunath, P. u. Kandler, O., 1980. Der Gehalt an L(+) und D(-) Milchsäure in Joghurtprodukten. Milchwirtschaft. 35:8

Kurmann, J.A., 1982. Die Übersäuerung der Joghurtgallerte, ein häufig auftretender und zu wenig beachteter Produktionsfehler, dessen Entstehung und Bekämpfung. Deutsche Molkerei-Zeitung. 21:690-698

Lahti, E., Johansson, T., Honkanen-Buzalski, T., Hill, P. u. Nurmi, E., 2001. Survival and detection of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* during the manufacture of dry sausage using two different starter cultures. Food Microbiology. 18: 75-85

Leistner, L., 2000. Basic aspects of food preservation by hurdle technology. International Journal of Food Microbiology. 55:181-186

Levine, M.M., 1987. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic and enteroadherent. The Journal of Infectious Disease. 155: 377-389

Leyer, G.J., Wang, L.-L. and Johnson, E.A., 1995. Acid adaptation of *Escherichia coli* O157: H7 increases survival in acidic foods. Applied and Environmental Microbiology. 61: 3752-3755

Liddell, K.G. 1997. *Escherichia coli* O157: Outbreak in central Scotland. *Lancet* 349: 502-503

Lin, J., Lee, I.S., Frey, J., Slonczewski, J.L. u. Foster, J.W., 1995. Comparative Analysis of extreme acid survival in *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, and *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 177:4097-4104

Lin, J., Smith, M.P., Chapin, K.C., Baik, H.S., Benett, G.N. u. Foster, J.W., 1996. Mechanisms of Acid Resistance in Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*. 62 (9):3094-3100

Lindgren, S.W., Samuel, J.E., Schmitt, C.K., O'Brien, A.D., 1994. The specific activities of shiga-like toxin type II (SLT-II) and SLT-II-related toxins of enterohemorrhagic *Escherichia coli* differ when measured by Vero cell cytotoxicity but not by mouse lethality. *Infection and Immunity*. 62:623-631

Loewen, P.C., Hu, B., Strutinsky, J. u. Sparling, R. 1998. Regulation in the rpoS regulon of *Escherichia coli*. *Canadian Journal of Microbiology*. 44:707-717

Louise, C.B. and Obrig, T.G., 1995. Specific interaction of *Escherichia coli* O157:H7-derived Shiga-like toxin II with human renal endothelial cells. *Journal of Infectious Disease*. 172:1397-1401

Maher, M.M., Jordan, K.N., Upton, M.E. u. Coffey, A., 2001. Growth and survival of *E.coli* O157:H7 during the manufacture and ripening of a smear-ripened cheese produced from raw milk. *Journal of Applied Microbiology*. 90:201-207

Massa, S., Altieri, C., Quaranta, V. u. Pace, R.D., 1997. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in yogurt during preparation and storage at 4°C. *Letters in Applied Microbiology*. 24: 347-350

Mayr, W., 1981. Allgemeines über saure Milcherzeugnisse. Deutsche Milchwirtschaft. 32:577-578

Mazotta, A.S., 1999. Problems and solutions to development of pathogen resistance to thermal processing. International Conference on Scientometrics & informetrics (ISSI) Meeting.

McDaniel, T.K., Jarvis, K.G., Donneberg, M.S. u. Kaper, J.B., 1995. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America., 92, 1664–1668

McIngvale, S.C. , Chen, X.Q., McKillip, J.L. and Drake, M.A., 2000. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in buttermilk as affected by contamination point and storage temperature. Journal of Food Protection. 63:441-444

McKee, R., Madden, R.H. u. Gilmour, A., 2003. Occurrence of Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* in dairy and meat processing environments. Journal of Food Protection. 66:1576-1580

Mckellar, R.C. u. Knight, K.P., 1999. Growth and survival of various strains of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* in hydrochloric and acetic acid. Journal of Food Protection. 62:1466-1469

Mead, P.S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L.F., Bresee, J.S., Shapiro, C., Griffin, P.M. u. Tauxe, R.V., 1999. Food-related illness and death in the United States. Emerging infectious Disease. 5:607-625

Mekalanos, J.J., 1992. Environmental signals controlling expression of virulence determinants in bacteria. Journal of Bacteriology. 174:1-7

Menge, C., Wieler, L.H., Schlapp, T., u. Baljer, G., 1999. Shiga toxin 1 from *Escherichia coli* Blocks activation and proliferation of bovine lymphocyte subpopulations in vitro. *Infection and Immunity*. 67: 2209-2217

Miller, L.G. u. Kaspar, C. W., 1994. *Escherichia coli* O157:H7 acid tolerance and survival in apple cider. *Journal of Food Protection*. 57: 460-464

Morgan, D., Newman, C.P., Hutchinson, D.N., Walker, A. M., Rowe, B. u. Majid, F., 1993. Verotoxin producing *Escherichia coli* O 157 infection associated with the consumption of yogurt. *Epidemiology and Infection*. 111:181-187

Mosmann, T., 1983. Rapid colormetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. 65:55-63

Mossel, A., 1987. Mikrobielle Rekontamination von Milch und Milchprodukten. *Deutsche Molkerei Zeitung*. 45: 1456-1464

Motlagh A.M., Johnson, M.C. u. Ray, B., 1991. Viability loss of foodborne pathogens by starter culture metabolites. *Journal of Food Protection*. 54:873-878

Nettles, C.G. u. Barefoot, S.F., 1993. Biochemical and genetic characteristics of bacteriocins of food-associated lactic acid bacteria. *Journal of Food Protection*. 56:338-356

Ogawa, M., Shimizu, K., Nomoto, K., Tanaka, R., Hamabata, T., Yamasaki, S., Takeda, T., u. Takeda, Y., 2001. Inhibition of in vitro growth of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 by probiotic *Lactobacillus* strains due to production of lactic acid. *International Journal of Food Microbiology*. 68:135-140

Ostroff, S.M., Tarr, P.I., Neill, M.A., Lewis, J.H., Hargrett-Bean, N. u. Kobayashi, J.M., 1989. Toxin genotypes and plasmid profiles as determinants of systemic sequelae in *Escherichia coli* O157:H7 infections. *Journal of Infectious Disease*. 160:994-999

Paton, A.W., Bourne, A.J., Manning, P.A. u. Paton, J.C., 1995. Comparative toxicity and virulence of *Escherichia coli* clones expressing variant and chimeric Shiga-like toxin type II operons. *Infection and Immunity*. 63:2450-2458  
Paton, J.C. u. Paton, A.W., 1989. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin producing- *E.coli* infections. *Clinical Microbiology Review*. 11:450-479

Pebody, R.G., Furtado, C., Rojas, A., McCarthy, N., Nylén, G., Ruutu, P., Leino, T., Chalmers, R., de Jong B., Donnelly, M. et al., 1999. An international outbreak of Veroto cytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 infection amongst tourists; a challenge for the European infectious disease surveillance network. *Epidemiology and Infection*. 123:217-223

Perna, N.T., Plunkett, G. 3rd, Burland, V., Mau, B., Glasner, J.D., Rose, D.J., Mayhew, G.F., Evans, P.S., Gregor, J., Kirkpatrick, H.A., Posfai, G., Hackett, J., Klink, S., Boutin, A., Shao, Y., Miller, L., Grotbeck, E.J., Davis, N.W., Lim, A., Dimalanta, E.T., Potamousis, K.D., Apodaca, J., Anantharaman, T.S., Lin, J., Yen, G., Schwartz, D.C., Welch, R.A. u. Blattner, F.R., 2001. Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Nature*. 409:529-533

Piérard, D., Stevens, D., Moriau, L, Lior, H. u. Lauwers, S., 1997. Isolation and virulence factors of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* in human stool samples. *Clinical Microbiology and Infection*. 3:531-540

Pradel, N., Livrelli, V., Champs, C.D., Palcoux, J.-B., Reynaud, A., Scheutz, F., Sirot, J., Joly, B. u. Forestier, C., 2000. *Journal of Clinical Microbiology*. 38:1023-1031

Pulusani, S.R., Rao, D.R. u. Sunki, G.R., 1979. Antimicrobial activity of lactic cultures: Partial purification and characterization of antimicrobial compound(s) produced by *Streptococcus thermophilus*. Journal of Food Science. 44:575-578

Rees, C.E.D., Dodd, C.E.R., Gibson, P.T., Booth, I.R. u. Stewart, G.S.A:B., 1995. The significance of bacteria in stationary phase to food microbiology. International Journal of Food Microbiology 28:263-275

Reitsma, C.J. u. Henning, D.R., 1996. Survival of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 during the manufacture and curing of Cheddar cheese. Journal of Food Protection. 59:460-464

Richter, H., Klie, H., Timm, M., Gallien, P., Steinruck, H., Perlberg, K.W. u. Protz, D., 1997. Verotoxinbildende *Escherichia coli* (VTEC) im Kot von Schlachtrindern aus Deutschland. Berliner Münchener Tierärztliche Wochenschrft. 110:121-127

Riley, L.W., Remis, R.S., Helgerson, S.D., McGee, H.B., Wells, J.G., Davis, B.R., Hebert, R.J., Otcott, E.S., Johnson, L.M., Hargrett, N.T., Blake, P.A. u. Cohen, M.L., 1983. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* O157:H7 serotype. The New England Journal of Medicine. 308:681-685

Rogerie, F., Marecat, A., Gambade, S., Dupond, F., Beaubois, P. u. Lange, M., 2001. Characterization of Shiga toxin producing *E.coli* and O157 serotype *E.coli* isolated in France from healthy domestic cattle. International Journal of Food Microbiology. 63:217-223

Rowan, N.J., 1999. Evidence that inimical food-preservation barriers alter microbial resistance, cell morphology and virulence. Trends in Food Science & Technology. 10:261-270

Rowbury, R.J. 1996. A review: regulatory components, including integration host factor, CysB and H-NS, that influence pH responses in *Escherichia coli*. Letters in Applied Microbiology. 24:319-328

Samadpour, M., Ongerth, J.E., Liston, J., Tran, N., Nguyen, D., Whittam, T.S., Wilson, R.A. u. Tarr, P.I., 1994. Occurrence of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* in retail fresh seafood, lamb, pork, and poultry from grocery stores in Seattle, Washington. Applied and Environmental Microbiology. 60:1038-1040

Schmidt, H. u. Karch, H., 1996. Enterhemolytic phenotypes and genotypes of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* O111 strains from patients with diarrhea and hemolytic-uremic syndrome. Journal of Clinical Microbiology, 34:2364-2367

Scotland, S.M., Willshaw, G.A., Smith, H.R. u. Rowe, B., 1987. Properties of strains of *Escherichia coli* belonging to serogroup O157 with special reference to production of vero cytotoxins VT1 and VT2. Epidemiology and Infection. 99:613-624

Sheehan, B.J., Foster, T.J., Dorman, C.J., Park, S. u. Stewart, G.S., 1992. Osmotic and growth phase dependent regulation of the *eta* gene of *Staphylococcus aureus*: a role for DAN supercoiling. Molecular and General Genetics. 232:49-57

Sheridan, J.J. u. McDowell, D.A., 1998. Factors affecting the emergence of pathogens on foods. Meat Science. 49:S151-S167

Small, P., Blankenhorn, D., Wlty, E., Zinser, E. u. Slonczweski, J.L., 1994. Acid and base resistance in *Escherichia coli* and *Shigella flexneri*: role of *rpoS* and growth pH. Journal of Bacteriology. 176:1729-173

Sokolovic, Z., Reidel, J., Wuenscher, M. u. Goebel, W., 1993. Surface-associated, *prfA*-regulated proteins of *Listeria monocytogenes* synthesized under stress conditions. *Molecular Microbiology*. 8:219-227

Speirs J.I., Stavric S. u. Konowalchuk J., 1977. Assay of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin with vero cells. *Infection and Immunity*. 16:617-622

Spillmann, H., 1981. Sauermilchprodukte- Mikrobiologische und hyginische Aspekte. *Schweiz. Milchw. Forschung*. 10:76-82

Tao, H., Bausch, C., Richmond, C., Blattner, F.R. u. Conway, T., 1999. Functional genomics: Expression analysis of *Escherichia coli* growing on minimal and rich media. *Journal of Bacteriology*. 181:6425-6440

Tarr, P.I., 1995. *Escherichia coli* O157:H7: clinical, diagnostic, and epidemiological aspects of human infection. *Clinical infectious Disease*. 20: 1-8

Taylor, J.L., Tuttle, J., Pramukul, T., O'Brien, K., Baret, T.J. u. Jolbitado, B., 1993. An outbreak of cholera in Maryland associated with imported commercial coconut milk. *The Journal of Infectious Disease*. 167:1330-1335

Tesh, V.L. u. O'Brien, A.D., 1991. The pathogenic mechanisms of Shiga toxin and the Shiga-like toxins. *Molecular Microbiology*. 5:1817-1822

Tesh, V.L., Burris, J.A., Owens, J.W., Gordon, V.M., Wadolkowski, E.A., O'Brien, A.D. u. Samuel, J.E., 1993. Comparison of relative toxicities Shiga-like toxins type I and type II for mice. *Infection and Immunity*. 61. 3392-3402

Teuber, M., 1984. Starterkulturen-zum Stand der Forschung und Praxis. *Deutsche Molkerei-Zeitung*. 105-1462

Teuber, M., 1986. Mikrobiologie fermentierter Milchprodukte. Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm. 9:162-172

Tilden, J. Jr., Young, W., McNamara, A.M., Custer, C., Boesel, B.I., Lambert-Fair, M.A., Majkowski, J., Vugia, D., Werner, S.B., Hollingsworth, J. u. Morris, J.G.Jr., 1996. A new route of transmission for *Escherichia coli*: infection from dry fermented salami. American Journal of Public Health. 86:1142-1145

Tirado, C. u. Schmidt, K. 2000. 7<sup>th</sup> report of the WHO surveillance programme for the control of foodborne infections and intoxications in Europe (1993-1998). [http://www.euro.who.int/foodsafety/Surveillance/20020904\\_4.htm](http://www.euro.who.int/foodsafety/Surveillance/20020904_4.htm)

Upton, P. u. Coia, J.E., 1994. Outbreak of *Escherichia coli* O157 infection associated with pasteurized milk supply. Lancet. 344:1015

Uyttendaele, M. Jozwik, E., Tutenel, A., De Zutter, L., Uradzinski, J., Pierard, D. u. Debevere, J., 2001. Effect of acid resistance of *Escherichia coli* O157:H7 on efficacy of buffered lactic acid to decontaminate chilled beef tissue and effect of modified atmosphere packaging on survival of *Escherichia coli* O157:H7 on red meat. Journal of Food Protection. 64:1661-1666

Vogel, H.J., and Bonner, D.M., 1956. Acetylornithase of *Escherichia coli*; partial purification and some properties. The Journal of Biological Chemistry. 218: 97-106

Wang, Y. u. Kim, K.S., 2000. Effect of rpoS mutations on stress-resistance and invasion of brain microvascular endothelial cells in *Escherichia coli* K1. FEMS Microbiology Letters. 182:241-247

Watanabe, H., Wada, A., Inagaki, Y., Itoh, K. u. Tamura, K., 1996. Outbreaks of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 infection by two different genotype strains in Japan.,1996. Lancet. 348:831-832

Watanabe, Y. u. Ozasa, K., 1997. An epidemiological study on an outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection. *Journal of clinical Pathology*. 45:867-874

Waterman, S.R. u. Small, P.L.C., 1996. Characterization of the acid resistance phenotype and rpoS alleles of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*. 64:2808-2811

Weagant, S.D., Bryant, J.L. u. Bark, D.H., 1994. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in mayonnaise-based sauces at room and refrigerated temperatures. *Journal of Food Protection*. 57:629-631

Weber, H., 1996. Starterkulturen in milchverarbeitenden Industrie. Ed. Weber, H., in *Mikrobiologie der Lebensmittel: Milch und Milchprodukte*. Hamburg. Behr 105-149

Wegner, K., 1996. Mikrobiologie der Sauermilcherzeugnisse. ed Weber, H., in *Mikrobiologie der Lebensmittel – Milch und Milchprodukte*. Behr's Verlag, Hamburg, 153-230

Whiting, R.C. and Golden, M.H., 2002. Variation among *Escherichia coli* O157:H7 strains relative to their growth, survival, thermal inactivation. toxin production in broth. *International Journal of Food Microbiology*. 75:127-133

WHO, World Health Organization. 1995. Report of the WHO working group on Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* (SLTEC), with emphasis on zoonotic aspects. WHO. Geneva

WHO, World Health Organization. 2002. Global surveillance of foodborne disease: developing a strategy and its interaction with risk analysis. WHO consultation, Geneva, Switzerland, 26-29 November 2001. 1-21

Willshaw, G.A., Thirlwell, J., Jones A.P., Parry, S., Salmon, R.L. u. Hickey, M., 1994. Verotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in beefburgers linked to

an outbreak of diarrhoea, haemorrhagic colitis and haemolytic uraemic syndrome in Britain. *Letters in Applied Microbiology*. 19:304-307

Yamasaki, S., Furutani, M., Ito, K., Igarashi, K., Nishibuchi, M. u. Takeda, Y., 1991. Important of arginine at position 170 of the A subunit of vero toxin 1 produced by enterohemorrhagic *Escherichia coli* for toxin activity. *Microbial Pathogenesis*. 11:1-9

Yokoigawa, K., Takikawa, A., Okubo, Y., u. Umesako, S., 2003. Acid tolerance and gad mRNA levels of *Escherichia coli* O157:H7 grown in foods. *International Journal of Food Microbiology*. 82:203-211

Yokoyama, K. , Horii, T., Yamashino, T. Hashikawa, S., Barua, S., Hasegawa, T., Watanabe, H. u. Ohta, M., 2000. Production of Shiga toxin by *Escherichia coli* measured with reference to the membrane vesicle-associated toxins. *FEMS Microbiology Letters*. 192:139-144

Zambrano, M.M., Siegele, D.A., Almiron, M., Tormo, A. u. Kolter, R. 1993. Microbial competition: *Escherichia coli* mutants that take over stationary phase cultures. *Science*. 259:1757-1760

Zschöck, M., Hamann, H.P., Kloppert, B. u. Wolter, W., 2000. Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* in faeces of healthy dairy cows, sheep and goats: prevalence and virulence properties. *Letters in Applied Microbiology*. 31:203-208

## **DANKSAGUNG**

Herrn Prof. Dr. D. Knorr danke ich für die Überlassung des Themas, die jederzeit gewährte freundliche Unterstützung bei der Anfertigung meiner Dissertation und besonders seine große Geduld

Frau Dr. E. Bartelt danke ich für die stets engagierte Betreuung und die zahlreiche Anregungen, die zur Erstellung dieser Arbeit unbedingt notwendig waren.

Frau Dr. J. Bräunig danke ich für die intensive Unterstützung und freundliche Anleitung während der Projektarbeit.

Herrn Dr. Teufel und Herrn Dr. Weise danke ich für die Vermittlung an das Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV) .

Bei allen Mitarbeitern des Fachbereiches "Hygiene der Lebensmittel und Bedarfsgegenstände" im BfR bedanke ich mich sehr für ihre fachliche und seelische Unterstützung, ohne die diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

Frau C. Buhler, Frau M. Müller und Frau V. Kluge danke ich besonders für die fachliche Hilfe bei der Durchführung der praktischen Untersuchungen.

Frau P. Luber und Frau C. Weber danke ich herzlich für das Korrekturlesen, die wertvollen Anregungen und ihre ständige Hilfsbereitschaft bei der Fertigstellung der Arbeit.

Frau P. Vogt, Frau H. Mihajlovic, Frau M. Böhm und Frau G. Sipos danke ich für die motivationsfördernde gute Laune.

Schließlich möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden für ihre Unterstützung bedanken.

## LEBENS LAUF

Name: Chi-Yeun Cheung

Geburtsdatum: 01. 02. 1972

Geburtsort: Kangnung, Südkorea

Ausbildung:

03. 1990 - 02. 1994 Studium der Lebensmittel- und Biotechnologie an der Yonsei Universität, Seoul, Südkorea  
Bachelor of Science

12. 1993 - 01. 1995 Angestellte im HAITAI Confectionary Co.Ltd.,  
Zentrum für Forschung und Entwicklung, Seoul, Südkorea

03.1995 - 02. 1997 Studium der Gesundheitswissenschaft  
an der Seoul National University, Seoul, Südkorea  
Master of Public Health

07. 1995 - 10. 1996 Hospitant im Seoul Institute für Gesundheit und Umwelt  
Forschung, Fachbereich, Mikrobiologie, Seoul, Südkorea

10. 1997 Deutsche Sprachprüfung für den Hochschulzugang  
ausländischer Studienbewerber an der TU- Dresden

05. 1998 - 06. 2000 Hospitant im Bundesinstitute für gesundheitlichen  
Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV), Berlin

seit 04. 1999 Doktorandin im Institut für Lebensmittelbiotechnologie und  
Prozesstechnik an der TU-Berlin

07. 2000 - 09. 2002 Wissenschaftliche Angestellte im BgVV, Fachbereich 3,  
Hygiene der Lebensmittel und Bedarfgegenstände, Berlin

seit 10. 2002 Hospitant im Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR,  
ehemals BgVV), Berlin