

STEC Symposium – Shigatoxin-bildende *Escherichia coli* in Diagnostik und Forschung

Online-Veranstaltung, 24.–25. März 2022

Impressum

BfR Abstracts

STEC Symposium – Shigatoxin-bildende Escherichia coli in Diagnostik und Forschung

Für den Inhalt der Abstracts sind deren Autorinnen und Autoren verantwortlich.

Bundesinstitut für Risikobewertung
Max-Dohrn-Straße 8–10
10589 Berlin

Berlin 2022
36 Seiten

Inhalt

1	Programm	5	
2	Abstracts	8	
2.1	Genomic Surveillance of STEC		8
2.2	Quantifizierung und Charakterisierung von Shigatoxin-bildenden <i>E. coli</i> mittels digitaler PCR		10
2.3	Development of an innovative detection assay for STEC/EHEC based on the enzymatic activity of Shiga toxin		11
2.4	Shigatoxin-bildende <i>E. coli</i> in Teig		12
2.5	Distribution of virulence factors, antimicrobial resistance genes and phylogenetic relatedness among Shiga toxin-producing <i>Escherichia coli</i> serogroup O91 from human infections		14
2.6	Recent evolvement of a highly pathogenic EHEC O104:H4 masked as O181:H4		15
2.7	Molekulare Surveillance von Shigatoxinproduzierenden <i>Escherichia coli</i> (STEC/EHEC) in Deutschland		16
2.8	Rapid screening and identification method for STEC in meat samples		17
2.9	Metabolische Eigenschaften von STEC-Stämmen mit unterschiedlichem Kolonisationsverhalten im Gastrointestinaltrakt des Rindes		18
2.10	Besiedlung von Bockshornkleepflanzen durch enterohämorrhagische/ enteroaggregative <i>Escherichia coli</i> O104:H4		19
2.11	STEC-Nachweise in Getreidegräsern und Erzeugnissen aus Getreide entlang der Lebensmittelkette		20
2.12	Shigatoxin-bildende <i>E. coli</i> der Serogruppe O187: Zunehmende Isolierung und Charakterisierung		21
2.13	Shigatoxin-produzierende und enteropathogene <i>Escherichia coli</i> in getrockneten Kleinfischen von lokalen Märkten in Kenia		23
2.14	Aufklärung der epidemiologischen Bedeutung von Gennachweis-basierten EHEC-Labormeldungen nach § 7 IfSG in der Routinediagnostik		24
2.15	Shigatoxin-bildende <i>Escherichia coli</i> „vom Feld bis zum Teller“		26
2.16	Characterisation of the association of the STEC subtilase cytotoxin with OMVs and its cellular consequences		27
2.17	Kausale EHEC Therapien – <i>In vitro</i> Studien zu klassischen und neuartigen Behandlungsoptionen		28
2.18	Survival of enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i> O104:H4 strain C227/11Φcu in agricultural soils		29
2.19	Nachweis von Shigatoxin-bildenden <i>E. coli</i> in Getreide-Proben der Besonderen Ernte- und Qualitätsermittlung (BEE)		30
2.20	STEC bei Alpakas und Wildnagern in Mitteldeutschland		31
2.21	STEC im nationalen Zoonosen-Monitoring nach AVV Zoonosen Lebensmittelkette		32
2.22	High occurrence of Shiga toxin-producing <i>Escherichia coli</i> in raw meat-based diets for companion animals – a public health issue		34
3	Verzeichnis der Autorinnen und Autoren		35

Sehr geehrte Damen und Herren,
liebe Kolleginnen und Kollegen,

auch mehr als ein Jahrzehnt nach dem EHEC O104:H4 Ausbruch beschäftigen uns heute häufig dieselben Fragen wie damals. Fragen zu Nachweis und Isolierung von STEC aus verschiedenen Matrices, die Verteilung von STEC im Lebensmittel und über die Lebensmittelkette/Warenkette hinweg sowie die Risikobewertung von STEC/EHEC und möglichen Hybridstämmen.

Das BfR veranstaltet das STEC Symposium zusammen mit dem vom Bundesministerium für Gesundheit geförderten Projektverbund „Integrierte genomische Surveillance von Zoonoseerregern (IGS-Zoo)“. Es soll deutlich werden, wie wichtig der Austausch und die Zusammenarbeit der Humanmedizin, der Veterinärmedizin und der Lebensmittelsicherheit ist, um Übertragungswege und Infektketten aufzudecken und EHEC-Ausbrüche so früh wie möglich zu erkennen und zu verhindern.

Entscheidend hierfür ist eine integrierte genomische Surveillance in Echtzeit. Durch die Ganzgenomsequenzierung besteht erstmals die Gelegenheit, Licht in die Blackbox der Übertragungswege zwischen Tier, Lebensmittel und Mensch zu bringen, die Verwandtschaftsbeziehungen der STEC auszuleuchten und Antworten auf die Fragen nach der entscheidenden Virulenzgenausstattung für eine EHEC-Infektion zu finden.

Ein vielfältiges Programm mit wissenschaftlichen Beiträgen zu wesentlichen Fragen der STEC Diagnostik, der STEC Reservoirs, Ökologie und Epidemiologie, wichtige Forschungsergebnisse zu Virulenzfaktoren und Therapieoptionen sowie bekannte und mögliche Infektionsquellen soll über die Fachdisziplinen hinweg zu neuen Erkenntnissen führen.

Das STEC Symposium soll im Sinne des One-Health-Gedankens Wissen aus Diagnostik und Forschung der Bereiche Lebensmittelsicherheit, Veterinärmedizin und Humanmedizin zusammenbringen. Im Mittelpunkt der Veranstaltung stehen der interdisziplinäre Austausch zwischen den Fachrichtungen, die Förderung der Zusammenarbeit der verschiedenen Expertinnen und Experten sowie der Dialog zwischen öffentlichem Gesundheitsdienst und akademischer Forschung.

Ich wünsche Ihnen ein spannendes und anregendes STEC Symposium.

Professor Dr. Dr. Andreas Hensel
Präsident des Bundesinstituts für Risikobewertung

1 Programm

Donnerstag, 24. März 2022

10:00–10:15 Uhr

Begrüßung

Andreas Hensel, Präsident des Bundesinstituts für Risikobewertung (BfR), Berlin

10:15–10:30 Uhr

Organisatorisches

10:30–11:10 Uhr

Keynote: Genomic Surveillance of STEC

Stefano Morabito, European Union Reference Laboratory for *E. coli* including Verotoxigenic *E. coli*, Istituto Superiore di Sanità, Rom, Italien

Session I: Schwerpunkt Methodik – Nachweis und Isolierung

Vorsitz: Angelika Fruth, Robert Koch-Institut (RKI), Wernigerode

11:10–11:30 Uhr

Quantifizierung und Charakterisierung von Shigatoxin-bildenden *E. coli* mittels digitaler PCR

Martin Peier, Kantonales Labor Zürich, Zürich, Schweiz

11:30–11:50 Uhr

Development of an innovative detection assay for STEC/EHEC based on the enzymatic activity of Shiga toxin

Isabell Ramming, RKI, Wernigerode

11:50–12:10 Uhr

Shigatoxin-bildende *E. coli* in Teig

André Göhler, BfR, Berlin

12:10–13:00 Uhr Mittagspause

Session II: Schwerpunkt Genomics – Typisierung und Surveillance

Vorsitz: Alexander Mellmann, Universitätsklinikum Münster; Antje Flieger, RKI, Wernigerode

13:00–13:20 Uhr

Distribution of virulence factors, antimicrobial resistance genes and phylogenetic relatedness among Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serogroup O91 from human infections

Magdalena Nüesch-Inderbinen, Universität Zürich, Schweiz

13:20–13:40 Uhr

Recent evolution of a highly pathogenic EHEC O104:H4 masked as O181:H4

Christina Lang, RKI, Wernigerode

13:40–14:00 Uhr

Molekulare Surveillance von Shigatoxinproduzierenden *Escherichia coli* (STEC/EHEC) in Deutschland

Angelika Fruth, RKI, Wernigerode

14:00–14:20 Uhr Kaffeepause

Postersession

Vorsitz: Reinhard Würzner, Medizinische Universität Innsbruck, Österreich

14:20–14:25 Uhr

Rapid screening and identification method for STEC in meat samples

Ivo Meier-Wiedenbach, BIOTECON Diagnostics GmbH, Potsdam

14:25–14:30 Uhr

Metabolische Eigenschaften von STEC-Stämmen mit unterschiedlichem Kolonisationsverhalten im Gastrointestinaltrakt des Rindes

Stefanie Barth, Friedrich-Loeffler-Institut (FLI), Jena

14:30–14:35 Uhr

Besiedlung von Bockshornkleepflanzen durch enterohämorrhagische/ enteroaggregative *Escherichia coli* O104:H4

Ulrich Busch, Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Oberschleißheim

14:35–14:40 Uhr

STEC-Nachweise in Getreidegräsern und Erzeugnissen aus Getreide entlang der Lebensmittelkette

Ines Thiem, Niedersächsisches Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, Braunschweig

14:40–14:45 Uhr

Shigatoxin-bildende *E. coli* der Serogruppe O187: Zunehmende Isolierung und Charakterisierung

Michaela Projahn, BfR, Berlin

14:45–14:50 Uhr

Shigatoxin-produzierende und enteropathogene *Escherichia coli* in getrockneten Kleinfischen von lokalen Märkten in Kenia

Laura Wessels, BfR, Berlin

14:50–14:55 Uhr

Aufklärung der epidemiologischen Bedeutung von Gennachweis-basierten EHEC-Labormeldungen nach § 7 IfSG in der Routinediagnostik

Elena Demihovska, Landesamt für Gesundheit und Soziales Mecklenburg-Vorpommern, Rostock

von 15:15 bis 16:30 Uhr

Virtuelles Get-together

Freitag, 25. März 2022

09:30–10:10 Uhr

Keynote: Shigatoxin-bildende *Escherichia coli* „vom Feld bis zum Teller“

Sabine Schlager, Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH, Graz, Österreich

Session III: Schwerpunkt Toxine – Ursache und Wirkung

Vorsitz: Herbert Schmidt, Universität Hohenheim, Stuttgart

10:10–10:30 Uhr

Characterisation of the association of the STEC subtilase cytotoxin with OMVs and its cellular consequences

Alexander Kehl, Universität Münster

10:30–10:50 Uhr

Kausale EHEC Therapien –**In vitro Studien zu klassischen und neuartigen Behandlungsoptionen**

Michael Berger, Universität Münster

10:50–11:10 Uhr Kaffeepause

Session IV: Schwerpunkt Tier und Umwelt

Vorsitz: Christian Menge, FLI, Jena

11:10–11:30 Uhr

Survival of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O104:H4 strain C227/11Φcu in agricultural soils

Katharina Detert, Universität Hohenheim, Stuttgart

11:30–11:50 Uhr

Nachweis von Shigatoxin-bildenden *E. coli* in Getreide-Proben der Besonderen Ernte und Qualitätsermittlung (BEE)

Jan Kabisch, Max Rubner-Institut, Kiel

11:50–12:10 Uhr

STEC bei Alpakas und Wildnagern in Mitteldeutschland

Christian Berens, FLI, Jena

Session V: Schwerpunkt One Health – Lebensmittelsicherheit und Infektionsschutz

Vorsitz: Ulrich Busch, Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Oberschleißheim

12:10–12:30 Uhr

STEC im nationalen Zoonosen-Monitoring nach AVV Zoonosen Lebensmittelkette

Carolina Plaza Rodríguez, BfR, Berlin

12:30–12:50 Uhr

High occurrence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in raw meat-based diets for companion animals – a public health issue

Andrea Treier, Universität Zürich, Schweiz

12:50–13:00 Uhr

Abschluss

2 Abstracts

2.1 Genomic Surveillance of STEC

Stefano Morabito

European Union Reference Laboratory for *E. coli* including Verotoxigenic *E. coli*, Istituto Superiore di Sanità, Rom, Italien

The advent of the genomic era, with the rapid diffusion of the next generation sequencing (NGS) techniques, caused the surveillance of infectious disease to improve by adding more opportunities to characterise the pathogenic microorganisms.

This is particularly true for pathogenic *E. coli*. As a matter of fact, this bacterial species accommodates a growing number of different pathogenic types, which often exchange virulence features resulting into hybrid or cross-pathotype populations.

Shiga toxin producing *E. coli* are of the most pathogenic *E. coli* group and its large variability accounts for the need to revolve around typing methodologies way more elaborated than the identification of the species, as with other bacterial pathogens, or the determination of the serotype to come to a strain mark, and the strain typing strategies involve at least the definition of the virulence genes asset.

Whole genome sequencing (WGS) serves the need for a deep strain typing and represents the means to come to very specific strain signatures based on the identification of the SNPs scattered all along the whole genome or the different allelic forms of all the genes composing the bacterial genome or of those composing the core genome of the bacterial species.

The STEC characterisation based on WGS supports the surveillance of the infections in many ways. It provides a platform to assess the traits associated with the pathogenicity of the different isolates, supports the identification of clusters of cases and provides a means to refine the sources attribution.

The establishment of the capacity towards the use of NGS has set the conditions to develop an EU framework for the use of genomics for the surveillance of STEC infections. As a matter of fact, STEC are one of the priority pathogens to be monitored in the vehicles of infections according to the zoonoses directive and is on the top five foodborne pathogens causing infections in the EU as reported in the One health zoonosis report published jointly by EFSA and ECDC.

Already in 2013, the European Commission had issued a white paper on the need for the molecular characterisation of foodborne pathogens, including STEC, to aid the surveillance of the diseases and the monitoring of the pathogen in the vehicles of infections. The document revolved around typing technologies such as the PFGE or the MLVA that have been now outdated by the NGS and nowadays the plans are to establish EU joint databases of WGS-based molecular typing data of foodborne pathogens, that will initially regard STEC, *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* isolates. The joint database is expected to be released in 2022 and the typing data will be collected based on WGS, with the parallel collection of MLVA data for *Salmonella* spp.

The digital nature of the typing data of food-borne pathogens based on WGS allows these data to be displayed to the relevant communities in real time. This includes the prompt sharing across sectors in the one health perspective, as well as the possibility to set up dashboards to display the dynamics of the pathogens' circulation in the human population and in the vehicles of infections in the public domain. Examples are represented by the atlas

of infectious diseases published online by the ECDC and the dashboards published by EFSA on the foodborne outbreaks. The development of these tools represents a step towards a concept of data democratisation, serving the communities and depicting the situation of foodborne diseases almost in real time, which is the base for building awareness and cross sectoral communication, the foundation of the one health.

2.2 Quantifizierung und Charakterisierung von Shigatoxin-bildenden *E. coli* mittels digitaler PCR

René Köppel, Martin Peier

Kantonales Labor Zürich, Zürich, Schweiz

Die abschließende Beurteilung des Gefahrenpotentials von STEC ist nur beim Vorliegen des Isolates möglich. Der alleinige Nachweis von genetischen Markern mittels PCR reicht in der Regel nicht aus für die Anordnung vollzugstechnischer Massnahmen [1]. Gemäss ISO/TS 13136:2012 sollen bei positiven PCR-Signalen bis 50 Kolonien bestätigt werden [2]. Ob dies im Einzelfall ausreicht, lässt sich erst im Nachhinein sagen. Insbesondere wenn gleichzeitig *stx* und *eae* Signale vorliegen, kann es sich um einen potenziell sehr gefährlichen STEC handeln [3] und es ist schade, wenn dieser nicht isoliert werden kann. Mit Hilfe der Droplet-basierten digitalen PCR kann der Anteil an STEC in einer *E. coli* Gesamtpopulation abgeschätzt werden. Dies hilft bei der Abschätzung, wie viele Kolonien nach einem Ausstrich einer PCR-positiven Anreicherung gepickt werden müssen, damit neben den „normalen“ *E. coli* auch STEC Kolonien erwischt werden. Im Weiteren kann mit digitaler PCR bereits ab Anreicherung eine bessere Risikoeinschätzung vorgenommen werden, ob unterschiedliche PCR-Signale (z. B. *stx2* und *eae*) allenfalls vom gleichen Klon stammen. Die vorläufigen Resultate zeigen, dass Bakterien direkt in die Droplets der digitalen PCR verpackt werden können. Damit ist gewährleistet, dass die Integrität der Zelle bis zur PCR-Reaktion erhalten bleibt und doppelt positive (z. B. *stx2* und *eae*) Droplets auch tatsächlich doppelt positiven und damit potenziell gefährlichen STEC entsprechen. Folglich kann der Aufwand für die Isolation potenziell gefährlicher STEC gezielt erhöht und damit die Ressourcen optimal eingesetzt werden.

- [1] Bundesamt für Lebensmittelsicherheit und Veterinärwesen (BLV) (2019): Mikrobiologische Risikoevaluation Shigatoxin produzierender *E. coli* (STEC) in Lebensmitteln – Grundlagen für einen Entscheidungsleitfaden zur Beurteilung von STEC-Befunden in Lebensmitteln. <https://www.blv.admin.ch/dam/blv/de/dokumente/lebensmittel-und-ernaehrung/lebensmittelsicherheit/krankheitserreger-und-hygiene/risikoevaluation-stec.pdf>
- [2] ISO/TS 13136:2012: Microbiology of food and animal feed – Real-time polymerase chain reaction (PCR)-based method for the detection of food-borne pathogens – Horizontal method for the detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and the determination of O157, O111, O26, O103 and O145 serogroups
- [3] JEMRA (2018): Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and food: attribution, characterization, and monitoring. <http://www.fao.org/3/ca0032en/CA0032EN.pdf>

2.3 Development of an innovative detection assay for STEC/EHEC based on the enzymatic activity of Shiga toxin

Isabell Ramming¹, Christina Lang¹, Samuel Hauf¹, Carsten Peukert², Angelika Fruth¹, Brigitte G. Dorner³, Mark Brönstrup², Antje Flieger¹

¹ Robert Koch Institute, Department for Infectious Diseases, Division of Enteropathogenic Bacteria and Legionella (FG11), Wernigerode

² Helmholtz Centre for Infection Research, Division of Chemical Biology (CBIO), Braunschweig

³ Robert Koch Institute, Centre for Biological Threats and Special Pathogens, Biological Toxins (ZBS3), Berlin

Introduction:

Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC), a virulent form of Shigatoxigenic *E. coli* (STEC), are important pathogens causing disease in humans ranging from diarrhea to severe hemolytic uremic syndrome (HUS). STEC/EHEC are found in animals and food and may produce large outbreaks in humans associated by high economic costs. Timely and qualified detection of STEC/EHEC, including isolate recovery in patients, animals and food, remains of high importance but still challenging and work-intensive. Isolate recovery is essential for risk profiling, infection cluster, and infection chain elucidation. Thus, the availability of a reliable rapid test for the identification of STEC/EHEC would be a tremendous advance. STEC/EHEC are a diverse group with high variation in marker genes but the Shiga toxin is found in all STEC/EHEC. Therefore, we designed and evaluated a detection method based on the catalytic activity of Shiga toxin (Stx).

Methods:

Different clinical EHEC strains were selected for analysis. Several fluorescently-labeled Stx oligonucleotide substrates were designed, reaction conditions optimised, and specificity validated.

Results:

Distinct fluorescent dye-labeled oligonucleotide enzyme substrates were analysed, yielding robust and specific Stx detection within 30 to 60 minutes depending on Stx quantity.

Conclusion:

We established a rapid detection assay for EHEC based on the enzymatic activity of the Stx as the major virulence factor.

2.4 Shigatoxin-bildende *E. coli* in Teig

André Göhler¹, Carolin Hobe¹, Laura Knüppel¹, Marla Senkter¹, Michaela Projahn¹, Sabine Schlager², Felix Reich³, Elisabeth Schuh¹

¹ Bundesinstitut für Risikobewertung, Abteilung Biologische Sicherheit, Fachgruppe Lebensmittelmikrobiologie, Wirt-Erreger-Interaktion, Nationales Referenzlabor für *Escherichia coli* einschließlich verotoxinbildende *E. coli* (NRL-*E. coli*), Berlin

² Nationale Referenzzentrale für *Escherichia coli* einschließlich Verotoxin-bildender *E. coli*, Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit, Graz, Österreich

³ Bundesinstitut für Risikobewertung, Abteilung Biologische Sicherheit, Fachgruppe Lebensmittelhygiene und -technologie, Warenketten, Produktschutz, Berlin

In jüngster Zeit wurden mehrere Krankheitsausbrüche in Nordamerika auf Mehl- und Teigprodukte zurückgeführt, die mit Shigatoxin-bildenden *E. coli* (STEC) kontaminiert waren. Zumeist waren rohe bzw. nicht ausreichend gebackene Teige involviert. In Deutschland wurden noch keine solche Ausbrüche erfasst, obgleich die kommerzielle Verfügbarkeit von „backfertigen“ bzw. „verzehrfertigen“ rohen Teigen in den letzten Jahren immer mehr zunahm und auch hier in Fertigbackteigen bereits STEC nachgewiesen wurden. Allerdings sind Daten zum Auftreten von STEC in kommerziell verfügbaren Teigen wie auch dem Verhalten beim Backen nicht verfügbar.

Das Ziel dieser Studie war es, erste Einblicke in die Verbreitung von STEC in Fertigteigen zu gewinnen. Weiterhin sollte die Inaktivierung von STEC durch verschiedene Backprozesse beschrieben werden. Es wurden „backfertige“ kommerzielle rohe Teige (10 Packungen) sowie eine Charge (21 Probenpackungen) von STEC-kontaminiertem und zurückgerufenen Fertigteig mikrobiologisch untersucht. Die kommerziellen Fertigteige wurden vergleichend nach DIN/ISO13136:2012 und §64 LFGB L 25.00-6 (25 g je Probe) untersucht. Die Proben der Fertigteigcharge wurden zusätzlich mittels einer Most probable number (MPN)-Methode (333 g pro Probe) analysiert. Weiterhin wurden Backversuche mit Keksen und Pancakes durchgeführt, deren Teig im Labor hergestellt und mit unterschiedlichen Mengen von STEC kontaminiert worden war. Diese artifiziell kontaminierten Kekse wurden für neun Minuten bei 180 °C gebacken bzw. der kommerziell verfügbare und kontaminierte Pancake-Mix in einer Pfanne bei ca. 200 °C für vier Minuten (inkl. wenden) gebraten. Anschließend wurde die Kultivierbarkeit der STEC direkt bzw. nach Anreicherung bestimmt.

Aus keinem der kommerziellen Fertigteige (N=10) konnten STEC mittels Standardmethoden detektiert bzw. isoliert werden. Dagegen wurden aus drei Proben (14 %) der kontaminierten Fertigteigcharge zwei unterschiedliche STEC-Stämme isoliert. Diese Stämme wurden den Serotypen O36:H14 mit *stx2g* sowie O154:H31 mit *stx1d* zugeordnet. Weiterhin konnten aus 14 Proben (67 %) der Fertigteigcharge enteropathogene *E. coli* (EPEC) isoliert werden. Diese Fertigteigcharge enthielt nach MPN-Verfahren einen STEC bzw. EPEC – Gehalt von 0 bis 0,36 MPN / 100 g bzw. 0 bis 0,92 MPN / 100 g. STEC wie auch EPEC wiesen in der Charge eine heterogene Verteilung auf. Nachfolgend wurde das Verhalten verschiedener STEC-Stämme aus Mehl und Teig beim Backen von Keksen und Pancakes analysiert. Das initiale Inokulum von ca. 10⁵ KbE pro 10 g Kekse wurde während des Backens bis unter das Quantifizierungslimit (10²⁻³ KbE/Keks) reduziert. Bei der Zubereitung von Pancakes sank das initiale Inokulum von ca. 10⁷ KbE pro ml Pancaketeig innerhalb von zwei Minuten unter das Quantifizierungslimit (10^{0,24} KbE/ml Pancaketeig). Sporadisch konnten STEC allerdings nach dem Backen bzw. Braten aus der Anreicherung isoliert werden.

Die Backversuche zeigten, dass hohe Keimlasten (> 10⁵ KbE/g Teig) durch Backen wie auch durch Braten nicht vollständig reduziert werden. Es kommt allerdings innerhalb der ersten zwei Minuten zu einer Keimreduktion um mehr als drei Zehnerpotenzen. Die Ergebnisse zeigten, dass STEC in der Matrix Fertigteig durchaus vorhanden sein kann. Die in der

kontaminierten Teigcharge gefundene niedrige Keimzahl wie auch die negativen Ergebnisse der kommerziell verfügbaren Fertigteige deuten u. a. auf Probleme der aktuellen Nachweismethoden hin. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass mehrere STEC eine einzelne Probe kontaminieren können. Die Untersuchung von Teigen auf pathogene *E. coli* (STEC/EPEC) wie auch die Charakterisierung der gewonnenen Isolate sollte weitergehend erfolgen um Eintrags- und Übertragungswege aufzudecken.

2.5 Distribution of virulence factors, antimicrobial resistance genes and phylogenetic relatedness among Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serogroup O91 from human infections

Magdalena Nüesch-Inderbilen^{1,2} Marc J.A. Stevens¹, Nicole Cernela¹, Andrea Müller^{1,2}, Michael Biggel¹, Roger Stephan¹

¹ Institute for Food Safety and Hygiene, Vetsuisse Faculty, University of Zurich, Switzerland

² Swiss National Center for Enteropathogenic Bacteria and Listeria (NENT), University of Zurich, Switzerland

Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) belonging to the serogroup O91 are among the most common non-O157 serogroups associated with human illness in Europe.

This study aimed to analyse the virulence factors, antimicrobial resistance genes and phylogenetic relatedness among 48 clinical STEC O91 isolates collected during 2003–2019 in Switzerland. The isolates were analysed using short-read whole genome sequencing methodologies. They belonged to O91:H10 (n=6), O91:H14 (n=40), and O91:H21 (n=2). Multilocus sequence typing assigned the O91:H10 isolates to sequence type (ST)641, while the O91:H14 isolates belonged to ST33, ST9700, or were non-typeable. STEC O91:H21 isolates belonged to ST442. Shiga toxin gene *stx1a* was the most common Shiga toxin gene subtype, followed by *stx2b*, *stx2d* and *stx2a*. All isolates were LEE-negative and carried one or two copies of the IrgA adhesin gene *iha*. In a subset of long-read sequenced isolates, modules of the Locus of Adhesion and Autoaggregation pathogenicity island (LAA-PAI) carrying *iha* and other genes such as *hes*, *lesP* or *agn43* were identified. A large proportion of O91:H14 carried the subtilase cytotoxin gene *subA*, colicin genes (*cba*, *cea*, *cib* and *cma*) or microcin genes (*mcmA*, *mchB*, *mchC* and *mchF*). O91:H14 were further distinguished from O91:H10/21 by one or more virulence factors found in extraintestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC), including *hlyF*, *iucC/iutA*, *kpsE* and *traT*. The *hlyF* gene was identified on a novel mosaic plasmid that was unrelated to *hlyF*+ plasmids described previously in STEC.

Core genome phylogenetic analysis revealed that O91:H10 and O91:H21 were conserved, whereas O91:H14 were clonally diverse.

Among three O91:H14 isolates, several resistance genes were identified, including genes that mediate resistance to aminoglycosides (*aadA*, *aadA2*, *aadA9*, *aadA23*, *aph(3'')-Ib* and *aph(6)-Id*), chloramphenicol (*cmlA*), sulfonamides (*sul2* and *sul3*), and trimethoprim (*drfA12*). Our data contribute to understanding the genetic diversity and differing levels of virulence potential within the STEC O91 serogroup.

2.6 Recent evolution of a highly pathogenic EHEC O104:H4 masked as O181:H4

Christina Lang, Angelika Fruth, Antje Flieger

Division of Enteropathogenic Bacteria and Legionella, National Reference Centre for Salmonella and other Enteric Bacterial Pathogens, Robert Koch-Institut, Wernigerode

Introduction:

Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) cause the severe clinical manifestation hemolytic uremic syndrome (HUS). Worldwide serovar O157:H7/H- is of highest relevance, but the large HUS outbreak in 2011 was caused by an EHEC strain of the rare serovar O104:H4.

Methods:

During molecular surveillance, we identified and further characterised a highly virulent EHEC strain by whole genome sequencing. Further, virulence features, phylogenetic context, and a hypothesis concerning strain emergence were investigated.

Results:

We describe a novel hybrid EHEC strain of the rare serovar O181:H4 associated with HUS. The strain interestingly shares MLST ST678 and virulence markers except the O antigen (OAG) with the O104:H4 outbreak strain. Both strains exhibited comparable cytotoxicity, adhesion pattern, and a very close phylogenetic relationship. Only a few differences were found in their chromosomes and a partially distinct plasmid repertoire. Close relatedness of the strains suggested that O104 to O181 OAG conversion might have occurred recently. We identified further scenarios of possible recent serovar conversion among MLST ST300, ST101, and ST301 *E. coli* strains.

Discussion:

Closely related HUS-associated EHEC strains can possess distinct OAG gene clusters likely acquired by horizontal gene transfer. Strains similar to the O104:H4 outbreak strain are still around causing severe infections and may be masked by low risk serovars.

2.7 Molekulare Surveillance von Shigatoxinproduzierenden *Escherichia coli* (STEC/EHEC) in Deutschland

Angelika Fruth, Christina Lang, Antje Flieger

Nationales Referenzzentrum (NRZ) für Salmonellen und andere bakterielle Enteritiserreger, Robert Koch-Institut, Bereich Wernigerode

Zur Erfassung und Überwachung der Shigatoxin produzierenden *E. coli* (EHEC/STEC) wurde ab 2015 am Nationalen Referenzzentrum (NRZ) für Salmonellen und andere bakterielle Enteritiserreger die integrierte molekulare Surveillance (IMS) des Erregers ausgebaut. Durch Etablierung eines Netzwerks mit Laboren aus Einrichtungen des öffentlichen Gesundheitsdiensts und privat niedergelassenen Laboren der Primärversorgung konnte bis 2021 die Erfassung und weiterführende Analyse der Isolate von ca. 85 % der gemäß §7 des IfSG gemeldeten Erkrankungen realisiert werden. Das dafür genutzte Methodenprofil wurde um die Ganzgenomsequenzierung (NGS) erweitert, mit Fokus auf Isolate der mit dem hämolytisch-urämisches Syndrom (HUS) assoziierten Serovare O157:H7, O26:H11, O103:H2, O111:H8 und O145:H28 und solche mit Hinweis auf schwerwiegende Symptomatik (blutige Diarrhoe, atypisches oder partielles HUS) bzw. mit Verdacht auf ein Ausbruchsgeschehen. Ab 2021 wurde das Spektrum auf alle *stx*-Gen positiven *E. coli* Isolate am NRZ vervollständigt. Sie wurden analysiert und in einer internen Datenbank gespeichert, und stehen auf miGenomeSurv (<https://www.medizin.uni-muenster.de/migenomesurv/home.html>) den Netzwerkpartnern zur Verfügung. Neben der bioinformatischen Auswertung nach cgMLST (Enterobase v1-Schema mit 2513 Genomloci) erfolgte zusätzlich ein SNP-basiertes Mapping an Referenzgenomen und ein Mapping an Referenzsequenzen für die Analyse der Virulenzfaktoren und der O- und H-Antigencluster (Lang *et al.*, *J Clin Microbiol* 2019).

Von 2019–2021 wurden insgesamt 1.252 Isolate auf Basis von Sequenzdaten typisiert. Anhand dieser Daten konnten Trends zu den dominierenden EHEC/STEC-Typen erfasst, sowie neue oder erstmalig in Deutschland detektierte Serovare und *stx*-Gen-Subtypen beschrieben werden. Es wurden Häufungen aufgefunden bzw. Ausbruchsgeschehen bestätigt, z. B.: STEC O153(OgN3):H25 (*stx2a* positiv; 9 Isolate am NRZ) in Nordwestdeutschland im Frühjahr 2020, EHEC O26:H11 (*stx2a* positiv; 19 Isolate am NRZ) bei Ausbruch mit Gastroenteritis im November 2020 in mehrere Kindereinrichtungen in Nordwestmecklenburg). Dagegen konnte bei einer im Spätsommer 2020 (Ende Juli bis Anfang Oktober) registrierten Häufung von insgesamt 50 HUS-Fällen vor allem in Süddeutschland (Bayern, Baden-Württemberg) in enger Kooperation mit dem Konsiliarlabor (KL) HUS der Universität Münster ein Ausbruch ausgeschlossen werden. Es fanden sich unter den Isolaten von 22 Patienten 12 verschiedene Serovare, wobei nur die Serovare O157:H7, O26:H11 und O145:H28 mehrfach nachweisbar waren, ohne eine cgMLST-Überstimmung aufzuweisen.

Für 15,2 % aller Isolate am NRZ fanden sich von 2019–2021 in der cgMLST-Auswertung kleinere Cluster (2–5 Isolate), wobei es sich in der Regel um familiäre Erkrankungsgeschehen handelte. Einzelne Clustertypen konnten über 2–3 Jahre detektiert werden. Zu den untersuchten Häufungen gab es bisher keine Hinweise auf bestimmte Lebensmittel als Infektionsquelle. Für die Ermittlung solcher Quellen erfolgt ein aktiver Austausch von Referenz-Sequenzdaten mit dem Nationalen Referenzlabor (NRL) *E. coli* am Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR).

2.8 Rapid screening and identification method for STEC in meat samples

Stefanie Wendrich, Hanna Hartenstein, Ivo Meier-Wiedenbach, Astrid Gröneward, Cordt Gröneward, Kornelia Berghof-Jäger

BIOTECON Diagnostics GmbH, Potsdam

Introduction:

The **foodproof**® STEC real-time PCR method enables a rapid and specific detection and identification of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* (STEC) in food with only two PCR reactions. Following DNA extraction with the **foodproof**® StarPrep Three Kit, the **foodproof**® STEC Screening LyoKit detects *stx1*, *stx2*, and *eae* in three separate channels and the **foodproof**® STEC Identification LyoKit identifies eight major STEC serogroups in one single test using melting curve analysis. The assays are in accordance with ISO/TS 13136. The rapid 8-hour enrichment protocol for fresh raw beef samples has received AOAC-RI Performance Tested MethodsSM (PTM) Certification (No. 102004).

Purpose:

STEC, e.g. *E. coli* O157, *E. coli* O145 or *E. coli* O104, are known to cause diarrhea, hemorrhagic colitis (HC), and the potentially fatal hemolytic uremic syndrome (HUS). STEC are most commonly transmitted through raw ground beef, raw or inadequately pasteurised milk, sprouts, and vegetables. To ensure a long shelf life, the analysis should be as fast as possible, but without compromising consumer safety.

BIOTECON Diagnostics has developed a rapid 8-hour enrichment protocol for fresh raw beef and had it compared against the USDA reference method.

Methods:

Our STEC method was compared to the reference method “U.S. Department of Agriculture-Food Safety and Inspection Service MLG 5C.00”. 375 g samples were analysed after 12 h and 20 to 24 h enrichment time and 25 g samples after 8 h and 20 to 24 h enrichment time. For inclusivity, a total of 446 strains were analysed. For exclusivity, 184 strains of closely related bacteria, non-STEC organisms and STEC strains of known serogroups other than the eight major STEC O groups were tested. Within the robustness study variations in method parameters, e.g. sample volume for PCR or incubation time during extraction, were evaluated.

Results:

Within the method comparison study the **foodproof**® STEC method demonstrated no significant differences between presumptive and confirmed results or between candidate and reference method results for 375 g test portions after 12 h and 20–24 h enrichment time and for 25 g test portions after 8 h and 20 to 24 h enrichment time. Inclusivity strains were correctly included, while exclusivity strains were excluded. Our STEC method is robust against small variations in method parameters.

Significance:

Compared to the USDA reference method, the **foodproof**® STEC method was shown to be an effective alternative method for detection and confirmation of STEC in raw ground beef and raw beef trim. An advantage are the rapid enrichment protocols (8–20 h and 12–20 h), which has been validated for 25 g test portions and 375 g test portions, respectively. Furthermore, using the enrichment medium mTSB without the addition of any antibiotics saves costs. The alternative confirmation procedure provides increased sensitivity and improved specificity as well as a reduction in time to result and in material costs. Finally, the STEC screening and identification method with its open platform is successfully tested on several cyclers (LightCycler® 480, LightCycler® 96, AriaMx, CFX96, ABI 7500 fast). For best convenience, safety and sensitivity, the PCR reagents are lyophilised.

2.9 Metabolische Eigenschaften von STEC-Stämmen mit unterschiedlichem Kolonisationsverhalten im Gastrointestinaltrakt des Rindes

Stefanie A. Barth¹, Michael Weber¹, Katharina Schaufler^{2,3}, Christian Berens¹, Lutz Geue^{1,†}, Christian Menge¹

¹ Friedrich-Loeffler-Institut/Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Institut für molekulare Pathogenese, Jena

² Freie Universität Berlin, Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen, Berlin

³ Universität Greifswald, Institut für Pharmazie, Greifswald

† in memoriam

Rinder können Shigatoxin-produzierende *Escherichia coli* (STEC) in ihrem Darm beherbergen, ohne klinisch zu erkranken. Molekulargenetische Studien an STEC, die aus Rindern gewonnen wurden, zeigten, dass die Fähigkeit der Stämme den Rinderdarm persistent (STEC^{per}) oder sporadisch (STEC^{spo}) zu kolonisieren an Faktoren gekoppelt ist, die im akzessorischen und nicht im core-Genom kodiert werden (Barth *et al.*, AEM, 2016, 82:5455). Daneben können aber auch Merkmale, die nicht zu den klassischen Virulenzfaktoren gerechnet werden, für das spezifische Kolonisationsverhalten entscheidend sein. Um dies zu klären, haben wir Phänotypen von 28 STEC-Stämmen bestimmt (11 STEC^{per}, 14 STEC^{spo} und 3 STEC mit unbekanntem Kolonisationstyp) und die Ergebnisse in Bezug zum Kolonisationsverhalten gesetzt. Quantitativ erfasst wurden dabei metabolische Eigenschaften, wie die Nutzung verschiedener Kohlenstoff-, Stickstoff-, Phosphor- und Schwefelquellen mit Hilfe eines Phänotyp-Mikroarrays (Biolog®), sowie die Biofilmproduktion (Kristallviolettassay).

STEC^{spo}-Stämme produzierten signifikant mehr Biofilm als STEC^{per}-Stämme, wenn sie bei niedrigeren Temperaturen bebrütet wurden. Von den getesteten Substraten wiesen die Verwertung von Glyoxylsäure und L-Rhamnose die stärkste Assoziation zum Kolonisationsverhalten auf. Beide Substrate wurden von allen STEC^{spo}-Stämmen, aber keinem bzw. nur sehr wenigen STEC^{per}-Stämmen verstoffwechselt. Genomanalysen untermauerten diese Beobachtung, da Einzelbasenpolymorphismen und frameshifts in den zuständigen *glc*- und *rha*-Operons, insbesondere in STEC^{per}-Stämmen, identifiziert werden konnten.

Unsere Daten lassen den Schluss zu, dass STEC^{per}-Stämme im Laufe der Anpassung an den Intestinaltrakt der Rinder bestimmte metabolische Eigenschaften aufgegeben haben, während STEC^{spo}-Stämme diese Eigenschaften bewahrt haben, möglicherweise um das Überleben in der Umwelt zu sichern. Diese Ergebnisse bringen zum ersten Mal die persistente Kolonisation von STEC^{per}-Stämmen im Reservoirwirt „Rind“ mit dem Verlust von Stoffwechseleigenschaften und Mutationen in den zugrundeliegenden genetischen Grundlagen in Verbindung. Die metabolische und genetische Unterscheidung zwischen STEC^{per} und STEC^{spo} hilft uns, die Wirts- und Nischenanpassung von *E. coli*-Stämmen besser zu verstehen. Sollte sich die Zuordnung der Eigenschaft bei Untersuchung größerer Stammkollektionen erhärten, könnte die Klassifizierung humaner Isolate als „bovin-persistenter“ STEC auf Lebensmittel vom Rind als Infektionsquelle hindeuten, während bei „sporadischen“ STEC der Ursprung eher auf einer Mensch-Mensch-Übertragung beruhen oder eine Quelle in der Umwelt hindeuten könnte.

2.10 Besiedlung von Bockshornkleepflanzen durch enterohämorrhagische/enteroaggregative *Escherichia coli* O104:H4

Melanie Pavlovic¹, Michael Rothballer², Ulrich Busch¹, Ingrid Huber¹

¹ Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Oberschleißheim

² Helmholtz Zentrum München, Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt (GmbH), Department für Umweltwissenschaften, Abteilung Mikrogen-Pflanzen Interaktionen, Neuherberg

Neben Lebensmitteln tierischen Ursprungs gewinnen kontaminierte frische pflanzliche Nahrungsmittel als wichtige Infektionsquelle für den Menschen zunehmend an Bedeutung. Die Aufklärung der Fragen, wie Human-pathogene Bakterien Kulturpflanzen besiedeln und wie sie mit der Pflanze interagieren, sind Voraussetzung für einen Schutz des Verbrauchers bei der Versorgung mit frischen pflanzlichen Lebensmitteln. Bei einer endophytischen Besiedlung sind andere vorbeugende Maßnahmen notwendig, als bei einer rein externen Kontamination. Diese Interaktionen sind derzeit nur wenig untersucht.

Im Jahr 2011 verursachte EHEC O104:H4 einen europaweiten Ausbruch, als dessen Ursache eine kontaminierte Charge von Bockshornkleesamen (*Trigonella foenum-graecum*) gilt. Ein in Zusammenhang mit diesem Ausbruch isoliertes humanes Isolat wurde im Rahmen dieser Arbeit mit GFP markiert und zunächst verschiedene Faktoren zur Anzucht und Inokulation der Sprossen wie das Medium zur Sprossung, die Zelldichte der Inokulationskultur, Wachstumsmedium und -bedingungen der Sprossen, sowie die Wahl der GFP-Markierung optimiert.

Mittels Konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) konnte gezeigt werden, dass das rekombinante Humanisolat EHEC O104:H4 in der Lage ist Bockshornklee endophytisch zu kolonisieren. Vor allem in den Wurzeln des Bockshornklees konnten massive endophytische Besiedlungen nachgewiesen werden. Auch im Sprossgewebe waren EHEC O104:H4 Kolonien detektierbar.

Zudem war ein deutlicher Einfluss von EHEC O104:H4 auf Pflanzenwachstum und Gesundheit zu erkennen. Während Pflanzen, die mit Kontrollstämmen beimpft wurden, sich ähnlich gut entwickelten wie Pflanzen, die unter sterilen Bedingungen gezüchtet wurden, wiesen Pflanzen, die mit EHEC O104:H4 inokuliert wurden, weniger stark verzweigte Pflanzenwurzeln und Sprossgewebe, dünnere Stängel sowie Chlorophyll-Ausbleichungen auf.

2.11 STEC-Nachweise in Getreidegräsern und Erzeugnissen aus Getreide entlang der Lebensmittelkette

Ines Thiem, Heike Viedt, Henriette Adam, Kerstin Seide, Anne Wöhlke, Gabriele Guder

Niedersächsisches Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, Lebensmittel- und Veterinärinstitut Braunschweig/Hannover, Standort Braunschweig

Seit einigen Jahren ist bekannt, dass STEC in Nahrungsergänzungsmitteln auf der Basis von Getreidegräsern, z. B. Gerstengraspulver, sowie in Getreidemehlen und daraus hergestellten Erzeugnissen wie Backmischungen oder Teigen vorhanden sein können. Aus der breiten Palette an Erzeugnissen aus Getreidegräsern bzw. Mehlen wurden in Niedersachsen über 160 Proben verschiedener Prozess- und Veredelungsstufen auf das Vorhandensein von STEC untersucht.

Die Proben wurden gemäß DIN CEN ISO/TS 13136 untersucht. Die Anreicherung erfolgte grundsätzlich in gepuffertem Peptonwasser. Im Fall von *stx1*- oder *stx2*-positiven PCR-Ergebnissen aus der Anreicherung wurden die Proben parallel auf TBX-Agar (Oxoid) und CHROMagar STEC (Mast Group) ausplattiert. Für einen besseren Isolierungserfolg wurde immer ein Teil der Probe einer 30-minütigen Behandlung in Trypton Soja Bouillon mit pH 2 gemäß Anleitung des NRL *E. coli* zur LVU „STEC in Sprossen“ im Jahr 2016 unterzogen.

In den Proben konnten häufig für STEC typische Gensequenzen nachgewiesen werden. In 22 Fällen gelang die Isolierung lebensfähiger STEC aus Getreidegräsern, Mehlen, Backmischungen und Fertigteigen. Je nach Verarbeitungsstufe des Lebensmittels veränderte sich die Nachweishäufigkeit an STEC. Beispielsweise konnten aus 30 % der Mehle und 28,6 % der getrockneten Getreidegräser STEC-Isolate gewonnen werden. Bei Teigen zum Rohverzehr und Nahrungsergänzungsmitteln mit mehreren Zutaten war die Isolierung von STEC nicht erfolgreich.

Zur weiteren Ursachenforschung wurden Proben aus Stufenkontrollen in einem Mühlenbetrieb sowie bei einem Hersteller von Nahrungsergänzungsmitteln analysiert. Die interessantesten Funde waren ein Isolat aus dem Staub eines Auffangsacks, der unter dem Staubabscheider (Zyklon) des Getreide-Vorreinigers angebracht war, sowie STEC-Isolate aus „schonend getrocknetem“ Weizen- bzw. Gerstengras, die als Verfolgsproben zu einem STEC-Isolat aus zu Tabletten gepresstem Weizengras analysiert wurden.

Die Ergebnisse der Proben aus Herstellerbetrieben, Mühlen und dem Einzelhandel sowie NGS-Daten zu den Isolaten werden präsentiert und diskutiert.

2.12 Shigatoxin-bildende *E. coli* der Serogruppe O187: Zunehmende Isolierung und Charakterisierung

Michaela Projahn, Carolin Hobe, Karin Pries, Sebastian Steffan, Carina Salzinger, Katja Drache, Dana Schmidt, Sabine Haby, Petra Ganas, André Göhler, Elisabeth Schuh

Bundesinstitut für Risikobewertung, Nationales Referenzlabor für *Escherichia coli* einschließlich verotoxinbildende *E. coli* (NRL-*E. coli*), Berlin

Hintergrund:

Zwischen 2015 und 2021 wurden dem NRL-*E. coli* 75 Shigatoxin-bildende *E. coli* (STEC) Isolate eingesandt, die mittels klassischer Serotypisierung der Serogruppe O187 zugeordnet werden konnten. Damit zählt diese Serogruppe, neben O146, O113, O21 und O8, zu den in Deutschland in STEC von Tier und Lebensmittel in diesem Zeitraum am häufigsten nachgewiesenen O-Typen. Aus diesem Grund soll hier ein Überblick zu Herkunft und genetischer Ausstattung dieser Isolate gegeben werden.

Methoden:

Die Isolate wurden im Rahmen von diagnostischen Untersuchungen oder dem Zoonose-Monitoring-Programmen von den zuständigen Untersuchungseinrichtungen der Länder an das NRL-*E. coli* gesandt. Der Serotyp wurde mittels klassischer Serotypie (O-Gruppe) bzw. durch konventionelle PCR und PCR-RFLP (H-Typ) bestimmt. Die Detektion der Virulenzgene erfolgte mittels Real-time PCR. Die weitere Subtypisierung der *stx*-Gene wurde anhand von konventioneller PCR und PCR-RFLP durchgeführt. Ausgewählte Isolate wurden mittels Ganzgenomsequenzierung (WGS) weitergehend charakterisiert.

Ergebnisse:

Von den 75 an das NRL-*E. coli* eingesandten Isolaten wurden 89 % (n=67) der Isolate dem Serotyp O187:H28 zugeordnet, wohingegen 7 % (n=5) als O187:H8 und 4 % (n=3) als O187:H53 identifiziert wurden. Die WGS zeigte jedoch, dass es sich bei den fünf O187:H8 um eine Fehlidentifizierung handelte. Diese Isolate haben den Genoserotypen O168:H8. Umgekehrt wurden bisher zwei Isolate mit dem Serotypen O175:H28 und ein Isolat mit ONT:H28 mittels WGS als O187:H28 identifiziert. Somit verbleiben für die weiteren Untersuchungen 73 Isolate der Serogruppe O187.

Die Subtypen der *stx*-Gene dieser 73 Isolate verteilen sich wie folgt: 95 % *stx2g* (n=69), 4 % *stx1c* (n=3) und 1 % *stx2a+stx2g* (n=1). Interessanterweise kommt das *stx2g*-Gen ausschließlich bei den O187:H28 Stämmen vor, die O187:H53 Isolate tragen dagegen ein *stx1c*-Gen.

Die Analyse zu den Virulenzgenen zeigt, dass 86 % der Stämme (n=63) das Enterohämölysin-Gen *ehxA* tragen aber alle Stämme *eae* und *nleB* negativ sind. Von den 69 O187:H28 Stämmen sind 39 mittels WGS untersucht worden. Dabei zeigte sich, dass 95 % dieser Stämme das Gen *sta1/estIa* (n=37) tragen. Dieses kodiert für das hitzestabile Enterotoxin, welches mit enterotoxischen *E. coli* (ETEC) assoziiert ist. Weitere 90 % der Stämme wiesen ein *astA*-Gen auf (n=35), welches für das hitzestabile Enterotoxin EAST1 kodiert und auch in enteroaggregativen *E. coli* (EAEC) nachgewiesen wird.

Von den 73 untersuchten O187 Isolate stammen 30 % (n=22) aus den Zoonose-Monitoring-Programmen. Die übrigen 70 % (n=51) wurde im Rahmen von diagnostischen Untersuchungen eingesendet, welche auch Isolate aus den Bundesweiten Überwachungsplänen (BÜp) von 2018 und 2021 umfassen. Sie wurden aus den folgenden Matrix-Gruppen isoliert: 51 % Getreide und Getreideprodukte (n=37), 33 % Wildtierprodukte inkl. -kot (n=24), 8 % Frischgemüse und Gemüseerzeugnisse (n=6), 8 % andere Lebensmittel (n=6).

Diskussion:

Die Untersuchungen zu den STEC-Isolaten der O187-Gruppe ergaben zum einen, dass es bei der klassischen Serotypie zu Fehlidentifikation kommt und zum anderen, dass der überwiegende Teil der Stämme zusätzlich zum *stx*-Gen Virulenzgene trägt, welche mit weiteren *E. coli* Pathotypen assoziiert sind. Diese Stämme werden hauptsächlich in Getreideprodukten und Wildtieren gefunden, so dass hier Eintragungen über die Felder in die Lebensmittelkette plausibel erscheinen. Bisher sind in Deutschland keine lebensmittelassoziierten Ausbrüche mit diesen Serotypen bekannt. In Schweden wurde aber bereits ein Zusammenhang mit einer humanen Erkrankung durch einen STEC O187:H28 beschrieben. Daher sollten diese Stämme hinsichtlich ihres pathogenen Potentials nicht unterschätzt werden.

2.13 Shigatoxin-produzierende und enteropathogene *Escherichia coli* in getrockneten Kleinfischen von lokalen Märkten in Kenia

Laura Wessels¹, André Göhler¹, Carolin Hobe¹, Cyprian Odoli², Felix Reich¹, Johannes Pucher³

¹ Bundesinstitut für Risikobewertung, Abteilung für Biologische Sicherheit, Berlin

² Kenyan Marine and Fisheries Research Institute, Department Freshwater Systems, Baringo, Kenia

³ Bundesinstitut für Risikobewertung, Abteilung Experimentelle Toxikologie und ZEBET, Berlin

Die im Viktoriasee vorkommende kleine Fischart *Omena* (*Rastrineobola argentea*) ist ein weit verbreitetes Nahrungsmittel in Kenia. Um die Haltbarkeit der Fische zu verlängern, wird *Omena* in der Regel in der Sonne getrocknet. Hierbei wird der Fisch direkt auf dem Boden oder auf dem Boden ausgebreiteten alten Fischernetzen getrocknet. Entlang der gesamten Produktionskette bis hin zum Verkauf auf dem Markt können die getrockneten *Omena* mikrobiell kontaminiert werden. Zu den hier möglichen Kontaminanten zählen auch Shigatoxin-produzierende und enteropathogene *Escherichia coli* (STEC und EPEC).

In dieser Studie wurde getrocknete *Omena* von Märkten in acht kenianischen Städten (Kisumu, Nairobi, Bondo, Mbita, Busia, Eldoret, Kakamega und Nakuru) bezogen. Auf jedem Markt wurden Proben von fünf verschiedenen Verkaufsständen erworben und bis zur Analyse gekühlt gelagert. Probenaliquots (11 g) wurden in gepuffertem Peptonwasser rehydriert und kulturell direkt auf das Vorhandensein von *E. coli* untersucht. Anschließend wurden Anreicherungskulturen mittels PCR auf das Vorkommen von Shigatoxin-Genen (*stx1* und *stx2*) sowie von *eae*-Genen (für EPEC) untersucht. PCR positive Proben wurden subkultiviert, um Isolate für die weitere Charakterisierung zu gewinnen.

STEC konnte in Proben von den Märkten Kisumu, Busia und Eldoret und EPEC in Proben von den Märkten Mbita, Eldoret und Nairobi molekular nachgewiesen werden. In Proben von den Märkten Bondo, Kakamega, und Nakuru konnten weder STEC noch EPEC nachgewiesen werden. Es wurden drei STEC-Isolate aus zwei Märkten gewonnen. Diese waren den Serotypen O149:H8 mit *stx2a* und O17/77:H18 mit *stx2f* zuzuordnen.

In dieser Marktstudie konnten auf lokalen kenianischen Märkten pathogene *E. coli* in getrockneten *Omena* nachgewiesen werden. Um ein mögliches Risiko für Verbraucher abschätzen zu können sind weiterführende Untersuchungen zu Prävalenz und Herkunft von STEC und EPEC in *Omena* notwendig.

2.14 Aufklärung der epidemiologischen Bedeutung von Gennachweis-basierten EHEC-Labormeldungen nach § 7 IfSG in der Routinediagnostik

Elena Demihovska¹, Tilo Sasse¹, Gritt Ziems¹, Martina Littmann¹, Angelika Fruth²

¹ Landesamt für Gesundheit und Soziales Mecklenburg-Vorpommern, Rostock

² Nationales Referenzzentrum (NRZ) für Salmonellen und andere bakterielle Enteritiserreger, Robert Koch-Institut, Bereich Wernigerode

Hintergrund:

Seit der EHEC-Epidemie von 2011 gilt der Shigatoxin (*stx*)-Gennachweis als Goldstandard für die EHEC-Diagnostik. Zunehmend verzichten klinische Labore daher auf eine konventionelle bakteriologische *E. coli*-Diagnostik zugunsten eines molekularbiologischen Verfahrens. So melden viele Labore den direkten *stx*-Gennachweis aus Stuhl an die zuständigen Gesundheitsämter. Aufgrund einer gemeldeten EHEC-Infektion nach 7 IfSG müssen im Anschluss durch das Gesundheitsamt Umgebungsuntersuchungen initiiert bzw. ggf. Tätigkeits- oder Besuchsverbote (§ 34 (1, 2 und 3)) erteilt werden.

Unstrittig ist jedoch, dass ein Gennachweis nicht nur die Anwesenheit lebensfähiger Organismen anzeigt und so die epidemiologische Bedeutung von Labormeldungen, die auf Basis eines Direktnachweises aus Stuhl erfolgen, unter Umständen in Frage gestellt werden muss. Nach Absprache mit den klinischen Laboren in M-V hat das Labor des Landesamtes M-V (LAGuS) daher die weiteren Untersuchungen dieser Proben übernommen, um so die epidemiologische Bedeutung der eingegangenen Labormeldungen aufzuklären bzw. zu verifizieren.

Methode:

Nach Meldung einer EHEC-Infektion auf der Grundlage eines Gennachweises direkt aus Stuhl sendet das meldende klinische Labor die entsprechende Stuhlprobe an das LAGuS-Labor, wo der phänotypische Toxinachweis mittels des EIA-Verfahrens als Screening-Methode durchgeführt wird.

Fällt der EIA-Test aus der Anreicherungsbouillon negativ aus, werden keine weiteren Untersuchungen durchgeführt. Bei einem negativen Testergebnis erhält das zuständige Gesundheitsamt unverzüglich den negativen Befund mit dem Kommentar: „damit bleibt die Labormeldung nach 7 IfSG vom Labor xxx ohne epidemiologische Bedeutung“.

Bei einem positiven Testergebnis erfolgen als weitere Untersuchungen: (1) Toxingen-Nachweis aus der Mischkultur sowie (2) Toxingen-Nachweis direkt von der isolierten *E. coli*-Kultur, die im Anschluss (3) bakteriologisch komplett identifiziert und serotypisiert wird. Das Isolat wird abschließend an das RKI-Referenzlabor (NRZ) zur Bestätigung gesendet.

Ergebnisse:

Im Zeitraum von Januar 2016 bis Dezember 2020 wurden im LAGuS aus 2 Privatlaboren insgesamt 189 Stuhlproben mit einem positiven *stx*-Gennachweises direkt aus Stuhl untersucht.

Negative Befunde (n=93; 49 %) wurden innerhalb von 24–48 Stunden an das zuständige Gesundheitsamt sowie das einsendende Labor übermittelt.

Bei 96 Proben (51 %) wurde das Shigatoxin durch EIA nachgewiesen. 45 *E. coli*-Isolate agglutinierten mit den etablierten anti-*E. coli* O-Antigen-Testseren. 15 von 96 an das NRZ gesendeten *E. coli*-Isolate bzw. Mischkulturen wurden von diesem als EHEC/EPEC negativ identifiziert (u. U. durch Instabilität der Shigatoxin-Gen-Phagen bei den Passagen). Ein *E. coli*-Isolat wurde so auch als EHEC O157 mit Toxinphagenverlust definiert. Die Serovare wurden bei 42 *E. coli*-Isolaten (93 %) bestätigt und zusätzlich mittels Genoserotypie (PCR) bei 23 *E. coli*-Isolaten die selteneren Serovare (z. B. O146 u. a.) ermittelt.

Schlussfolgerungen:

- Die Zusammenarbeit zwischen klinischen und ÖGD-Laboren kann eine schnelle Aufklärung der epidemiologischen Bedeutung der Gennachweis-basierten EHEC-Labor-meldungen gewährleisten. Das führt nicht zur Infragestellung der Labor-Diagnose für den Index-Patienten, sondern ggf. zur Relativierung von erforderlichen Maßnahmen für Kontaktpersonen.
- Der große organisatorische und finanzielle Aufwand im Rahmen von Umgebungs-untersuchungen konnte deutlich reduziert werden.
- Ein vollständiger Ersatz der konventionellen Bakteriologie durch molekularbiologische Verfahren für resultierende, erforderliche Maßnahmen der GÄ ist daher zu diskutieren.

2.15 Shigatoxin-bildende *Escherichia coli* „vom Feld bis zum Teller“

Sabine Schlager

Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH, Graz, Österreich

Einer der der Leitsprüche der AGES (Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit) lautet: „Sichere Lebensmittel – vom Feld bis zum Teller“. Ein Teil dieses Auftrags wird am AGES-Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Graz als dem „Zentrum für Lebensmittel-bedingte Infektionskrankheiten“ umgesetzt. Zur optimalen Bewerksstellung dieser Aufgabe gibt es am Institut Abteilungen für Veterinär-, Lebensmittel- und Medizinische Mikrobiologie, sowie Referenzlaboratorien und Referenzzentralen (hauptsächlich für Durchfallerreger). Das Referenzlabor (für nicht-humane Proben) sowie die Referenzzentrale (für humane Proben) für *Escherichia coli* inklusive Verotoxin bildender *E. coli* (VTEC) gehören dazu.

Proben zum Nachweis und zur Typisierung von Shigatoxin-bildenden *Escherichia coli* (STEC) aus Umwelt, Futtermitteln, Tieren, Lebensmitteln und humanem Material werden landesweit gesammelt, und mit denselben Methoden in einem Labor analysiert. Das führt zu größtmöglicher Vergleichbarkeit und im Falle einer Ausbruchsabklärung bei Erkrankungsfällen zu einem schnellen Ergebnis.

Seit 2018 werden ein Großteil der Aufgaben, die sowohl die Referenzzentrale, als auch das Referenzlabor zu erfüllen haben, mittels Ergebnissen der Ganzgenomsequenzierung (Whole Genome Sequencing (WGS)) aller STEC-Isolate durchgeführt. Im Rahmen der Validierung dieser Methode wurden alle STEC-Stämme, die während eines halben Jahres im/in der Referenzlabor/Referenzzentrale *E. coli*-VTEC isoliert worden waren, parallel mit der bis dahin für epidemiologische Studien verwendeten Puls-Feld-Gelelektrophorese (PFGE) und WGS analysiert. Derselbe Probensatz wurde auch verwendet, um zu beweisen, dass (Sero)Typisierungsergebnisse generiert aus WGS-Daten mit den Resultaten der bis dahin verwendeten Methoden übereinstimmten. Mit diesen Ergebnissen und anhand einiger Beispiele kann gezeigt werden, dass WGS-Daten hervorragend für die zeitnahe Surveillance und für Ausbruchsabklärungen auf nationaler und internationaler Ebene geeignet sind.

Bei der Anzahl der Einsendungen humaner Proben konnte seit 2015 ein Anstieg beobachtet werden. Die Laboratorien, die auf molekulare Multiplex-Detektionssysteme umstellten, änderten auch ihre Screening Strategien (alle Durchfallstühle wurden nun untersucht, nicht nur Stühle mit Blutbeimengung und Stühle von Kleinkindern). Als Folge stiegen in diesen Regionen auch die STEC-Prävalenzen. Es ergaben sich dadurch im öffentlichen Gesundheitswesen vermehrt Probleme bezüglich des Managements der Fallpatienten vor allem aber bezüglich der Maßnahmen bei Dauerausscheidern und asymptomatischen Trägern. Aus dieser Notwendigkeit heraus wurde eine neue Leitlinie für personenbezogene Kontrollmaßnahmen, gestützt auf die Genom-basierte Risikobewertung des isolierten STEC-Stamms entwickelt. Diese Risikoabschätzung basiert hauptsächlich auf der Einstufung der Virulenz des Shigatoxin-Subtyps, und ob die vorliegende Serotyp/Sequenztyp-Kombination belegt durch Daten aus der Datenbank der Referenzzentrale und der Literatur schon schwere Erkrankungen (blutige Durchfälle, Hämolytisch-urämisches Syndrom (HUS)) hervorgerufen hat.

2.16 Characterisation of the association of the STEC subtilase cytotoxin with OMVs and its cellular consequences

Alexander Kehl¹, Ronja Kuhn², Herbert Schmidt⁵, Alexander Mellmann^{1,3,4}

¹ Institute for Hygiene, University of Münster

² Paul-Ehrlich-Institut, Langen (Hessen)

³ Interdisciplinary Center for Clinical Research (IZKF), University of Münster

⁴ National Consulting Laboratory for Hemolytic Uremic Syndrome (HUS), Münster

⁵ Department of Food Microbiology and Hygiene, Institute of Food Science and Biotechnology, University of Hohenheim, Stuttgart

Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC), a highly human-pathogenic subgroup of Shiga toxin (Stx)-producing *E. coli* (STEC), are the main cause of the life-threatening hemolytic-uremic syndrome. The cardinal virulence factor and most important diagnostic marker of EHEC is the production of Shiga toxin (Stx), a ribotoxic AB₅ toxin. Stx is not only freely secreted into the close environment of the bacteria but also carried by so-called outer membrane vesicles (OMVs), enabling bacteria to target cells distal from their attachment site. EHEC O157 represent the most prevalent serogroup in human diseases, however, non-O157 EHEC infections recently increased as exemplified by the devastating EHEC O104:H4 outbreak in Germany in 2011. Moreover, non-O157 EHEC strains often carry additional virulence factors such as the subtilase (SubAB), an AB₅ cytotoxin like Stx, with several subtypes identified by now. SubAB targets cells via its receptor *N*-glycolyl neuraminic acid (Neu5Gc) which, however, cannot be synthesised by human cells and is only supplied by diet. Whereas the subcellular targets of SubAB and the cellular consequences of its action are quite well-defined by now, it is unknown whether SubAB plays a role in the context of OMVs. Thus, we initially determined that OMVs in fact carry SubAB by western blotting. Next, we elicited that SubAB like Stx is located inside the OMVs by using a proteinase K assay. Then, we identified that SubAB, even though OMV-associated, necessitates its receptor Neu5Gc to exert its cytotoxicity by comparing serum-free and serum-containing cell culture of different cell types. Finally, we could show that OMV-associated SubAB – like free SubAB – triggers different pathways of the endoplasmic reticulum stress response, a hallmark of SubAB cytotoxicity. Altogether, our results demonstrate that SubAB expands the spectrum of OMV-associated EHEC toxins and underlines the importance of profiling virulence factors indicative of non-O157 EHEC.

2.17 Kausale EHEC Therapien – *In vitro* Studien zu klassischen und neuartigen Behandlungsoptionen

Michael Berger¹, Petya Berger¹, Gerald Kudelka², Ulrich Dobrindt¹

¹ Institut für Hygiene, Universität Münster

² Abteilung für Biowissenschaften, Universität zu Buffalo, USA

Infektionen mit enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC) sind gegenwärtig die einzigen potentiell tödlichen bakteriellen Infektionen, die nicht mit Antibiotika behandelt werden. Dies beruht darauf, dass klinische Studien in der Vergangenheit darauf hinzuweisen schienen, dass die Behandlung von EHEC Infektionen mit Antibiotika die Wahrscheinlichkeit erhöht das hämolytisch-urämische Syndrom zu entwickeln. Überraschenderweise wurden jedoch bisher hierbei in keiner einzigen klinischen Studie die Wirkmechanismen der untersuchten Antibiotika berücksichtigt. Dies ist aber äußerst wichtig, da es seit langem bekannt ist, dass die Expression des Shiga Toxins (Stx) – des wichtigsten Virulenzfaktors von EHEC – in Abhängigkeit des Wirkmechanismus des verwendeten Antibiotikums entweder inhibiert, oder aber aktiviert wird. Wir verwenden hier ein auf EHEC O157:H7 EDL933 basierendes Reportersystem, um zu zeigen, dass Antibiotika, die die Genexpression inhibieren, in der Lage sind die ciprofloxacininduzierte Stx1 Expression komplett zu blockieren, was möglicherweise nach einer Fehlmedikation von Bedeutung sein könnte. Darüber hinaus zeigten aber unsere *in vitro* Experimente, dass Transkriptions- und/oder Translationsinhibitoren wahrscheinlich auch ganz allgemein in der EHEC Therapie verwendet werden könnten. Hierzu (Azithromycin) läuft in Frankreich im Moment eine placebokontrollierte klinische Studie. Zusätzlich zu diesen klassischen Behandlungsmöglichkeiten testen wir im Moment das Potential der Expression von gam in Bezug auf die Inhibition der Stx Expression. Gam ist ein von Phage Lambda kodierter RecBCD Inhibitor und deshalb ein effizienter Suppressor der bakteriellen SOS-Antwort. Mit Hilfe unseres schon etablierten EHEC O157:H7 EDL933 Reporterstammes zeigen wir, dass das Einbringen einer konstitutiven gam Expressionskassette mittels eines konjugativen Plasmides zur Blockade einer ciprofloxacininduzierten SOS-Antwort, der Stx1 Expression und der durch den Phagen vermittelten Zellyse führt. Die Funktionalität des konjugativen Plasmides in anderen klinisch relevanten EHEC Isolaten wird gerade untersucht. Ziel dieses therapeutischen Ansatzes ist es, die konstitutive gam Expressionskassette mittels eines konjugativen Plasmides mit extrem hohen *in vivo* Übertragungsraten im Rahmen einer Infektion in EHEC einzubringen, um stx Phagen dadurch funktional zu inaktivieren und das Pathogen somit zu attenuieren. Wir glauben deshalb, dass schon in naher Zukunft effektive kausale Therapien als Alternativen zu den bisher vorhandenen lediglich symptomatischen Behandlungsmethoden für EHEC Infektionen zur Verfügung stehen werden.

2.18 Survival of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O104:H4 strain C227/11Φcu in agricultural soils

Katharina Detert, Herbert Schmidt

Department of Food Microbiology and Hygiene, Institute of Food Science and Biotechnology, University of Hohenheim, Stuttgart

Introduction:

Agricultural soils have been suggested as a reservoir for human pathogens such as EHEC, and may pose a contamination source for edible plants. The application of manure as soil fertiliser may enhance the risk of contamination. The German fertiliser ordinance prohibits the use of organic fertiliser twelve weeks before crop harvest to avoid the introduction of EHEC into the food chain. However, it is assumed that pathogenic *E. coli* survive for longer in the soil. In this study, we investigated the survival of *E. coli* O104:H4 strain C227/11Φcu in soil microenvironments with different soil types and different environmental conditions. In addition, the impact of sigma factor RpoS and Flagellin FliC which were hypothesised to play an important role in soil survival was analysed.

Methods:

The survival of *E. coli* O104:H4 strain C227/11Φcu in soil microenvironments with either diluvial sand (DS) or alluvial loam (AL) at two temperatures was investigated. We analysed whether EHEC are able to survive for more than twelve weeks and whether the addition of cattle manure may extend bacterial soil survival. In addition, the isogenic $\Delta rpoS$ and $\Delta fliC$ deletion mutants of C227/11Φcu were used for the experiments. Soil samples were inoculated to a final inoculum of 10^8 colony forming units/g soil (cfu/g soil) and incubated at either 4 °C or 22 °C for more than 12 weeks.

Results:

The survival of C227/11Φcu was highest at 4 °C, whereas the soil type had only a minor influence. Incubation of strain C227/11Φcu in AL at 4 °C resulted in a decrease of cultivable bacteria from 10^8 to 10^6 cfu/g soil within 12 weeks. The addition of cattle manure to soil increased the survival of pathogenic *E. coli*, respectively. The deletion of *rpoS* significantly decreased the survival period under all cultivation conditions. For AL and 4 °C, a decrease in viable counts from 10^8 to 10^1 cfu/g soil was detected during the incubation time of 12 weeks. In contrast, the *fliC* deletion did not have any influence on the survival ability in soil.

Conclusions:

The results of the current study demonstrate that EHEC strain C227/11Φcu is able to survive for more than 12 weeks in soil microenvironments. The survival was improved at low temperatures and through the application of cattle manure. In addition, we identified the sigma factor RpoS as an important determinant for soil survival of C227/11Φcu. Further experiments are needed to better understand the role of survival of human pathogens in agricultural soils.

2.19 Nachweis von Shigatoxin-bildenden *E. coli* in Getreide-Proben der Besonderen Ernte- und Qualitätsermittlung (BEE)

Jan Kabisch¹, Jens Begemann², Gregor Fiedler¹, Christina Böhnlein¹, Charles M.A.P. Franz¹

¹ Max Rubner-Institut, Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie, Kiel

² Max Rubner-Institut, Institut für Sicherheit und Qualität bei Getreide, Detmold

In Deutschland wurden im Jahr 2018 im Rahmen der amtlichen Lebensmittelüberwachung (bundesweiter Überwachungsplan) Shigatoxin-bildende *Escherichia coli* (STEC) in Mehlproben (Weizen, Dinkel und Roggen) nachgewiesen. Die Serotypisierung der STEC-Isolate ergab, dass in einigen Fällen Serotypen nachgewiesen wurden, die auch aus erkrankten Patienten isoliert wurden. Zwar werden STEC im klassischen Backprozess, bei Temperaturen über 70 °C unter Anwendung von „feuchter Hitze“ sicher abgetötet, allerdings trifft dies nicht auf trockene Mehlprodukte mit einem Wassergehalt von ca. 13 % zu. Diese Bakterien sind relativ unempfindlich gegenüber Austrocknung und zeigen in Mehl eine Überlebensfähigkeit von bis zu 2 Jahren. Dies veranlasste das BfR in einer Stellungnahme (Nr. 004/2020 des BfR vom 20. Januar 2020) auf die Möglichkeit einer gesundheitlichen Beeinträchtigung bei EHEC/STEC in Mehl hinzuweisen und entsprechende Empfehlungen auszusprechen. Gleichzeitig wurde auch ausgeführt, dass besonders im Bereich der Eintragswege/-quellen und der Häufigkeit des Eintrags Forschungsbedarf besteht, welches Ausgangspunkt unserer Arbeiten war. In dem hier vorgestellten Projekt werden Daten generiert, um die Frage nach potentiellen Eintragsquellen von STEC in das Produkt Mehl beantworten zu können. So ist bereits eine Kontamination des Getreides auf den Anbauflächen denkbar und könnte in den Mühlen bei der weiteren Verarbeitung des Getreides zu „Nischenkontaminationen“ führen. Für die Untersuchungen zur Prävalenz von STEC in Getreide werden Proben der Besonderen Ernte- und Qualitätsermittlung (BEE) aus ganz Deutschland untersucht. Inzwischen wurden 947 Weizen- und 288 Roggenproben der Ernteperioden 2020 und 2021 auf das Vorhandensein von Shigatoxin-bildenden *E. coli* analysiert. In 34 Proben konnten *stx1*- bzw. *stx2*-Gene mittels PCR nachgewiesen und in 7 Fällen ein Isolat gewonnen werden. Die Isolate wurden anschließend serotypisiert und mittels Ganzgenom-Analyse weiter charakterisiert. Drei der Isolate konnten dem Serotyp O187:[H28] zu geordnet werden. Dieser Serotyp wurde auch in Mehlproben aus der Schweiz und Deutschland isoliert (Boss & Hummerjohann, 2019; Projahn *et al.*, 2021).

Der Vortrag informiert über die aktuellen Ergebnisse und gibt einen Ausblick über die weiteren geplanten Arbeiten.

2.20 STEC bei Alpakas und Wildnagern in Mitteldeutschland

Belén González Santamarina¹, Michael Weber¹, Christian Imholt², Kathrin Jeske³,
Rainer G. Ulrich³, Christian Menge¹, Christian Berens¹

¹ Friedrich-Loeffler-Institut, Institut für molekulare Pathogenese, Jena

² Julius Kühn-Institut, Institut für Pflanzenschutz in Gartenbau und Forst, Münster

³ Friedrich-Loeffler-Institut, Institut für neue und neuartige Tierseuchenerreger, Greifswald – Insel Riems

Das Hauptreservoir für Shigatoxin-bildende *Escherichia coli* (STEC), inkl. enterohämorrhagische *E. coli*, sind Rinder, andere landwirtschaftlich genutzte Wiederkäuer (Schafe, Ziegen) sowie Wildwiederkäuer. Inwieweit weitere Tierarten in Deutschland Reservoirs für STEC darstellen oder als Zwischenwirte zur Epidemiologie der Erreger beitragen, ist nur unzureichend abschätzbar.

Neuweltkameliden (NWK; Alpakas, Lamas) werden in Deutschland immer häufiger in engem Kontakt zu Nutztieren und Menschen gehalten. Jedoch ist wenig über die Prävalenz bakterieller Tierseuchen- und Zoonoseerreger bei diesen Tieren bekannt. Daher wurden 94 Sammelkotproben von NWK aus 43 Betrieben in Sachsen, Sachsen-Anhalt und Thüringen auf die Präsenz von STEC untersucht. Siebzehn Kotproben aus zwölf Betrieben waren in der PCR *stx*-positiv, zwölf für *stx1*, eine für *stx2* und vier für *stx1/stx2*. Sechs STEC-Stämme wurden aus den Proben isoliert und mittels Vollgenomsequenzierung (WGS) charakterisiert. Alle waren *eae*-negativ und gehörten zu nicht-O157- oder *Big Six*-Serovaren. Zwei Stämme aus verschiedenen Betrieben hatten den Genoserotyp O87:H16 (ST2101; *stx2b*), die anderen OX18:H2 (ST2599; *stx1a*), O55:H12 (ST101; *stx1a*), O76:H19 (ST675; *stx1c*, *stx2b*) und O86:H8 (ST297; *stx+* in der PCR, *stx-* in der WGS). Der OX18:H2-Stamm enthielt Resistenzgene für Aminoglykoside, Cotrimoxazol, β -Laktame und Fosfomycin sowie chromosomale Mutationen, die Resistenz gegenüber Fluorchinolonen vermitteln.

Im Rahmen eines Biodiversitätsprojekts wurden auf unterschiedlich intensiv beweideten Flächen in Thüringen im Frühjahr, Sommer und Herbst 2018 Wildnager gefangen und Darminhaltsproben auf das Vorkommen von STEC untersucht. Die Ergebnisse wurden mit denen von Kotproben dort gehaltener Weidetiere (Rinder, Schafe) verglichen. Von 206 Proben verschiedener Nagerspezies war eine aus einer Feldmaus (*Microtus arvalis*) in der PCR *stx1/stx2*-positiv. Drei zeitgleich von derselben Grasfläche genommene Schafkotproben waren ebenfalls *stx*-positiv. Vier STEC-Stämme (1x Feldmaus, 3x Schaf) wurden aus den Proben isoliert. Die WGS-Analyse ergab für das Feldmaus-Isolat den Genoserotyp O91:H14 (ST33; *stx1a*, *stx2b*) und für die drei Schaf-Isolate die Genosertypen O91:H14 (ST33; *stx1a*, *stx2b*), O76:H19 (ST675; *stx1c*) und O87:H16 (ST2101; *stx2b*). Alle Stämme waren *eae*-negativ. Die Sequenzen der CRISPR-Elemente 2.1, 2.2-3 und 4.1-2 der zwei O91:H14 Isolate waren identisch, was auf eine nähere Verwandtschaft hinweist.

Die für die STEC-Isolate von NWK und Wildnagern gewonnene genetische Information lässt vermuten, dass das Risiko, diese Stämme würden schwere Erkrankungen beim Menschen auslösen, relativ niedrig ist. Beide Wirte stehen aber in häufigem Kontakt zu landwirtschaftlichen Nutztieren. Die in den NWK und der Feldmaus gefundenen Stämme unterstreichen, dass diese Tiere potentielle Reservoirs von STEC bzw. *stx*-konvertierenden Bakteriophagen darstellen und zur Dynamik der STEC-Evolution in Deutschland beitragen.

2.21 STEC im nationalen Zoonosen-Monitoring nach AVV Zoonosen Lebensmittelkette

Katja Alt¹, Bernd-Alois Tenhagen¹, Carolina Plaza Rodríguez¹, Annemarie Käsbohrer¹, Elisabeth Schuh²

¹ Bundesinstitut für Risikobewertung, Abteilung Biologische Sicherheit, Fachgruppe Epidemiologie, Zoonosen und Antibiotikaresistenz, Berlin

² Bundesinstitut für Risikobewertung, Abteilung Biologische Sicherheit, Fachgruppe Lebensmittelmikrobiologie, Wirt-Erreger-Interaktion, Nationales Referenzlabor für *Escherichia coli* einschließlich verotoxinbildende *E. coli* (NRL-*E. coli*), Berlin

Shigatoxin-bildende *Escherichia coli* (STEC) verursachen in Deutschland jährlich hunderte Enteritiden beim Menschen und als lebensbedrohliche Komplikation das hämolytisch-urämische Syndrom. Als Reservoir gelten Wiederkäuer, vor allem Rinder. Die Übertragung auf den Menschen erfolgt fäkal-oral, wobei die Erregeraufnahme durch den Kontakt mit Tierfäzes, über kontaminierte Lebensmittel oder kontaminiertes Wasser erfolgt, aber auch durch direkten Kontakt von Mensch zu Mensch (RKI, 2020). Für die Bewertung des Risikos eines Eintrags von STEC in die Lebensmittelkette werden seit 2009 jährlich im Rahmen des nationalen Zoonosen-Monitorings nach AVV Zoonosen-Lebensmittelkette unterschiedliche Matrices vom Erzeugerbetrieb, über die Gewinnung bis zum Einzelhandel (und Großhandel) auf STEC untersucht. Proben tierischen und pflanzlichen Ursprungs werden nach einem national repräsentativen Schlüssel in den Bundesländern genommen und in den regionalen amtlichen Untersuchungseinrichtungen untersucht. Gewonnene STEC-Isolate werden an das Nationale Referenzlabor (NRL) *E. coli* und an das NRL Antibiotikaresistenz am BfR zur weiteren Charakterisierung, einschließlich Resistenztypisierung, gesandt.

Im Erzeugerbetrieb wurden seit 2009 Proben von Milch- und Mastrindern, Mastkälbern, kleinen Wiederkäuern zur Milchproduktion, Blatt- und Kopfsalaten sowie Erdbeeren auf STEC untersucht. Dabei waren pflanzliche Proben nur selten positiv (Salate: 1,3 %; Erdbeeren 0 %). Sammelmilchproben von Rindern waren zwischen 1,4 und 4,9 %, die von kleinen Wiederkäuern zu 7,3 % positiv. In Sammelkotproben von Mastkälbern und Mastrindern wurden STEC regelmäßig nachgewiesen (Mastrinder: 18,5 und 22,8 %; Mastkälber: 26,5 und 27,4 %). Am Schlachthof wurden Proben von Blinddarminhalt und Schlachtkörpern von Mastrindern und Mastkälbern auf STEC untersucht. Nachweise in Blinddarminhalt gelangen in 13,5 bis 43,2 % bei Mastkälbern, bei Mastrindern in 11 % der Proben. Schlachtkörper von Mastrindern waren seltener mit STEC kontaminiert (2,3 und 2,5 %) als die von Mastkälbern (5,7 %). Proben, die im Einzelhandel gewonnen wurden, waren besonders häufig positiv bei Fleisch von Wildwiederkäuern (16,1 und 29,8 %). Aber auch Lammfleisch war zu 13,2 %, Kalbfleisch zu 5,8 und 6,2 %, Schweinehackfleisch zu 7,4 % und Rinderhackfleisch zu 3,8 % positiv für STEC. Rohmilchkäseproben waren zwischen 0,6 und 1,9 % positiv. Auch pflanzliche Lebensmittel im Einzelhandel werden regelmäßig im Zoonosen-Monitoring betrachtet. Die bisher untersuchten Matrices wiesen selten STEC auf, am häufigsten ließ sich der Erreger in Babyspinat nachweisen, hier waren 1,2 % der Proben positiv.

Wild wird im Zoonosen-Monitoring regelmäßig betrachtet. Diese Programme dienen überwiegend dazu, den Eintragungsweg von resistenten Keimen aus der Umwelt zu reflektieren. Erlegtes Schwarz- und Rehwild, aber auch Wildgeflügel (Enten und Gänse) wurden bisher untersucht. Sehr häufig konnten STEC aus Kotproben von Rehwild isoliert werden (40,2 %), während solche vom Wildschwein zu rund 7 % positiv waren. In den 95 untersuchten Kotproben von Wildgeflügel konnten keine STEC nachgewiesen werden.

Im Jahr 2020 wurden Proben von Weizenmehl vor dem Verpacken für den Endverbraucher in allen großen Mühlen (>1000 t/J) auf STEC untersucht. In 9,1 % der 242 Proben wurden STEC nachgewiesen.

Isolate, die im Zoonosen-Monitoring gewonnen werden, tragen regelmäßig das *eae*-Gen und gehören häufig Serogruppen an, die dem RKI als Verursacher von humanen EHEC-Erkrankungen gemeldet werden. So trugen unter den typisierten Isolaten aus Mehl drei das *eae*-Gen und es wurden drei O-Gruppen nachgewiesen, die unter den zehn häufigsten Serogruppen bei Erkrankungen des Menschen vorkamen (O26, O103 und O146).

2.22 High occurrence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in raw meat-based diets for companion animals – a public health issue

Andrea Treier, Roger Stephan, Marc J.A. Stevens, Nicole Cernela, Magdalena Nüesch-Inderbinen

Institute for Food Safety and Hygiene, University of Zürich, Switzerland

Feeding pets raw meat-based diets (RMBDs) is increasingly popular but comes with a risk of pathogenic bacteria, including Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC). In humans, STEC may cause gastrointestinal illnesses including diarrhoea, haemorrhagic colitis (HC), and the haemolytic uremic syndrome (HUS). The aim of this study was to evaluate commercially available RMBDs with regard to the occurrence of STEC. Of 59 RMBD samples, 59 % tested positive by real-time PCR for the presence of Shiga toxin genes *stx1* and/or *stx2*. STEC were recovered from 41 % of the samples and strains were subjected to serotyping and virulence gene profiling using whole genome sequencing (WGS) based methods. Of 28 strains, 29 % carried *stx2a* or *stx2d* which are linked to STEC with high pathogenic potential. Twenty different serotypes were identified including STEC O26:H11, O91:H10, O91:H14, O145:H28, O146:H21, and O146:H28, which are within the most common non-O157 serogroups associated with human STEC related illnesses worldwide. Considering the low infectious dose and potential severity of disease manifestations, the high occurrence of STEC in RMBDs poses an important health risk for persons handling raw pet food and persons with close contact to pets fed on RMBDs and is of concern in the field of public health.

3 Verzeichnis der Autorinnen und Autoren

- Adam, Henriette 20
Alt, Katja 32
Barth, Stefanie A. 18
Begemann, Jens 30
Berens, Christian 18, 31
Berger, Michael 28
Berger, Petya 28
Berghof-Jäger, Kornelia 17
Biggel, Michael 14
Böhnlein, Christina 30
Brönstrup, Mark 11
Busch, Ulrich 19
Cernela, Nicole 14, 34
Demihovska, Elena 24
Detert, Katharina 29
Dobrindt, Ulrich 28
Dorner, Brigitte G. 11
Drache, Katja 21
Fiedler, Gregor 30
Flieger, Antje 11, 15, 16
Franz, Charles M.A.P. 30
Fruth, Angelika 11, 15, 16, 24
Ganas, Petra 21
Geue, Lutz 18
Göhler, André 12, 21, 23
González Santamarina, Belén 31
Grönewald, Astrid 17
Grönewald, Cordt 17
Guder, Gabriele 20
Haby, Sabine 21
Hartenstein, Hanna 17
Hauf, Samuel 11
Hobe, Carolin 12, 21, 23
Huber, Ingrid 19
Imholt, Christian 31
Jeske, Kathrin 31
Kabisch, Jan 30
Käsbohrer, Annemarie 32
Kehl, Alexander 27
Knüppel, Laura 12
Köppel, René 10
Kudelka, Gerald 28
Kuhn, Ronja 27
Lang, Christina 11, 15, 16
Littmann, Martina 24
Meier-Wiedenbach, Ivo 17
Mellmann, Alexander 27
Menge, Christian 18, 31
Morabito, Stefano 8
Müller, Andrea 14
Nüesch-Inderbinnen, Magdalena 14, 34
Odoli, Cyprian 23
Pavlovic, Melanie 19
Peier, Martin 10
Peukert, Carsten 11
Plaza Rodríguez, Carolina 32
Pries, Karin 21
Projahn, Michaela 12, 21
Pucher, Johannes 23
Ramming, Isabell 11
Reich, Felix 12, 23
Rothballer, Michael 19
Salzinger, Carina 21
Sasse, Tilo 24

Schaufler, Katharina 18

Schlager, Sabine 12, 26

Schmidt, Dana 21

Schmidt, Herbert 27, 29

Schuh, Elisabeth 12, 21, 32

Seide, Kerstin 20

Senkter, Marla 12

Steffan, Sebastian 21

Stephan, Roger 14, 34

Stevens, Marc J.A. 14, 34

Tenhagen, Bernd-Alois 32

Thiem, Ines 20

Treier, Andrea 34

Ulrich, Rainer G. 31

Viedt, Heike 20

Weber, Michael 18, 31

Wendrich, Stefanie 17

Wessels, Laura 23

Wöhlke, Anne 20

Ziems, Gritt 24