

ausgewählter Stämme zeigt die starke Heterogenität der insbesondere in Rinderhack vorkommenden VTEC auf. Verotoxinbildende *E. coli*-Stämme, die in Deutschland bereits mit EHEC-Infektionen in Zusammenhang gebracht wurden, wie z.B. O157, O26, O22 und O111, wurden aus den Hackfleisch- und Weichkäseproben nicht isoliert.

Das Auftreten VT-positiver Befunde war in Rinderhackfleisch mit hohen Gesamtkeimzahlen ($> 10^7$ KBE/g) und höheren Enterobacteriaceae-Keimgehalten ($> 10^5$ KBE/g), in Rohmilchkäseproben mit hohen Coliformen-Keimgehalten ($> 10^5$ KBE/g) assoziiert. Die Menge der nachweisbaren *E. coli* scheint hingegen kein geeigneter Indikator für das mögliche Vorhandensein von VTEC in Hackfleisch und in Weichkäse zu sein.

Danksagung:

Wir danken Dr. Steinrück, Robert Koch-Institut, Berlin, für die Serotypisierung der VTEC-Isolate. Wir danken Frau Petra Vogt, Frau Monika Müller, Frau Christine Fester, Frau Petra Werner und Frau Ursula Maslanka für die technische Durchführung der Laborarbeiten.

Literatur:

- [1] Miller, L. G., and Kaspar C. W.: *Escherichia coli* O157:H7. Acid Tolerance and Survival in Apple Cider. *J. Food Protection*.57 (1994) 460-464.
- [2] Tsai, Y.-W., and Ingham, S. C.: Survival of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* spp. in acidic condiments. *J. Food Protection*.60 (1997) 751-755.
- [3] Klie, H., Timm, M., Richter, H., Gallien, P., Perlberg, K.-W., und Steinrück, H.: Nachweis und Vorkommen von Verotoxin-bildenden (VTEC) bzw. Shigatoxin-bildenden (STEC) *Escherichia coli* in Milch. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* 110, 9 (1997) 337-341.
- [4] Timm, M., Klie, H., Richter, H., Gallien, P., Perlberg, K.-W., Lehmann, S., und Protz, D.: Verfahren zum qualitativen Nachweis von

Verotoxin-produzierenden *Escherichia coli* (VTEC) in Lebensmitteln und Fäzes. *Bundesgesundhbl. Sonderheft* Oktober 1998, 20-25.

- [5] Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §35 LMBG, Band I/1b, Teil 1b und Band I/2, Teil 2. Berlin/Köln: Beuth Verlag GmbH.
- [6] AOAC-Methods 16.275-16.277 (13th ed., 1980): Dairy Products: Cheese. »Residual Phosphatase (27) – Official Final Action«.
- [7] Verordnung über Hygiene- und Qualitätsanforderungen an Milch und Erzeugnisse auf Milchbasis (Milchverordnung) vom 24. April 1995, Anlage 6.

Anschrift der Verfasser:

Dr. P. Teufel, Dr. Edda Bartelt, Dr. Juliane Bräunig, Dr. L. Ellerbroek, A. Telo und Dr. Heidi Wichmann-Schauer, Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV), Bereich Marienfelde, Diederisdorfer Weg 1, 12277 Berlin; Dr. P. Gallien, Dr. H. Richter, Dr. Helma Klie, Marita Timm und Dr. K.-W. Perlberg, Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV), Bereich Dessau, Jahnstraße 8, 06846 Dessau

Charakterisierung chromogener Nährmedien zum Nachweis von *E. coli* O157:H7/H-

Von R. Reissbrodt, U. Sachse, H. Steinrück und H. Tschäpe

Einführung

E. coli-Bakterien des Serovars O157:H7/H- stellen die bekanntesten und am besten untersuchten Vertreter der Shigatoxine produzierenden enterohämorrhagischen *E. coli* (EHEC) dar. Sie waren die Verursacher der meisten EHEC-Ausbrüche weltweit. Durch ihre Shigatoxinogenität, das Vorhandensein weiterer chromosomal oder plasmidal kodierter Virulenzfaktoren: der Pathogenitätsinsel LEE mit dem Sekretion-III-System und dem *eaeA*-Gen (Intimin), das Enterohämolysin (*ehxA*), das hitzestabile enterotoxische Protein EAST1 (*ast-A*), die Katalase/Peroxidase (*catP*), der Hemin-Aufnahmerezeptor (*chuA*) sowie durch ihre niedrige Infektionsdosis (10–100 Keime) gehören diese Bakterien zu den hoch infektiösen Infektionserregern. Sie verursachen Durchfälle mit wäßrigen und wäßrig-blutigen Stühlen, Hämorrhagische Colitis, können postinfektiöse extraintestinale Erkrankungen wie HUS und TTP auslösen und sind als Erreger von Lebensmittelinfektionen anzusehen, aber auch von

Mensch zu Mensch übertragbar [1, 2]. Die meisten *E. coli* O157:H7-Stämme unterscheiden sich biochemisch von den kommensalen *E. coli* sowie von den anderen enteropathogenen und extraintestinal pathogenen *E. coli*-Stämmen durch die Eigenschaften Säuren aus Sorbitol sowie β -D-Glucuronidase zu bilden. *E. coli* O157:H7-Stämme sind zu ca. 95 % in diesen Eigenschaften negativ, *E. coli* non-O157-Stämme zu 94–96 % positiv [3, 4, 5, 6].

Diese Eigenschaften korrelieren bei *E. coli* O157:H- nicht mehr so eindeutig und sind für *E. coli* non-O157 als diagnostisch verwertbare Merkmale nicht zu nutzen. March and Ratnam [7] beschrieben das Sorbitol-MacConkey-Medium (SMAC) zum Nachweis von *E. coli* O157:H7 aus Stuhlproben. Hier wurden die Begriffe NSF (non-sorbitol-fermenting organisms in fecal flora) und SF eingeführt. NSF wachsen auf diesem Nährmedium als helle, durchscheinende Kolonien und SF als rote bis pinkfarbene. Da nicht nur *E. coli* O157:H7/H- als NSF wachsen, sondern auch andere

Säuren aus Sorbitol negative Bakterien (z. B. die Proteus/Providencia/Morganella-Gruppe, *Hafnia alvei*, *E. fergusonii*, *E. hermannii* u. a.), ist die praktische Anwendung eingeschränkt, besonders durch die Notwendigkeit der serologischen Überprüfung vieler heller Kolonien. Eine Verbesserung brachte der Zusatz des fluorogenen 4-Methylumbelliferyl- β -D-glucuronids (MUG) oder des chromogenen 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronids (BCIG) zum zusätzlichen Nachweis der β -D-Glucuronidase [8]. Solche Nährmedien gehören gegenwärtig zum Standard für den *E. coli* O157:H7/H- Nachweis. Durch den Zusatz von Hemmstoffen, z. B. Cefixim (50 μ g/l) und Kaliumtellurit (1 mg/l) zu SMAC (CT-SMAC, [9]) konnte die Selektivität zugunsten *E. coli* O157 erhöht werden. *E. coli* O157:H7 und *Shigella sonnei*-Stämme wachsen auf diesem Nährmedium, das Wachstum der anderen *E. coli*-Stämme und der Begleitflora ist gehemmt. Leider traten immer mehr Tellurit-sensible *E. coli* O157-Stämme, besonders H- auf,

die oft nur noch maximal 0,2 mg K_2TeO_3/l tolerierten (unveröffentlichte Ergebnisse). Damit war das Selektionsprinzip weitgehend unterwandert. Da *E. coli* O157:H7-Stämme L-Rhamnose auf festen Nährmedien nicht verwerten können, wurde durch Zusatz von Rhamnose zum SMAC (mit Cefixim als CR-SMAC bezeichnet) der Anteil farbloser *E. coli* O157-Kolonien etwas erhöht [10]. Eine Weiterentwicklung zum Nachweis von *E. coli* O157-Bakterien stellen die chromogenen Nährmedien dar. Zusätzlich zu den hier angeführten biochemischen Markern nutzen diese Nährmedien verschiedene pH-abhängige chromogene Substrate für β -D-Galactosidase zur besseren Differenzierung. Die gegenwärtig auf dem Markt erhältlichen chromogenen Nährmedien Rainbow® Agar O157 (Biolog Hayward CA, USA), CHROMagar® O157 (Paris, Frankreich) und BCM™ *E. coli* O157:H7 (+) culture medium (Biosynth AG, Staad, Schweiz; Fertigplatte heipha, Heidelberg) sind nach den hier erhaltenen Ergebnissen für die schnelle Isolierung der meisten *E. coli* O157:H7/H-Stämme geeignet.

Material und Methoden

Bakterienstämme

Die *E. coli* O157:H7/H-Stämme und die zum Vergleich mitgeprüften Enterobacteriaceae und Pseudomonaden wurden der Stammsammlung des Nationalen Referenzzentrums für Salmonellen und andere Enteritiserreger am RKI Wernigerode und am Hygiene Institut Hamburg entnommen.

Prüfung der biochemischen Eigenschaften

Die untersuchten *E. coli* O157:H7/H-Stämme sowie die anderen Enterobacteriaceae und Pseudomonaden wurden zur Reinheitskontrolle auf Galle-Chrysoidin-Glycerol-Agar (SIFIN, Berlin) mit MUG ausgetrichen. Gleichzeitig wurde so die β -D-Glucuronidase durch Fluoreszenz bestimmt. Die untersuchten Enterobacteriaceae wurden mit dem computergestützten Bactid-System überprüft [11]. Die verwendeten Nährmedien und Methoden für die 47 Reaktionen (u. a. Säuren aus Sorbitol) des Bactid-Systems basieren auf den in den CDC Atlanta genutzten Rezepturen und Vorschriften. Die Pseudomonaden wurden mit dem MicroStation™-System (Biolog Hayward, CA, USA) identifiziert.

Chromogene Nährmedien

Rainbow® Agar O157 und CHROMagar® O157 wurden uns von den Herstellern zur Prüfung überlassen. Die Nährmedien wurden nach deren Angaben hergestellt (Rainbow® Agar O157 mit 0,8 mg Kaliumtellurit/l und 10 mg Novobiocin/l, CHROMagar® O157 ohne Hemmstoffe).

BCM™ *E. coli* O157:H7 (+) culture medium wurde in Pulverform von Biosynth AG gekauft und nach Prüfung mit nur 0,2 mg Kaliumtellurit/l und 10 mg Novobiocin/l angesetzt.

Rainbow® Agar O157 enthält chromogene Substrate für β -D-Galactosidase (blau-schwarzes Chromophor) und β -D-Glucuronidase (rot-violettes Chromophor), BCM™ *E. coli* O157:H7 (+) culture medium chromogene Substrate für β -D-Galactosidase. Die detaillierte Nährmedienzusammensetzung war uns aus patentrechtlichen Gründen unbekannt.

Inokulation und Bebrütung

Die bei -70°C in der Microbank™ (Mast Diagnostica, Reinfeld) gehaltenen Stämme wurden auf Nähragar (Oxoid) über Nacht bei 37°C angezüchtet, und nach Suspendieren in NaCl (0,85 %) fraktioniert auf die getrockneten Platten der chromogenen Nährmedien geimpft. Zum Vergleich wurden SMAC und CT-SMAC-Nährmedien (Oxoid, Wesel) mitgeprüft. Die Bebrütung erfolgte 18–20 Std. bei $36 \pm 1^\circ\text{C}$.

Serologische Überprüfung der gewachsenen Kolonien

Die auf den chromogenen Nährmedien gewachsenen *E. coli* O157-Kolonien wurden mit *E. coli* O157-Antiserum (SIFIN, Berlin) und mit *E. coli* O157:H7 Latextest (Wellcolex *E. coli* O157:H7 Latextest, Abbott GmbH Diagnostika, Wiesbaden) geprüft. Die H-Antigene wurden nach dreimaliger Passage der Bakterien durch mit Veal Infusion Broth (Difco) unter Zusatz von 0,1 % Agar (Oxoid, No. 1) gefüllte U-Röhrchen getestet [12]. Hier wurden einmal Anti-*E. coli*-H-Seren, zum anderen der *E. coli* O157:H7-Latextest (s. o.) angewendet. Der H7-Latextest wurde auch mit auf Nähragar (Nutrient broth, Difco (8 g/l), Yeast extract, Difco (3 g/l)), NaCl (5 g/l) und Agar (15 g/l)] gewachsenen Kolonien durchgeführt.

Ergebnisse

E. coli O157:H7/H-Stämme mit den biochemischen Eigenschaften Säuren aus Sorbitol negativ und β -D-Glucuronidase negativ wachsen typisch entsprechend den Beschreibungen der Hersteller (Tab. 1). Sorbitol und β -D-Glucuronidase positive O157:H7/H-Stämme lassen sich auch auf diesen chromogenen Nährmedien nicht von *E. coli* non-O157-Stämmen unterscheiden. Da das BCM™ *E. coli* O157:H7 (+) culture medium (BCM) kein chromogenes Substrat für β -D-Glucuronidase enthält, erscheinen die Sorbitol negativen, β -D-Glucuronidase-positiven Stämme noch als blau-schwarze Kolonien typisch für *E. coli* O157.

Von den sieben SF und β -D-Glucuronidase positiven *E. coli* O157:H7-Stämmen wuchsen sechs aufgrund ihrer Telluritsensibilität nicht auf CT-SMAC. Einer dieser Stämme wuchs nicht auf Rainbow® Agar O157 bzw. BCM, jedoch auf CHROMagar® O157. Allerdings wurde der CHROMagar® O157 nach Angaben des Herstellers ohne Hemmstoff geprüft. Von den anderen geprüften Enterobacteriaceae waren einige gehemmt. *Citrobacter spp.*- und *Enterobacter-cloacae*-Stämme wuchsen als kleine grüne Kolonien auf gelbem Nährboden, *Proteus mirabilis*, *P. rettgeri*, *Serratia marcescens* und Salmonellen als kleine, helle bis gelbliche Kolonien auf BCM. Hier erschienen *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* und *P. putida* als helle durchscheinende kleine Kolonien auf rotvioletter Nährmedium. Zwei von vier geprüften *Hafnia-alvei*-Isolaten wuchsen sowohl auf diesem chromogenen Nährmedium als auch auf Rainbow® Agar O157 ähnlich den *E. coli* O157-Kolonien. Da die für *E. coli* O157 typischen Kolonien generell serologisch bestätigt werden müssen, konnte hier schnell entschieden werden. Eine weitere Unterscheidungsmöglichkeit bestand im Indolschnelltest (*Hafnia alvei* negativ, *E. coli* positiv) oder im *Hafnia*-Test, beides z. B. durch Reagnost®-Streifen-tests von Feinchemie Sebnitz, Sebnitz/Sachsen. Auf Rainbow® Agar O157 wuchsen die genannten Enterobacteriaceae weiß bis gelblich. Allerdings erschienen β -D-Galactosidase positive Enterobacteriaceae ebenfalls rotviolett, auch Salmonellen der Subspezies III a und III b. Pseudomonaden wuchsen als weiße, kleine Kolonien, gram-positive Bakterien waren gehemmt.

Tabelle 1: Eigenschaften, Wachstum und Kolonieaussehen von *E. coli* O157:H7/H-Stämmen auf drei chromogenen Nährmedien

Eigenschaften der <i>E. coli</i> -O157-Stämme			Anzahl	Chromogenes Nährmedium		
H-Antigen	Säure aus Sorbitol	β -D-Glucuronidase		Rainbow [®] , Agar O157 mit Novobiocin (10 mg/l) und K ₂ TeO ₃ (0,8 mg/l), lot 710282	BCM [™] <i>E. coli</i> O157:H7 (+) culture medium mit Novobiocin (10 mg/l) und K ₂ TeO ₃ (0,2 mg/l), lot 23086	CHROMagar [®] , O157 ohne Hemmstoffe, lot 243
7	-	-	79	Anstrich grau-schwarz, Einzelkolonie grau mit schwarzem Zentrum, grauer Saum, grau-schwarzes Präzipitat um die Kolonie, bis 1,5 mm im Durchmesser, NM klar. Kolonietyp: grau-schwarz	Anstrich blau-schwarz, Einzelkolonie blauschwarz mit blau-schwarzem Präzipitat, NM grün oft rot-violett, bis 1 mm im Durchmesser. Kolonietyp: blauschwarz	Anstrich altrosa, Einzelkolonie altrosa, rot-violettes Zentrum, zartrosa Saum, kein Präzipitat, bis 1 mm im Durchmesser, NM klar. Kolonietyp: altrosa
7	+	+	3	Anstrich und Einzelkolonie rot-violett bis purpur, rot-violettes Präzipitat Kolonietyp: rot-violett	Anstrich und Einzelkolonie grün, teilweise mit bräunlichem Zentrum, bis 1,5 mm im Durchmesser, NM gelb, oft weißes Präzipitat um das massive Wachstum, Kolonietyp: grün-gelb	Anstrich und Einzelkolonie blau bis türkis, bis 1 mm im Durchmesser, NM klar. Kolonietyp: blau-türkis
-	-	-	26	grau-schwarz	blauschwarz	altrosa
-	+	+	7	rot-violett	grün-gelb	blau-türkis
-	-	+	2	rot-violett	blau-schwarz	blau-türkis
non-O157	+	+	36	rot-violett	grün-gelb	blau-türkis

Die auf den chromogenen Nährmedien sowie auf SMAC und CT-SMAC gewachsenen *E. coli* O157-Kolonien agglutinierten alle mit Anti-*E. coli* O157-Serum bzw. mit dem *E. coli* O157-Latextest. In keinem Fall konnte das H7-Antigen mit H7-Latextest von diesen Kolonien bestimmt werden. Nach Überprüfung im U-Röhrchentest wurde von auf den obigen Nährmedien bestimmten 25 *E. coli* O157:H-Stämmen 18 als *E. coli* O157:H7 agglutiniert, sieben Stämme blieben O157:H-. Interessanterweise agglutinierten 15 der 18 *E. coli* O157:H7-Stämme mit dem H7-Latextest nach Wachstum auf Nähragar positiv. Das deutet auf durchgehend starke Hemmung der H7-Antigenproduktion durch die Nährmedienzusätze in den chromogenen Nährmedien wie auch in SMAC oder CT-SMAC hin. Bei einem *E. coli* O157:H7-Stamm konnte ein mit der »klassischen« Serologie identifiziertes H7-Antigen nach gleicher Kultivierung mit H7-Latextest nicht bestätigt werden.

Diskussion

Chromogene Nährmedien für *E. coli* O157 enthalten neben einer guten Nährstoffbasis (Peptone, Fleischextrakt, Hefeextrakt) chromogene Substrate für β -D-Galactosidase (s. z. B. Tab. 2), bei ei-

nigen zusätzlich für β -D-Glucuronidase und auch Kohlenhydrate. Als Hemmstoffe gegen die Begleitflora kommen Novobiocin und Tellurit zum Einsatz. Die genannten Enzyme spalten die angebotenen Enzymsubstrate, das freier werdende Chromophor färbt entsprechend seiner Struktur die wachsende Kolonie durch Präzipitation in der Kolonie, oft auch in der Umgebung derselben (Tab. 1). Säurebildung durch die Kohlenhydrate und damit Einstellung von pH-Optima führen zu unterschiedlich starker Spaltung der Enzymsubstrate, z. B. für β -D-Galactosidase. Gleichzeitig kann ein pH-Indikator durch Säurebildung die Nährmediensfarbe ändern und so die Intensität der

Koloniefarben, aber auch die Differenzierung unterstützen. Die Verwendung der β -D-Galactosidase-Substrate von *E. coli* ist auch vorteilhaft zur Abtrennung von β -D-Galactosidase negativen Bakterien, die dann im Gegensatz zu den gefärbten Kolonien hell durchsichtig oder in Nährbodenfarbe wachsen.

Zur Isolierung von *E. coli* O157 aus Stuhlproben wurde BCM[™] *E. coli* O157:H7 (+) culture medium während der Sentinelstudie 1997 angewandt [13]. Aus 3835 Stuhlproben wurden in 82 Fällen verdächtige blau-schwarze Kolonien entdeckt, von denen serologisch und durch weitere Prüfung sechs *E. coli* O157:H7 und drei *E. coli* O157:H-

Tabelle 2: Koloniefärbung auf chromogenen Nährmedien in Abhängigkeit von der chromatischen Hälfte des β -D-Galactosidase-Substrates

Chromatische Hälfte	Koloniefarbe
5-Bromo-4-chloro-3-indolyl	indigoblau
5-Bromo-6-chloro-3-indolyl-	magenta
5-Bromo-3-indolyl	dunkel-indigoblau
4-Chloro-3-indolyl-	blaugrün
6-Chloro-3-indolyl-	lachsfarben-rosa
N-Methyl-3-indolyl-	grün
o-Nitrophenyl-	gelb

Stämme bestätigt werden konnten. Grundsätzlich wurden die BCM-Platten hier aus einer EHEC-Anreicherungskultur beimpft. Frühere Untersuchungen anderer Autoren zeigten, daß ein Ausimpfen von Originalmaterial geringere Ausbeuten brachten. Jede Stuhlprobe wurde durch PCR und dann ELISA auf Shigatoxine untersucht. Diesen Ergebnissen war zu entnehmen, daß kein falsch negativer Befund (grün-gelbe *E. coli* O157-Kolonien) auf BCM auftrat. Der Anteil falsch positiver Befunde lag deutlich unter dem Anteil, den Wallace and Jones [14] für CHROM-agar® O157 mit 99 % bestimmten. Restaino and Jung (persönliche Mitteilung) fanden, daß auf BCM ein dreifach niedriger Anteil an falsch positiven Kolonien wuchs als auf SMAC-BCIG.

Chromogene Nährmedien sind geeignet, *E. coli* O157:H7/H⁻-Stämme mit den Eigenschaften β -D-Glucuronidase und Säuren aus Sorbitol negativ sicher und schnell zu erfassen [s. a. 15, 16]. Nur β -D-Glucuronidase positive Stämme werden vom BCM noch sicher angezeigt. Die durch die Chromophore gefärbten Kolonien sind besonders auf BCM und auch auf Rainbow® Agar O157 gut zu erkennen. Diese blau-schwarzen bzw. grau-schwarzen *E. coli* O157-Kolonien sind auch in Mischungen gut nachweisbar. Z. B. konnten nach Anreicherung in EHEC-Anreicherungsbouillon (heipha, Heidelberg) ca. zehn *E. coli* O157:H7-Kolonien, eingemischt in 1 g Stuhl, auf BCM sicher nachgewiesen werden.

Säuren aus Sorbitol-positiven und β -D-Glucuronidase-positiven *E. coli* O157:H7/H⁻-Stämmen sind auch auf den chromogenen Nährmedien von den

E. coli-non-O157-Stämmen nicht zu unterscheiden. Trotz der eindeutigen Vorteile, die in der Möglichkeit einer schnellen Isolierung der meisten *E. coli* O157:H7/H⁻-Stämme auf den chromogenen Nährmedien liegen, soll, auch aufgrund der ansteigenden Zahlen von Shigatoxine produzierenden *E. coli*-non-O157-Stämmen, auf die Notwendigkeit einer auf Shigatoxine gerichteten EHEC-Diagnostik (PCR, ELISA) hingewiesen werden.

Literatur:

- [1] Nataro, J. P., and Kaper, J. B.: Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin. Microbiol. Rev. 11 (1998) 142-201.
- [2] Thielman, N. M.: Enteric *Escherichia coli* infections. Current Opinion in Infect. Dis. 7 (1994) 582-591.
- [3] Aleksic, S., Bockemühl, J., and Karch, H.: A biotyping scheme for Shiga-like (Vero-)toxin producing *E. coli* O157 and a list of serological cross reactions between O157 and other gram negative bacteria. Zbl. Bakteriologie. 276 (1992) 221-230.
- [4] Beutin, L., Gleier, K., Zimmermann, S., and Geier, D.: Zur Identifizierung von Verotoxin-bildenden (VTEC) und enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC) auf Indikatornährböden. Klin. Lab. 40 (1994) 193-201.
- [5] Farmer III, J. J., and Davis, B. R.: H7 antiserum-sorbitol fermentation medium: a single tube screening medium for detecting *Escherichia coli* O157:H7 associated with hemorrhagic colitis. J. Clin. Microbiol. 22 (1985) 620-625.
- [6] Thompson, J. S., Hodge, D. S., and Borczyk, A. A.: Rapid biochemical test to identify verocytotoxin-positive strains of *Escherichia coli* serotype O157. J. Clin. Microbiol. 28 (1990) 2165-2168.
- [7] March, S. B., and Ratnam, S.: Sorbitol-MacConkey medium for detection of *Escherichia coli* O157:H7 associated with hemorrhagic colitis. J. Clin. Microbiol. 23 (1986) 869-872.
- [8] Okrend, A. J. G., Rose, B. C., and Lattuada, C. P.: Use of 5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl- β -D-glucuronide in MacConkey sorbitol to aid in the isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from ground beef. J. Food Prot. 53 (1990) 941-943.
- [9] Zadik, P. M., Chapman, P. A., and Siddons, C. A.: Use of tellurite for the selection of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157:H7. J. Med. Microbiol. 39 (1993) 155-158.
- [10] Chapman, P. A., Siddons, C. A., Zadik, P. M., and Jewes, L.: An improved selective medium for the isolation of *Escherichia coli* O157. J. Med. Microbiol. 35 (1991) 107-110.
- [11] Farmer III, J. J., Collin, S., Bishop, R., Ring, S., and Besserwick, J.: Microcomputer identification programs »Bactid« and »Strain Matcher«. May 1996 (Version 3), CDC Atlanta, Ga., USA.
- [12] Schmidt, E. F.: Die theoretischen und praktischen Grundlagen der Dyspepsiecoli-Untersuchungen für den Pädiater. In: Ocklitz, H. W., und Schmidt, E. F.: Die Bedeutung pathogener Colistämme (Dyspepsiecoli) für die akuten Durchfallerkrankungen des Säuglings. Stuttgart: Ferdinand Enke Verlag 1954, 87-106.
- [13] Prager, R., Reissbrodt, R., Holler, H., Gericke, B., Aleksic, S., Claus, H., Wagner, H., und Tschäpe, H.: Isolierung und Charakterisierung von Shigatoxin-produzierenden *E. coli*-Stämmen aus Stuhlproben: Ergebnisse einer Sentinel-Studie. Bundesgesundhbl. Sonderheft Oktober 1998, 6-13.
- [14] Wallace, J. S., and Jones, K.: The use of selective and differential agars in the isolation of *Escherichia coli* O157 from dairy herds. J. Appl. Bacteriol. 81 (1996) 663-668.
- [15] Bettelheim, K. A.: Studies of *Escherichia coli* cultured on Rainbow™ Agar O157 with particular reference to enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC). Microbiol. Immunol. 42 (1998) 265-269.
- [16] Restaino, L.: Accentuate the positive. Food Quality (USA), 68-70 (Nov./Dec. 1996).

Anschrift der Verfasser:

Dr. Rolf Reissbrodt, Ulrich Sachse und Prof. Dr. Helmut Tschäpe, Robert Koch-Institut, Bereich Wernigerode, Burgstr. 37, 38855 Wernigerode; Dr. Hartmut Steinrück, Robert Koch-Institut, Nordufer 20, 13353 Berlin; e-mail: reissbrodtr@rki.de