



How do you want
your burger?

Rare

Cool red center

Medium Rare

Warm red center

Medium

Warm pink center

Medium well

Warm with little pink

Well done

Warm with no pink



STEC – Herausforderung in Diagnostik und Bewertung

17.04.2024, BfR, Berlin

Dr. André Göhler & Dr. Elisabeth Schuh

FG Lebensmittelmikrobiologie, Erreger-Wirt Interaktionen

Abteilung Biologische Sicherheit

Agenda

1. Was sind STEC und wo kommen sie vor?
2. Wie werden sie nachgewiesen?
3. Herausforderungen in der Diagnostik
4. Risikobewertung von STEC
5. Herausforderungen in der Bewertung
6. Zusammenfassung und Ausblick

Was sind STEC und wo kommen sie vor?

Was sind STEC?

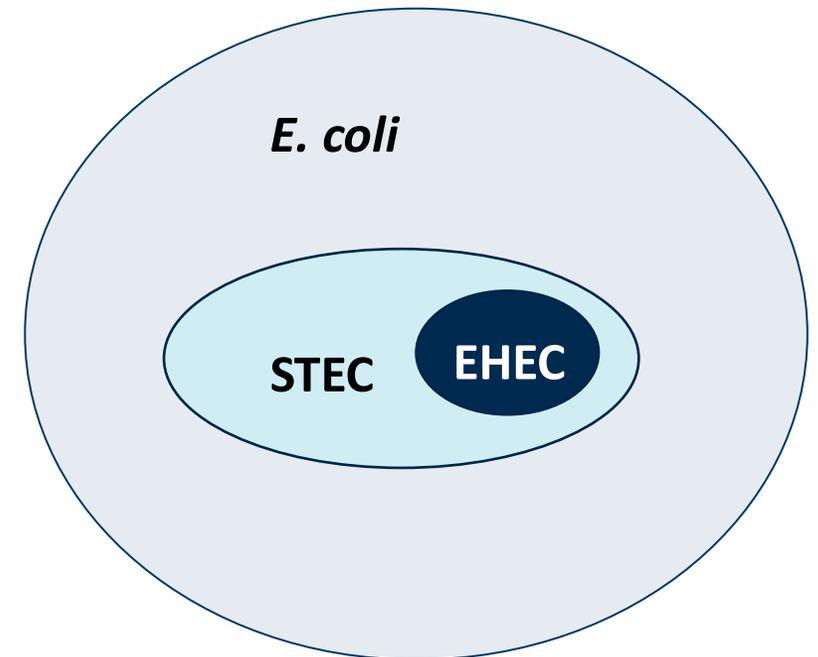
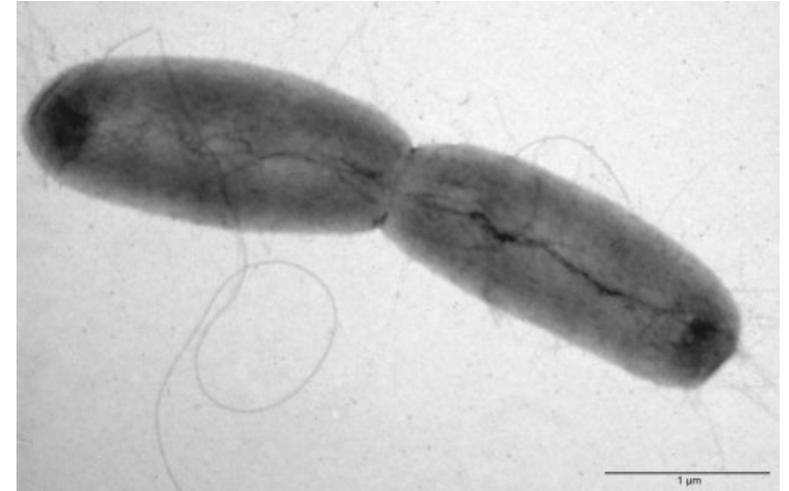
Shigatoxin-bildende *E. coli* (STEC): ehem. Verotoxin-bildende *E. coli* (VTEC)

Zoonoseerreger

Virulenzfaktor Shigatoxin (Stx)

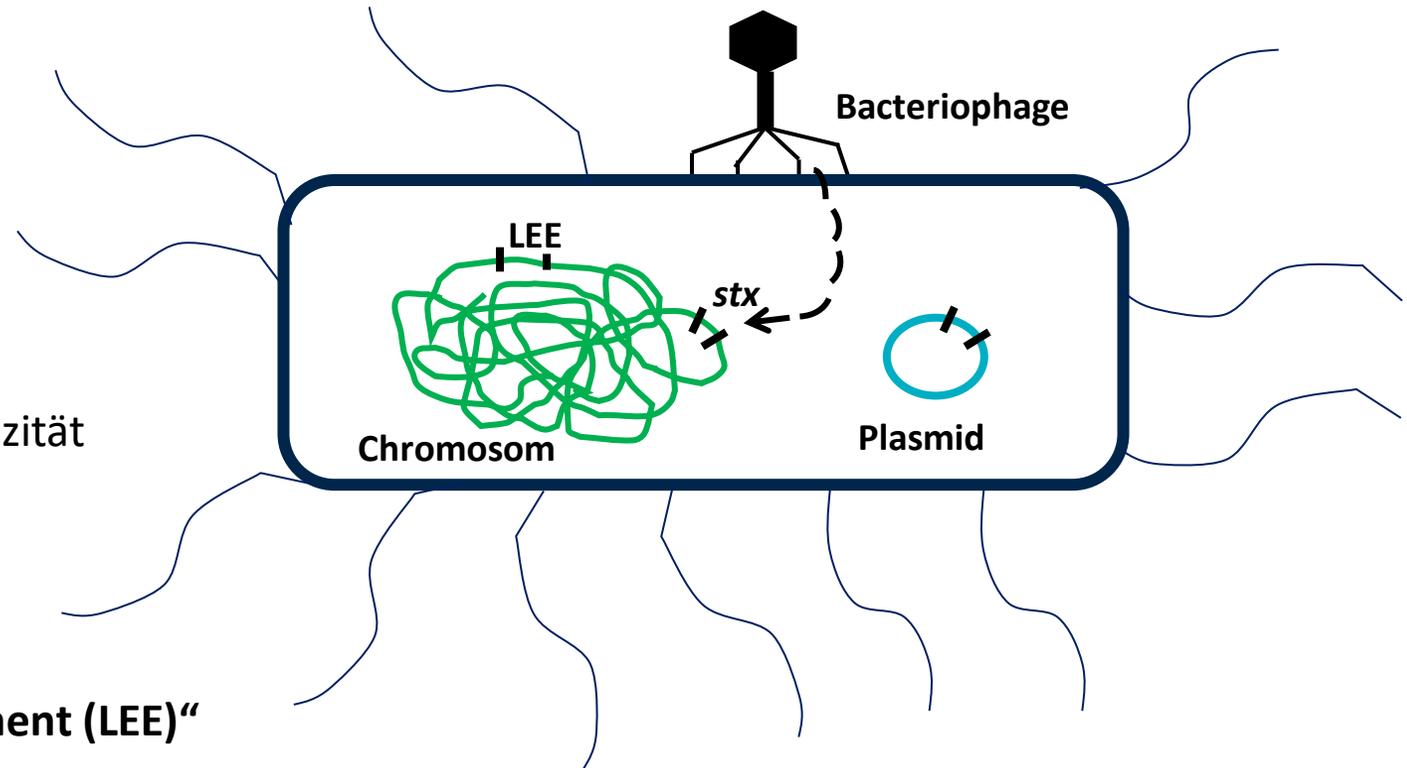
diverse Gruppe der *E. coli* mit über 500 beschriebenen Serotypen (z.B.: O157:H7)

- **Enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC) sind diejenigen STEC, die zu schweren Humanerkrankungen führen**



Das Shigatoxin (Stx)

- Toxin greift in die Proteinbiosynthese ein
- Nachweis über *stx*-Gene
- Zwei Varianten beschrieben: Stx1 und Stx2
- Mehrere Subtypen mit unterschiedlicher Toxizität
(*stx1a*, *c*, *d*, *e* und *stx2a – o*)



Pathogenitätsinsel „Locus of Enterocyte Effacement (LEE)“

- Anheftung ans Darmepithel und Zerstörung des Bürstensaums
- Molekularer Nachweis über *eae*-Gen

Infektionsverlauf und Symptome

Infektion fäkal-oral durch:

- kontaminierte Lebensmittel, Gewässer...
- Schmierinfektionen über Hände, Gegenstände...

Niedrige Infektionsdosis 10-100 KbE (bei O157:H7)

- Inkubationszeit 2-10 Tage, Durchschnitt 3-4 Tage
- Ansteckungsgefahr solange der Erreger nachweisbar ist

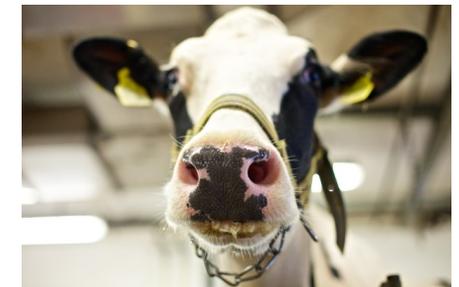
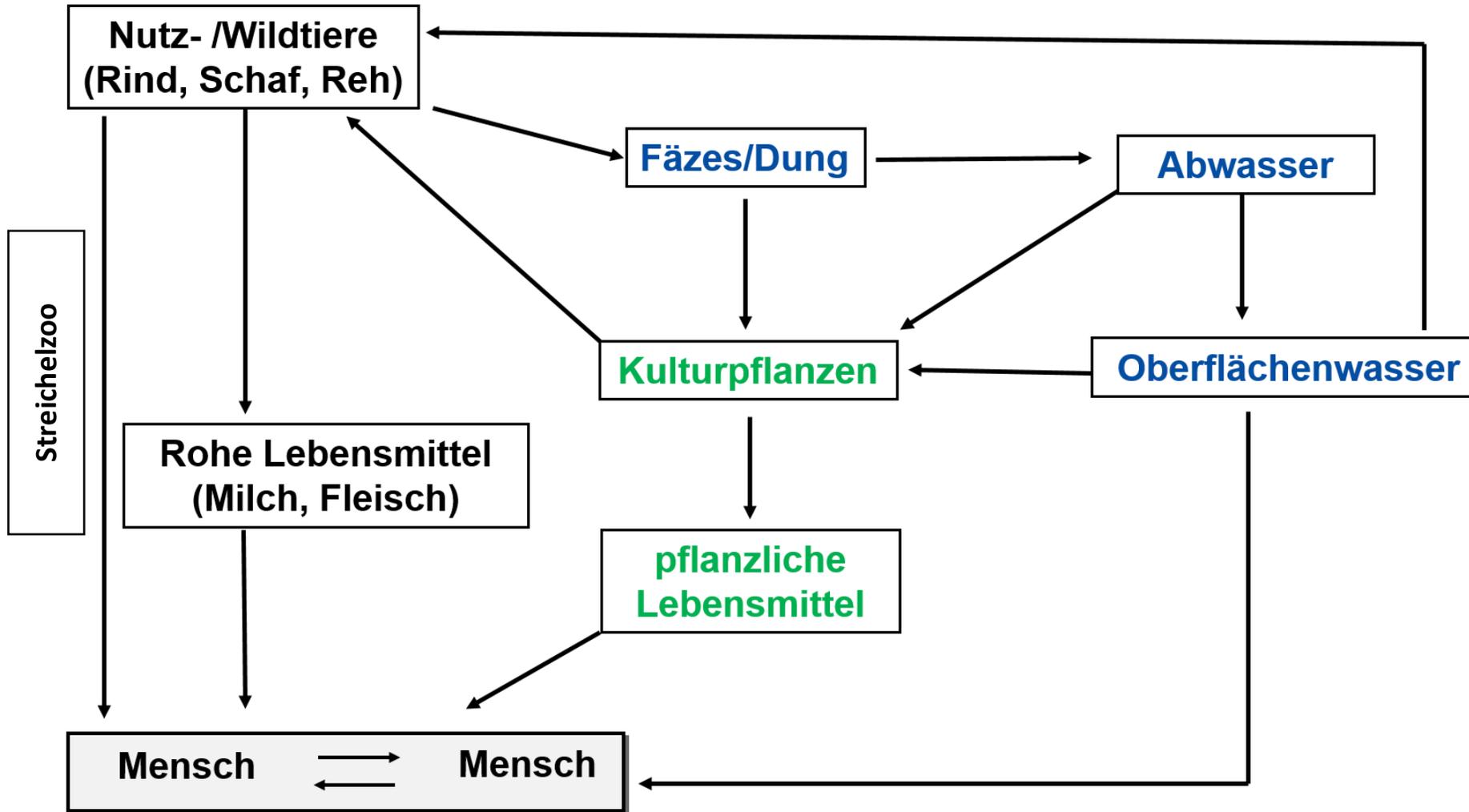
Wichtigste Symptome:

- Durchfall/ blutiger Durchfall
- Hämolytisch urämisches Syndrome (HUS) bis einschließlich Nierenversagen
- Neurologische Probleme

Zeitlicher Verlauf



Vorkommen und Übertragungswege

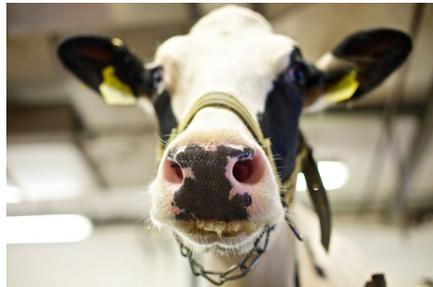


STEC - Prävalenzen in Tier und Lebensmittel (Zoonosemonitoring)



Rehkot
~ 40%

Rehfleisch
~ 16% - 30%



Mastkalb/Jungrind
Kot bzw. Dickdarm
~ 24 % – 43%

Rindfleisch
~ 1-6%

Tankmilch
~ 1-5%



Blatt- und
Kopfsalate
~ 1%



**Wie werden STEC
nachgewiesen?**

Nachweis von STEC- Ausgangssituation

- Geringe Konzentration auf der Matrix
- Matrix eigene Mikrobiota
- Isolation von STEC ist nötig

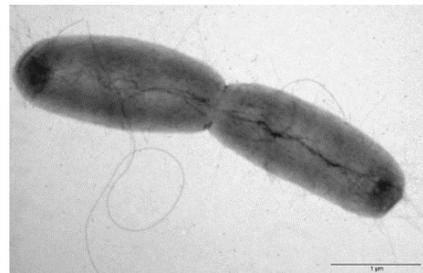
- Anreicherung nötig (ggf. Unterdrückung von Hintergrundmikrobiota)
- Sensitives Nachweisverfahren
- 2 stufiges Verfahren aus Nachweis und Isolierung

1-5

Infektionsdosis	Ursache
2-45 pP	Salami (Produktionsfehler)
1,1*10 ³ pP	Melone (KiTA)
75 pP / 80 pP	Badesee
1 /10g	Mettwurst
<1/100g	Mehl

1 mod. Nach Bülte 2014, 2 Paton et al 1996; 3 Teunis et al 2004, 4Tilden et al 1996 5Gill et al 2019

Nachweis von STEC- Ausgangssituation



TS/ISO13136:2012

prEN_ISO13136:2024

§64 LFGB L 25.00-6 Okt. 2017

Anreicherung



Selektion



**DNA-
Extraktion**



Detektion/Nachweis



Isolation

Anzucht von STEC &

Hemmung der Hintergrundmikrobiota
aus 25 g Matrix

Gen-Nachweis mittels Realtime PCR

Analyse von 50 Kolonien von
Selektivmedium



Herausforderungen in der Diagnostik

Geringe Konzentration auf der Matrix & Heterogene Verteilung

Anreicherung



Selektion



DNA-Extraktion



Detektion/Nachweis

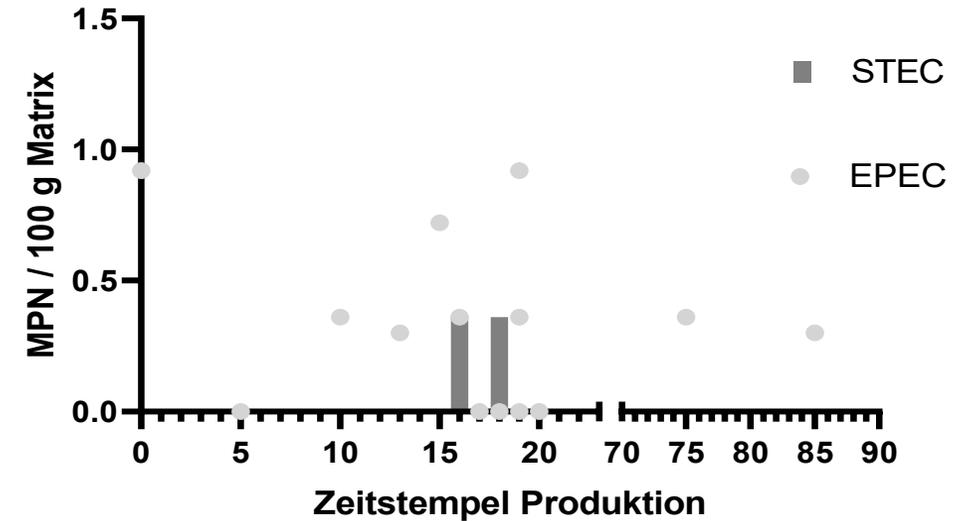


Isolation

- 100 g verbessert Positivitätsrate in LVU/RV gegenüber 25 g¹
- In „Ausbruchsmehl“ in Kanada 0,15-0,43 MPN / 100 g (Analyse von > 25 g)²
- 1,7 % von 347 Mehlen in Kanada 2018/2019 mit STEC (Analyse von 125 g)⁵



Untersuchung von mehr als 25 g ggf. nötig



Untersuchung einer Fertigteig-Charge
(N=22 Proben über 85 Minuten)

1 LVU 2023 STEC in Mehl 2 Gill et al 2019; 3 Mäde et al. 2017; 4 Boss et al. 2019; 5 Zhang et al 2020

Anzuchtbedingungen

Anreicherung



Selektion



DNA-
Extraktion

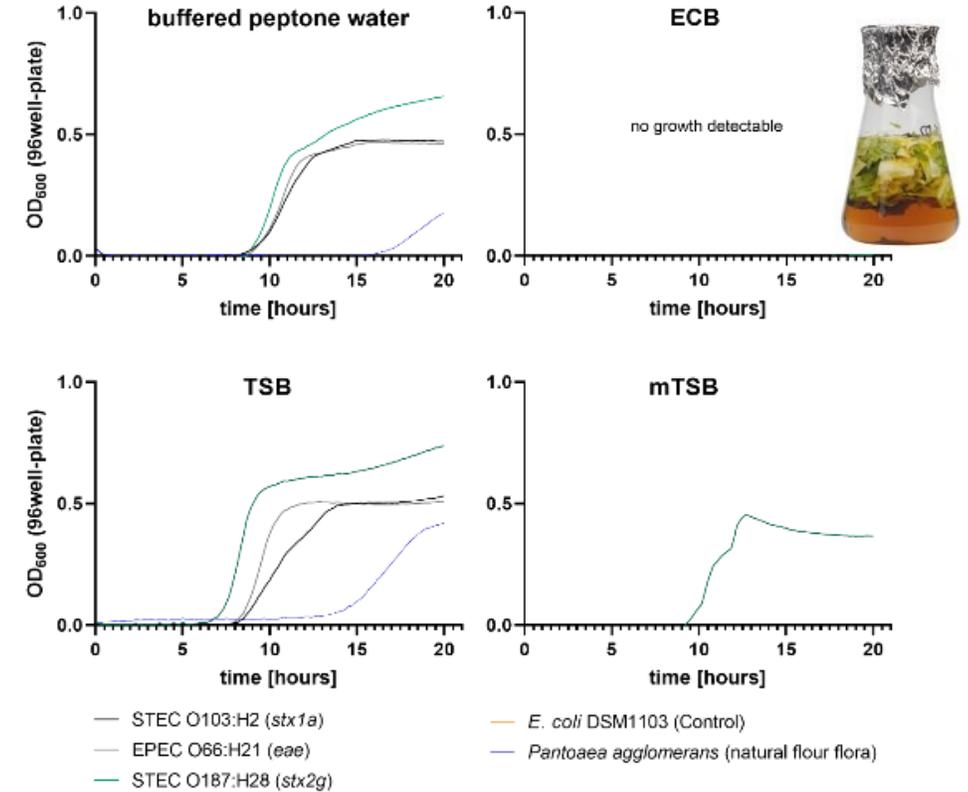
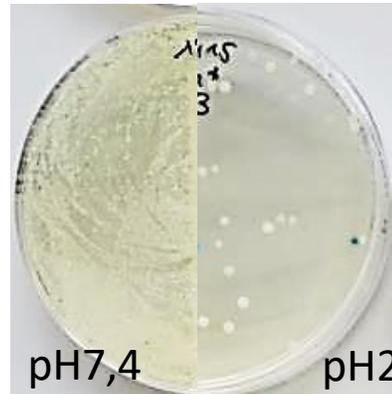


Detektion/Nachweis



Isolation

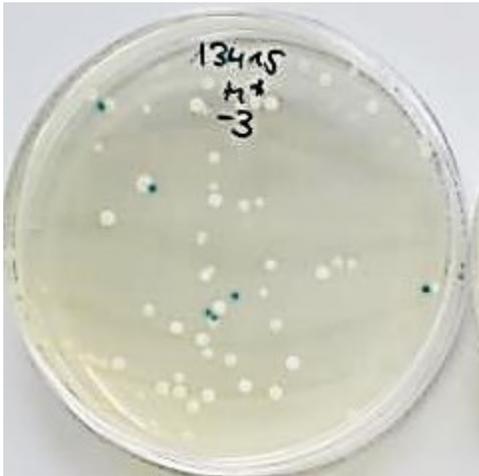
- Gallensalze und/oder Antibiotika sorgen für geringere Positivitäten^{1, 4}
- Selektion durch Temperatur (41,5°C) und/oder Selektivmedien in zweitem Schritt^{2, 3}
- Verwendung eines Säureschocks zur Reduktion der Hintergrundmikrobiota^{2, 3}



Aus 4

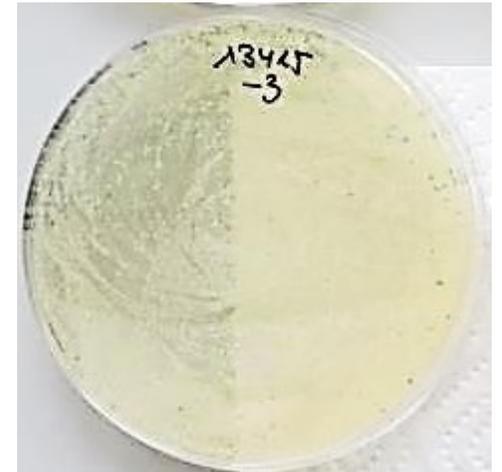
Isolation aus Anreicherung

Positiver molekularer Nachweis



Einzelkolonien Isolieren

- Potentielle STEC separieren
- Isolate Testen (PCR/Realtime PCR)



Es werden ~50 Einzelkolonien getestet



STEC-Isolat in Reinkultur

Isolation und Isolationserfolg

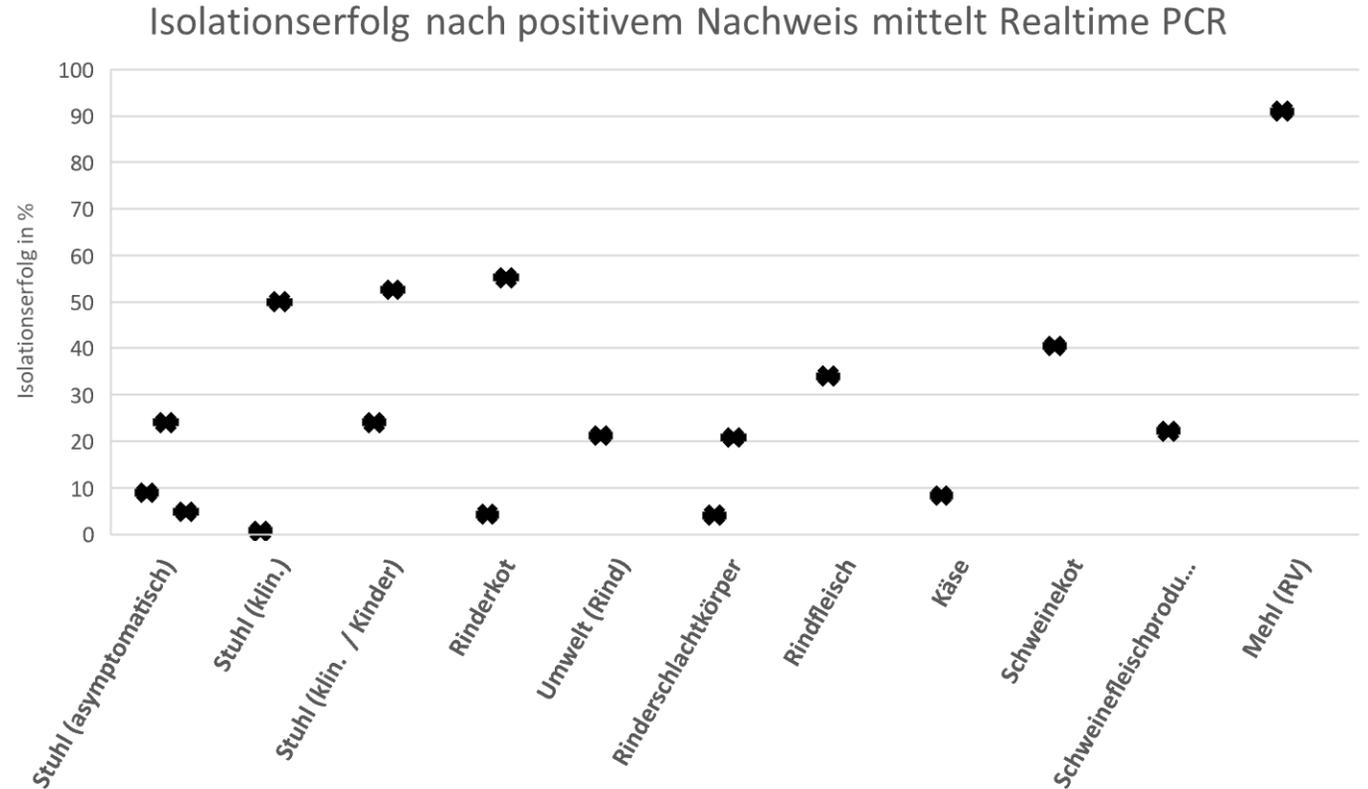
→ Isolationserfolg ist Matrix-abhängig

- Hintergrundmikrobiota
- Physiol. Zustand in der Probe

→ STEC-Physiologie beeinflusst Isolation

→ STEC-Anzahl beeinflusst Isolation

→ Probenvolumen beeinflusst Isolation



Mod. Nach Martinez-Castillo & Muniesa 2014

Mögliche Ergebnisse der STEC Diagnostik

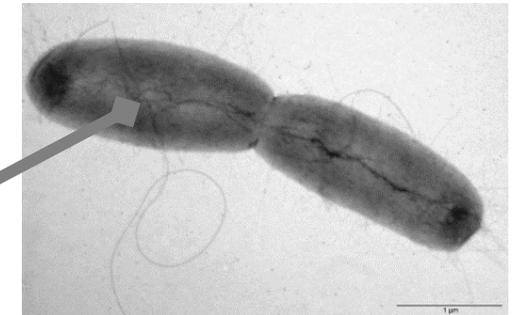
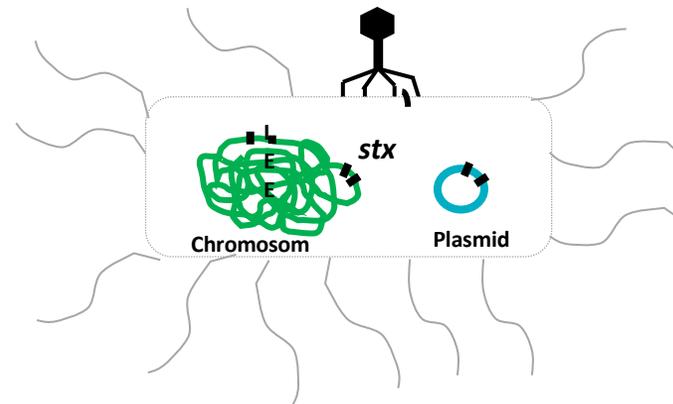
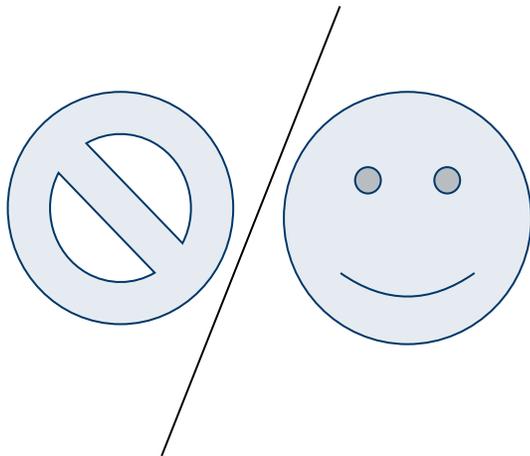


- Negative Probe
- kein Gennachweis
 - Keine Isolation

- stx*-Gen positive Probe
- nur Gennachweis
 - Keine Isolation

- STEC positive Probe
- *stx* Gennachweis
 - Isolation von *stx*-pos. *E. coli*

- STEC positive Probe
- kein Gennachweis
 - Isolation von *stx*-pos. *E. coli*



Risikobewertung von STEC

Risikobewertung

Nach Codex Alimentarius:

Gefahrenidentifizierung

(Hazard identification)

Gefahrencharakterisierung

(Hazard characterization)

Expositionsschätzung

(*Exposure assessment*)

Risikocharakterisierung

(Risk characterization)

Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in the EU, 2022

Human cases

Notification rate
(per 100,000 population) **2.1**

Trend
(2018-2022) 
↑ Increasing
↓ Decreasing
— Stable

7,117 Cases of illness

5,011 Infections acquired in the EU

525 Infections acquired outside the EU

1,581 Unknown travel status or unknown country of infection

1,130 Hospitalisations

28 Deaths

■ ECDC data

Foodborne outbreaks and related cases

71 Foodborne outbreaks

1 Strong-evidence outbreak ■

70 Weak-evidence outbreaks ■

408 Cases of illness

63 Hospitalisations

1 Death

Quelle: The European Union One Health Report EFSA/ECDC 2023

Gefahrenidentifizierung

Beispiel 1

Daycare STEC Outbreak Calgary Canada 2023 [1]

> 448 Infektionen, 39 Hospitalisierung, 23 HUS

Hackbraten mit STEC O157, *stx2a*, *eae*



https://cumming.ucalgary.ca/sites/default/files/styles/ucws_image_desktop/public/2024-01/Daycare_STEC_Outbreak_Label.jpg?itok=6FoDvkEE

Beispiel 2

Sprossenausbruch Deutschland 2011 [2]

> 3800 Infektionen, 855 HUS, 53 Verstorbene

Gekeimte Sprossensamen mit STEC/EAEC O104, *stx2a*, *aggR*



Beispiel 3

Mehl/Teig Ausbruch Kanada 2016 [3]

30 Infektionen, 8 Hospitalisierung, 1 HUS

Mehl mit STEC O121, *stx2a*, *eae*



[1] <https://www.cp24.com/news/how-could-this-happen-a-look-at-the-e-coli-outbreak-in-calgary-daycares-1.6706464>

[2] Buchholz et al. 2011

[3] Morton et al. 2017

Historie

- 1982 Ausbruch mit hämorrhagischer Kolitis durch O157:H7
(Hamburger disease)
- 1983 O157:H7 Stamm EDL933 produziert Verotoxin (O'Brien *et al.*)¹
- 1983 Verotoxin 1 vergleichbar mit Shigatoxin von *Shigella dysenteriae*
- 1983 Shigatoxin Ursache für HUS (Karmali *et al.*)¹
- 1987 EHEC= Stx + pO157 + A/E Läsionen
- 1995 Pathogenitätsinsel „Locus of Enterocyte Effacement“ (McDaniel *et al.*)
- 2011 Ausbruch EHEC/EAEC Serotyp O104:H4 -> Hybridstämme
- 2012 Einheitliche Shigatoxin-Nomenklatur (Scheutz *et al.*)
(stx1a, stx1c, stx1d, stx2a-stx2g)

O157

Shigatoxin

eae

aggR

**Non-O157
Top-7**

**stx-
Subtypen**

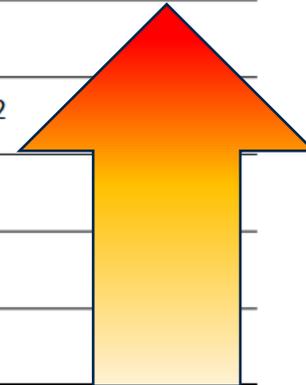
1 Kaper & O'Brien 2014

Gefahrencharakterisierung

Kategorisierung durch FAO/WHO Experten (2018)

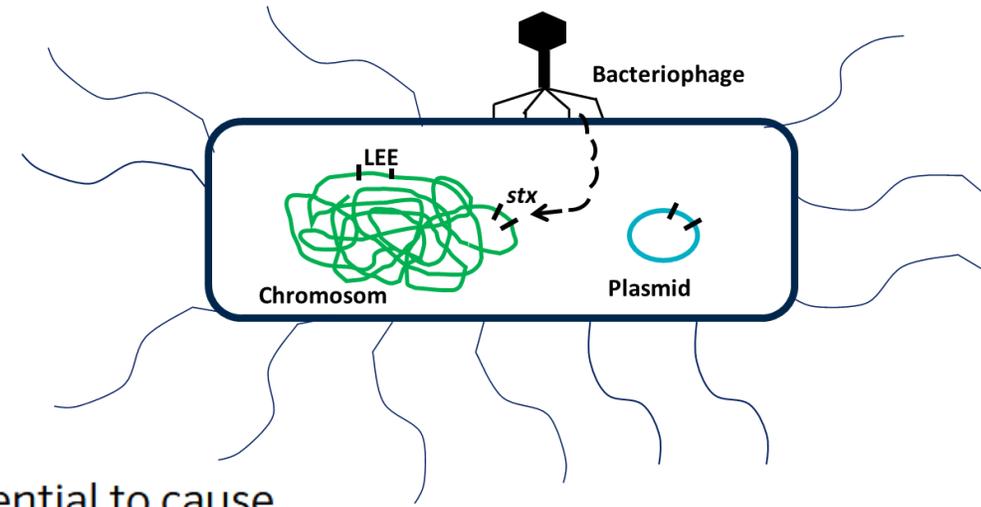
TABLE 5. Combinations of STEC virulence genes and the estimated potential to cause diarrhoea (D), bloody diarrhoea (BD) and haemolytic uraemic syndrome (HUS) ¹

Level	Trait (gene)	Potential for:
1	<i>stx</i> _{2a} + <i>eae</i> or <i>aggR</i>	D/BD/HUS
2	<i>stx</i> _{2d}	D/BD/HUS ²
3	<i>stx</i> _{2c} + <i>eae</i>	D/BD ³
4	<i>stx</i> _{1a} + <i>eae</i>	D/BD ³
5	Other <i>stx</i> subtypes	D [^]



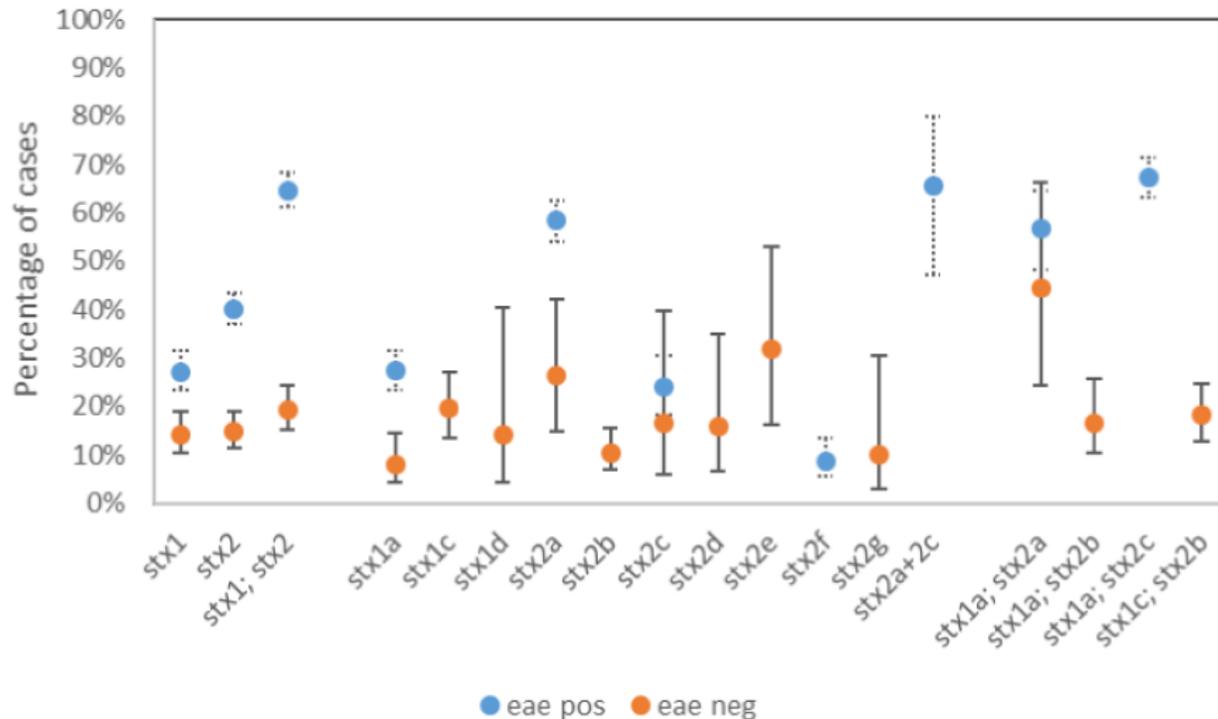
- NOTES: 1. depending on host susceptibility or other factors; e.g. antibiotic treatment
 2. association with HUS dependent on *stx*_{2d} variant and strain background.
 3. some subtypes have been reported to cause BD, and on rare occasions HUS

Quelle: FAO/WHO STEC expert group (2018). Report, Shiga toxin-producing Escherichia coli (STEC) and food: attribution, characterization, and monitoring

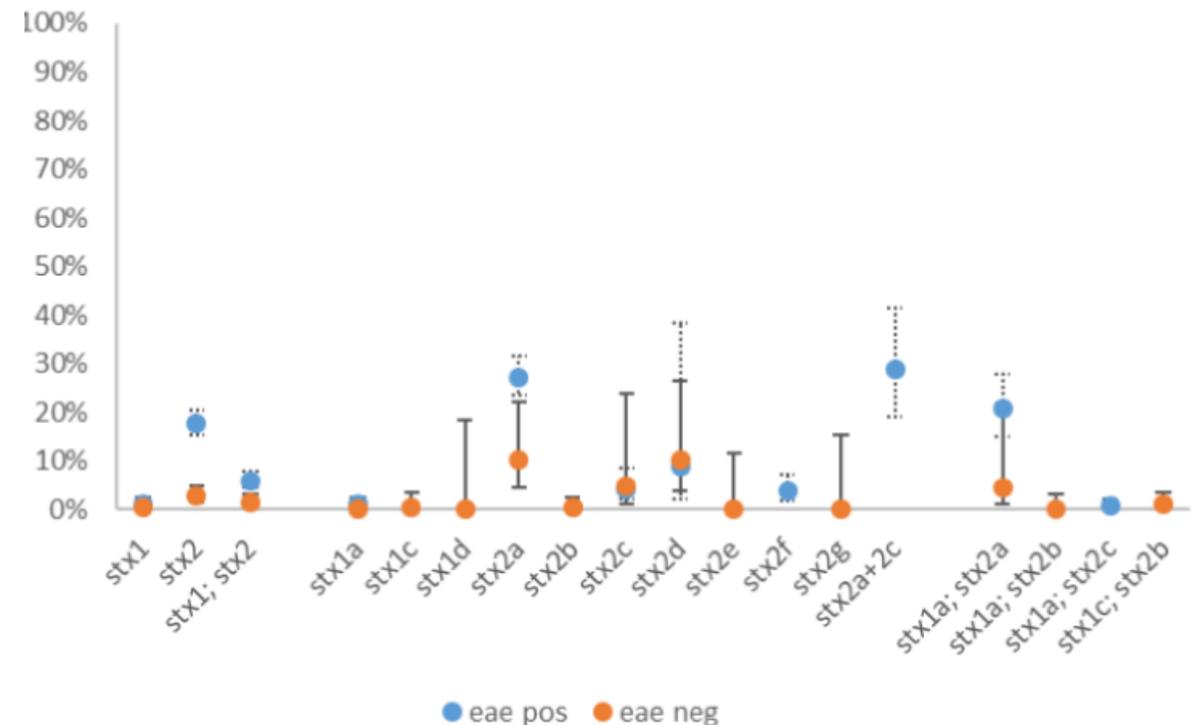


EFSA Report Pathogenicity assessment (EFSA BIOHAZ Panel, 2020)

Bloody diarrhoea



HUS



Verfügbare Daten zeigen, dass alle STEC humanpathogen sind und in der Lage mindestens Durchfall auszulösen. Sowie, dass alle STEC Subtypen mit einer schweren Erkrankung in Verbindung gebracht werden können. Die Serogruppe kann nicht zur Vorhersage der klinischen Symptome benutzt werden und die Anwesenheit des Intimin Gens (*eae*) ist nicht essentiell für eine schwere Erkrankung.

Expositionsschätzung

Zum Beispiel unter Berücksichtigung von:

- Prävalenzdaten Zoonose-Monitoring
- Verzehrdaten
- Verzehrsgewohnheiten /Ready to eat
- Angebotsformen
- Kontaminationsgrad /Infektionsdosis

Retrospektiv aus Ausbruchslbensmitteln

< 700 Bakterienzellen O157 in Rindfleischpattie [1]

Schätzungen

2,4 MPN/g O145 in Eiscreme bzw. 0,03 MPN/g O26 [2]

0.15 to 0.43 MPN/100 g O121 in Mehl [3]

How do you want
your burger?

Rare
Cool red center

Medium Rare
Warm red center

Medium
Warm pink center

Medium well
Warm with little pink

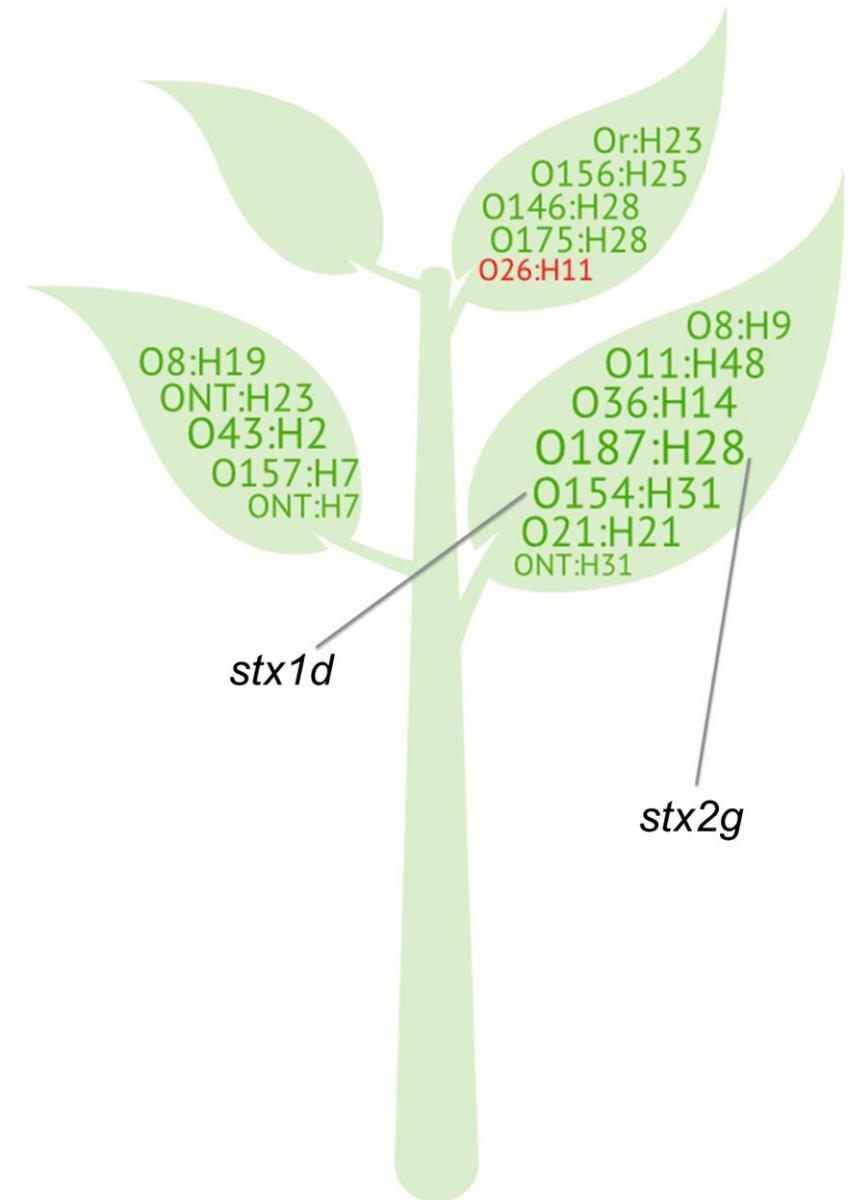
Well done
Warm with no pink

[1] Tuttle et al. 1999, [2] Buvens et al. 2011, [3] Gill et al. 2019

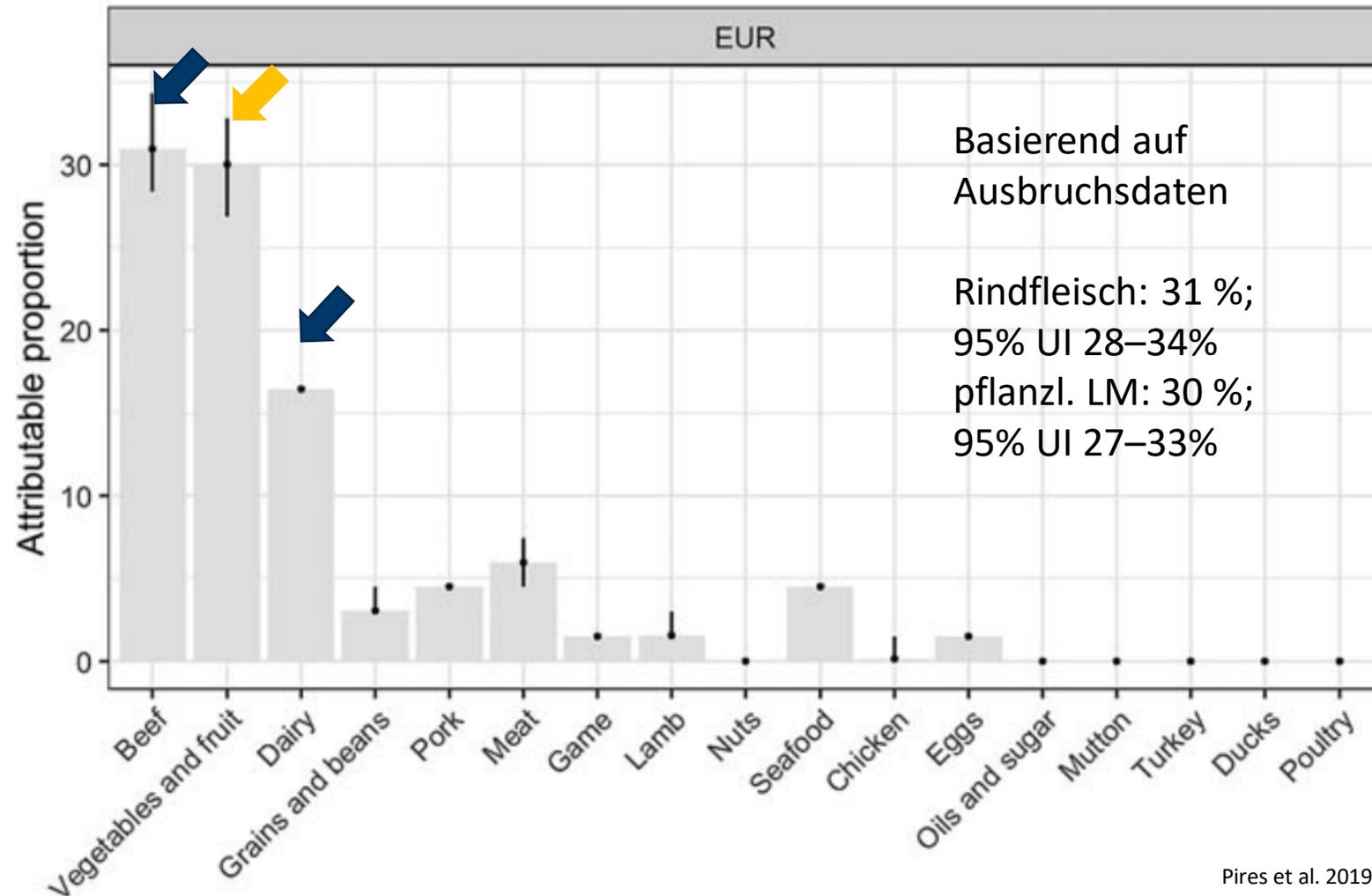
Prävalenzdaten STEC – Pflanzliche Lebensmittel

Zoonose-Monitoring Deutschland

- Mehl (2020) 9%
- **Blatt-/Kopfsalat** (2012) – Einzelhandel kein STEC nachgewiesen; Erzeugerebene (2012) 1,3%
- **Frischer Babyspinat** (2019) 1,2%
- **Tiefgefrorene Petersilie** (2019) 0,3%
- Sprossen, frische Erdbeeren, frische Kräuter, verpackte vorgeschnittene Blattsalate, Tomaten, unbehandelte Sesamsaaten
-> kein STEC



Assoziierte Lebensmittelmatrix der STEC Infektionen in Europa (1998-2017)



- STEC aus (frischen) pflanzlichen Lebensmitteln werden selten isoliert
 - aber häufig verantwortlich für Ausbrüche
- Mögliche Gründe:
Probennahme, Methoden, Verzehrform

Pires et al. 2019, *Epidemiology and Infection*

Risikocharakterisierung

- Erreger-Matrix Kombination
- Kategorisierung von Lebensmitteln in Bezug auf Infektionsrisiko mit STEC (Rohverzehr vs. Nicht-Rohverzehr)

Beispiel 1

Hackbraten mit STEC O157, *stx2a*, *eae*



Beispiel 2

Gekeimte Sprossensamen mit STEC/EAEC O104, *stx2a*, *aggR*



Beispiel 3

Mehl mit STEC O121, *stx2a*, *eae*



Herausforderungen in der Bewertung

Risikobewertung *E. coli* in Mehl

		BfR-Risikoprofil: [Escherichia coli in Mehl - Quellen, Risiken und Vorbeugung] (Stellungnahme Nr. 004/2020)				
A	Betroffen sind	Allgemeinbevölkerung kleine Kinder immungeschwächte Personen [1]				
B	Wahrscheinlichkeit einer gesundheitlichen Beeinträchtigung bei EHEC/STEC in Mehl	Praktisch ausgeschlossen	Unwahrscheinlich	Möglich [2]	Wahrscheinlich	Gesichert
C	Schwere der gesundheitlichen Beeinträchtigung bei EHEC/STEC in Mehl	Keine Beeinträchtigung	Leichte Beeinträchtigung [reversibel/irreversibel]	Mittelschwere Beeinträchtigung [reversibel/irreversibel]	Schwere Beeinträchtigung [irreversibel] [3]	
D	Aussagekraft der vorliegenden Daten	Hoch: Die wichtigsten Daten liegen vor und sind widerspruchsfrei		Mittel: Einige wichtige Daten fehlen oder sind widersprüchlich	Gering: Zahlreiche wichtige Daten fehlen oder sind widersprüchlich	
E	Kontrollierbarkeit durch Verbraucher	Kontrolle nicht notwendig	Kontrollierbar durch Vorsichtsmaßnahmen	Kontrollierbar durch Verzicht	Nicht kontrollierbar	

<https://mobil.bfr.bund.de/cm/343/escherichia-coli-in-mehl-quellen-risiken-und-vorbeugung.pdf>

Gefahrenidentifizierung / Gefahrencharakterisierung

Kritische Punkte / Methodische Herausforderungen

- Nachweis vs. Isolierung
- Neue *E. coli* Typen / Genomplastizität
- Matrix vs. Standardisierung/Normung

- Typisierungsdaten unvollständig/nicht vorhanden

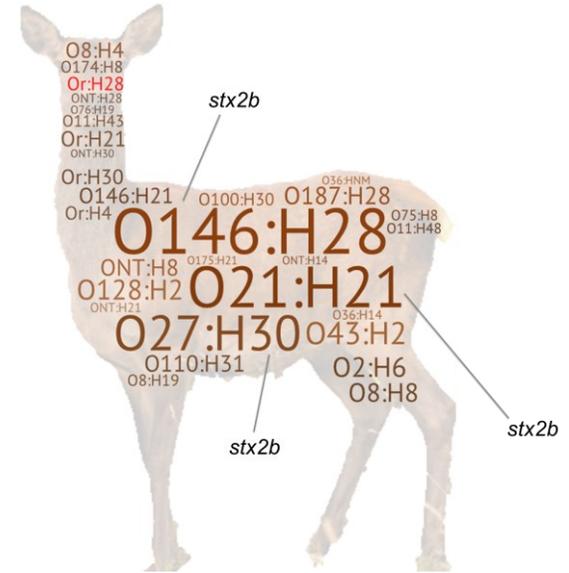
Beispiele:

Serogruppe berichtet für 47 % und *stx*-Subtypen für 27 % der humanen STEC; ähnlich für den Lebensmittelbereich (EFSA/ECDC Daten für 2022)

Unterschiede zwischen Lebensmittel- und Humanisolaten (Werber *et al.* 2008)

Human: O157, O103, O26, O91, O145, O111

Lebensmittel: ONT, O8, O91, O113, (O115, O174, O146)



Herausforderungen Exposition

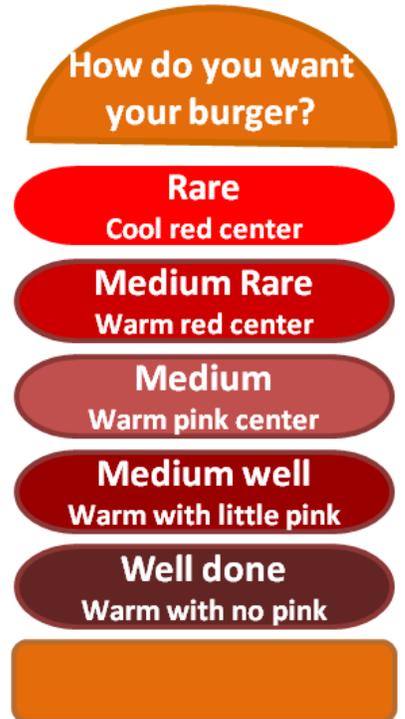
- Veränderte Essgewohnheiten und Angebote
- Geschätzt sind (nur) ca. die Hälfte aller STEC-Infektionen durch kontaminierte Lebensmittel verursacht (WHO/FAO 2018)

Lebensmitteln 60% > Tierkontakt (Wild- und Haustiere) 11% > Mensch zu Mensch 8% > Wasser 7% > Boden 3%

Roher Keksteig



Brian deWitt / Flickr.com



„RASFF-Meldung: Verotoxin-produzierende *Escherichia coli* in Bio-Weizengras-Tabletten aus Deutschland“

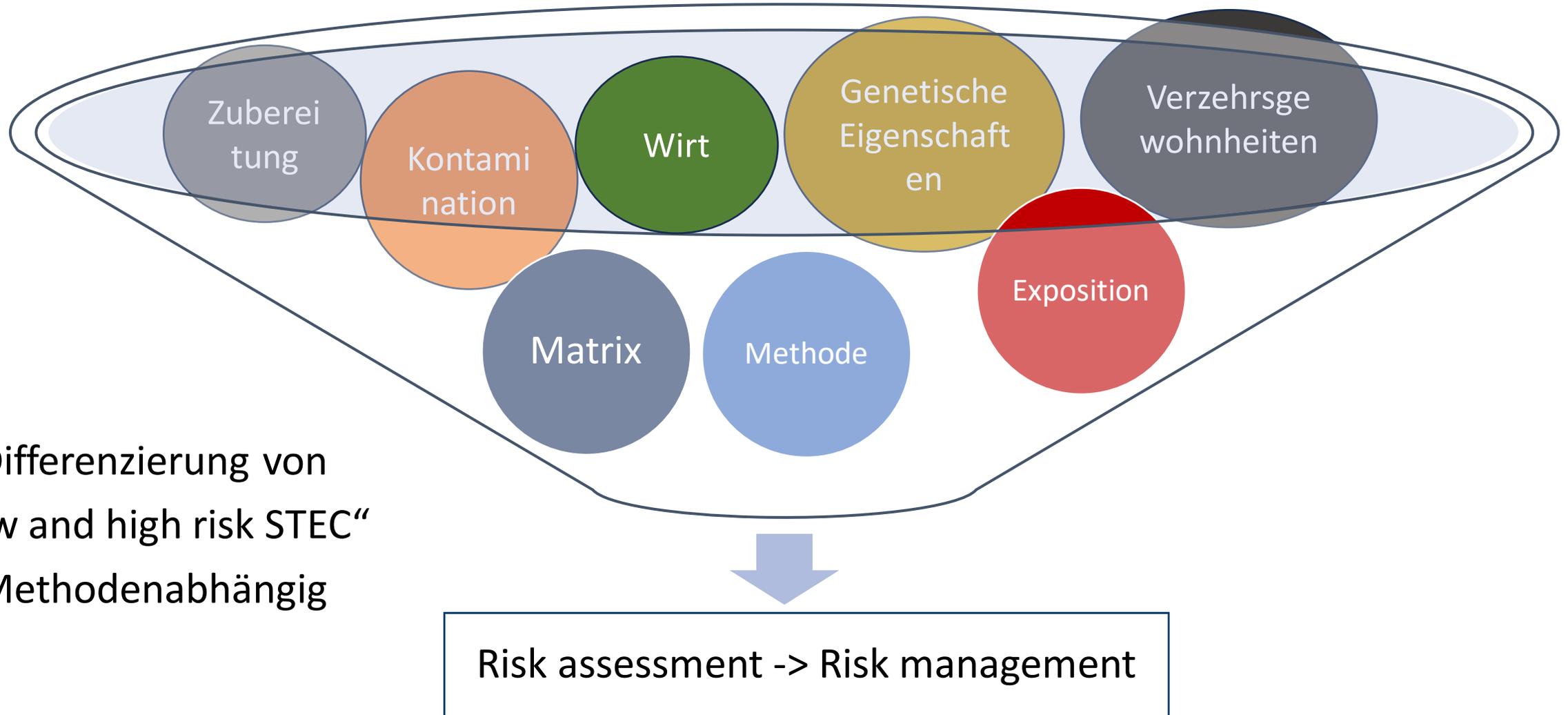
„RASFF-Meldung: Shigatoxin bildende *Escherichia coli* in Bio-Gerstengras-Tabletten aus Deutschland“



M. Großmann / pixelio.de

Zusammenfassung und Ausblick

Zusammenfassung Risikobewertung



- Differenzierung von „Low and high risk STEC“
- Methodenabhängig

Ausblick

Codex Alimentarius

Guidelines for the control of STEC in beef, raw milk and cheese produced from raw milk, leafy greens and sprouts (FAO/WHO in Arbeit)

European Commission (EC) “guidance document on the application of Article 14 of Regulation EC 178/2002 as regards food contaminated with STEC” Neuer Entwurf?

Integrierte/Sektorübergreifende genomische Surveillance

Danke

Kolleginnen und Kollegen aus
den Landesuntersuchungslaboren,
dem Nationalen Referenzlabor für *E. coli*
einschließlich verotoxinbildende *E. coli*,
den Fachgruppen des Bundesinstituts für
Risikobewertung



Und Ihnen für Ihre Aufmerksamkeit!

Quellen:

- Buchholz U, Bernard H, Werber D, Bohmer MM, Remschmidt C, Wilking H, Delere Y, an der HM, Adlhoch C, Dreesman J et al: German outbreak of Escherichia coli O104:H4 associated with sprouts. N Engl J Med 2011, 365(19):1763-1770
- Bülte and Goll (2014). Escherichia coli: Eigenschaften, Vorkommen und Präventionsmaßnahmen, Behr's Verlag DE.
- Buvens, Glenn, et al. "Virulence Profiling and Quantification of Verocytotoxin-Producing Escherichia Coli O145:H28 and O26:H11 Isolated during an Ice Cream-Related Hemolytic Uremic Syndrome Outbreak." *FOODBORNE PATHOGENS AND DISEASE*, vol. 8, no. 3, 2011, pp. 421–26, doi:10.1089/fpd.2010.0693.
- EFSA/ECDC. 2023. The European Union One Health 2022 Zoonoses Report. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2023.8442>
- FAO/WHO STEC expert group (2018). Report, Shiga toxin-producing Escherichia coli (STEC) and food: attribution, characterization, and monitoring. Microbiological Risk Assessment series 31. ISBN: 978-92-4-151427-9 <https://www.cp24.com/news/how-could-this-happen-a-look-at-the-e-coli-outbreak-in-calgary-daycares-1.6706464>
- Gill A, Carrillo C, Hadley M, Kenwell R, Chui L. Bacteriological analysis of wheat flour associated with an outbreak of Shiga toxin-producing Escherichia coli O121. Food Microbiol. 2019 Sep;82:474-481. doi: 10.1016/j.fm.2019.03.023. Epub 2019 Mar 22. PMID: 31027808.
- Martínez-Castillo A, Muniesa M. Implications of free Shiga toxin-converting bacteriophages occurring outside bacteria for the evolution and the detection of Shiga toxin-producing Escherichia coli. Front Cell Infect Microbiol. 2014 Apr 16;4:46. doi: 10.3389/fcimb.2014.00046.
- McDaniel TK, Jarvis KG, Donnenberg MS, Kaper JB: A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. Proc Natl Acad Sci U S A 1995, 92(5):1664-1668.
- Morton V, Cheng JM, Sharma D, Kearney A. An outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O121 infections associated with flour-Canada, 2016-2017[†]. Can Commun Dis Rep. 2017 Jul 6;43(7-8):154-155. doi: 10.14745/ccdr.v43i78a03.
- Kaper, J.B. and O'Brien, A.D. (2014) Overview and Historical Perspectives. *Microbiol Spectr* 2.
- Scheutz F, Teel LD, Beutin L, Pierard D, Buvens G, Karch H, Mellmann A, Caprioli A, Tozzoli R, Morabito S et al: Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping Shiga toxins and standardizing Stx nomenclature. J Clin Microbiol 2012, 50(9):2951-2963.
- Paton AW, Ratcliff RM, Doyle RM, Seymour-Murray J, Davos D, Lanser JA, Paton JC. Molecular microbiological investigation of an outbreak of hemolytic-uremic syndrome caused by dry fermented sausage contaminated with Shiga-like toxin-producing Escherichia coli. J Clin Microbiol. 1996 Jul;34(7):1622-7. doi: 10.1128/JCM.34.7.1622-1627.1996.
- Pires SM, Majowicz S, Gill A, Devleeschauwer B (2019). Global and regional source attribution of Shiga toxin-producing Escherichia coli infections using analysis of outbreak surveillance data. Epidemiology and Infection 147, e236, 1–9. <https://doi.org/10.1017/S095026881900116X>
- Teunis, P., Takumi, K., and Shinagawa, K. (2004). "Dose response for infection by Escherichia coli O157:H7 from outbreak data." Risk Anal 24(2): 401-407;
- Tilden J Jr, Young W, McNamara AM, Custer C, Boesel B, Lambert-Fair MA, Majkowski J, Vugia D, Werner SB, Hollingsworth J, Morris JG Jr. A new route of transmission for Escherichia coli: infection from dry fermented salami. Am J Public Health. 1996 Aug;86(8):1142-5. doi: 10.2105/ajph.86.8_pt_1.1142.
- Tuttle J, Gomez T, Doyle MP, Wells JG, Zhao T, Tauxe RV and Griffin PM, 1999. Lessons from a large outbreak of Escherichia coli O157:H7 infections: insights into the infectious dose and method of widespread contamination of hamburger patties. Epidemiology and Infection, 122, 185–192.

Dr. Elisabeth Schuh
Dr. André Göhler
VTEC@bfr.bund.de

Bundesinstitut für Risikobewertung
bfr.bund.de

BfR | Risiken erkennen –
Gesundheit schützen

Verbraucherschutz zum Mitnehmen

BfR2GO – das Wissenschaftsmagazin des BfR

bfr.bund.de/de/wissenschaftsmagazin_bfr2go.html

Folgen Sie uns

 @bfrde | @bfren | @Bf3R_centre

 @bfrde

 youtube.com/@bfr_bund

 social.bund.de/@bfr

 linkedin.com/company/bundesinstitut-f-r-risikobewertung

Beispiele für Verbesserungsmöglichkeiten

- Spezifisches Anreicherungsmedium für STEC
- High-throughput Methoden für genetischen Nachweis mit sicherem Nachweis, dass verschiedene Virulenzmarker in derselben Bakterienzelle sind
- Stabiler Nachweis direkt aus allen verschiedenen Lebensmittelmatrixen (Anreicherungen)
- Tiermodell oder andere Möglichkeiten für die Vorhersage des pathogenen Potentials
- Vorhersage der Shigatoxin-Produktion