

Alimentäre Intoxikationen durch Staphylokokken-Enterotoxine

Dr. Alexandra Fetsch

Nationales Referenzlabor für Koagulase positive Staphylokokken
einschl. *Staphylococcus aureus* (NRL-Staph)

Fachgruppe Mikrobielle Toxine

Abteilung Biologische Sicherheit

Inhalt – was erwartet Sie?

- I. Einleitung
- II. Rechtliche Vorgaben
- III. Methodische Aspekte
- IV. Ergebnisse
- V. Fazit

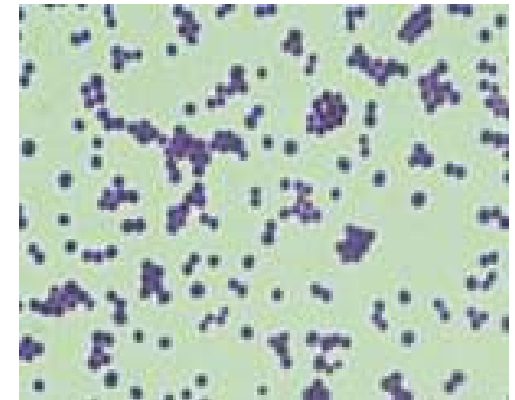


Staphylokokken

- **Gram-positive Kokken**
- **unbeweglich**
- **nicht sporenbildend**
- **fakultativ-anaerob**
- **natürlicherweise bei Mensch und Tier**
- **mehr als 30 Spezies**

Klinik

- **Mastitiserreger, Wundinfektionskeim**
- **Nosokomiale Infektionen im Krankenhaus**
- **problematisch: Antibiotikaresistenzen (MRSA)**



Koagulase positive Staphylokokken

- Staphylokokken mit größter pathogener Potenz
- Koagulase: als Pathogenitätsfaktor
- wichtigste Vertreter: *S. aureus* (*S. intermedius*, *S. hyicus*)

Lebensmittelhygienische Bedeutung

- Bildung von Staphylokokken-Enterotoxinen (SE)
- präformiert im Produkt
- Vermehrung auf Keimlevel log 5-6 KbE ist Voraussetzung

Staphylokokken-Intoxikation

- **Staphylokokken natürlicher Haut-/SH-Besiedler**
- **Lebensmittel oft sekundär kontaminiert**

Beteiligte Lebensmittel

- **Fleisch und -erzeugnisse (Hackfleisch)**
- **Milch und -erzeugnisse (Käse, v.a. aus Rohmilch)**
- **Salate, Cremes, feine Backwaren**

Präventionsmaßnahmen

- **Einhaltung von Hygieneregeln (Kontamination verhindern)**
- **Aufrechterhaltung d. Kühlkette**

Staphylokokken-Enterotoxine (SE)

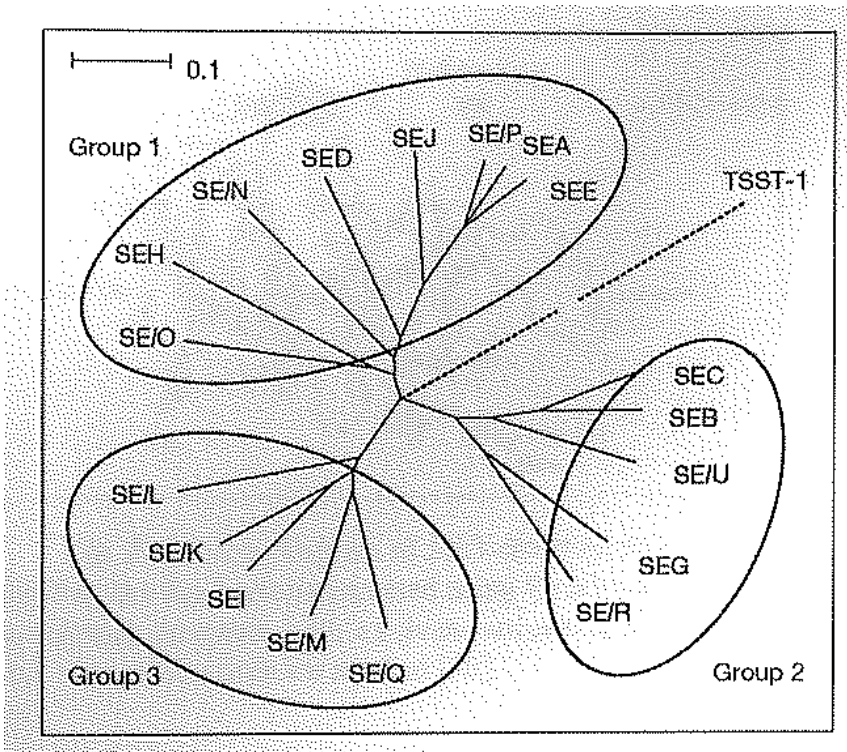
- 5 “klassische“ SE: SE**A**, SE**B**, SE**C**, SE**D**, SE**E**
- z.T. mit Untertypen (C1, C2, C3)
- emetische Aktivität bewiesen
- nach wie vor größte Bedeutung bei Intoxikationen

- neue Varianten wurden identifiziert
 - fortlaufende Bezeichnung nach Alphabet
 - SE**F** = TSST (Toxic Shock Syndrom-Toxin)
 - derzeit: mind. 20 versch. Typen
 - SE**G**-SE**U**
 - bei fehlendem Beweis d. emetischen Aktivität:
‘staphylococcal enterotoxin *like*‘ (SE**I**)

SE: Was ist das eigentlich genau?

- **Proteine (194 – 245 AS)**
- **Molekulargewicht: 24800 – 28500 Da**
- **löslich in Wasser u. NaCl**
- **ähnliche biochemische und strukturelle Eigenschaften**
- **ausgesprochen hitzestabil (Autoklavierung zur Inaktivierung nötig)**
- **resistent gegen proteolytische Enzyme**
 - **Aktivität bleibt nach Magen-Darm-Passage erhalten**
- **anhand Aminosäuresequenz werden 4 Gruppen unterschieden**

Phylogenetische Beziehungen zw. SE-Typen



Quelle: Thomas et al. 2007

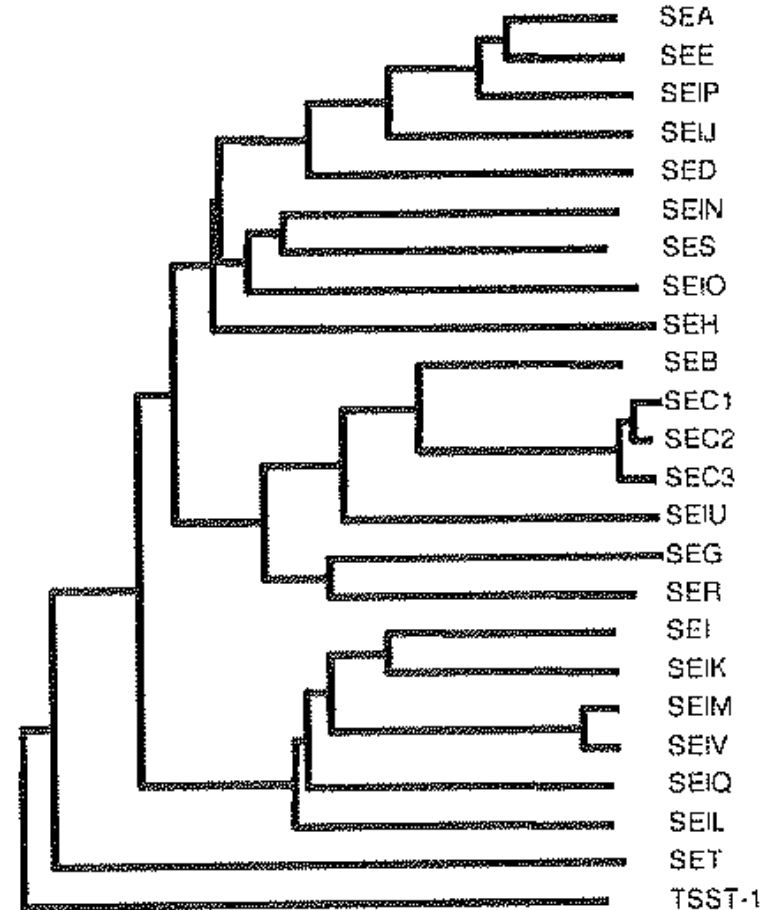
4 Gruppen:

TSST

Gruppe 1: A, D, E, H, J, N, O, P, S

Gruppe 2: B, C (1-3), G, R, U

Gruppe 3: I, K, L, M, Q, T, V

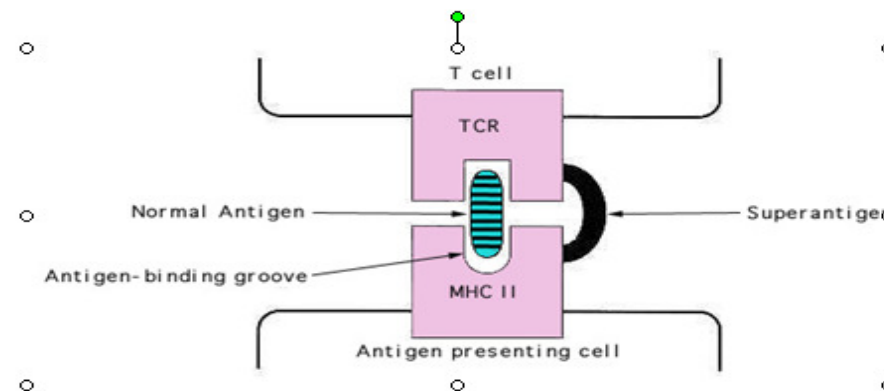


Quelle: Ono et al. 2008

Biologische Eigenschaften der SE

Superantigene (SAGs)

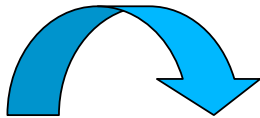
- Im Gegensatz zu konventionellen Antigenen einmalige Interaktion mit Immunsystem
 - binden direkt u. unprozessiert an MHC-II Moleküle von APCs



- massive Zellaktivierung durch SAGs führt zur Freisetzung hoher Mengen an Cytokinen durch T-Zellen u. Makrophagen (z.B. IL-1, TNF- α , - β , Interferon- γ)
 - Induktion von hohem Fieber

Emetische Aktivität

- **Nur wenig bekannt**
- **Bewertung erfolgt im Affenfütterungstest**
- **Direkter Effekt auf Nervus vagus und intestinale Epithelzellen wird vermutet**



Stimulation des Brechzentrums

**Symptome: nach wenigen min – max. 7 h
Erbrechen, Übelkeit, Durchfall, Kreislaufsymptome
i.d.R. 1-3 Tage Dauer, selbstlimitierend**

II. Rechtliche Vorgaben

Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 über
mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel

Prozesshygienekriterien

Lebensmittelsicherheitskriterien



Verordnung (EG) Nr. 2073/2005

I. Prozesshygienekriterien

Grenzwerte für Koagulase positive Staphylokokken

Erzeugnis	Grenzwerte	
	m [KbE/g]	M [KbE/g]
	n = 5 c = 2	
2.2.3 Käse aus Rohmilch	10⁴	10⁵
2.2.4 Käse aus wärmebehandelter Milch u. gereifter Käse aus Milch oder Molke, pasteurisiert od. höher wärmebehandelt	10²	10³
2.2.5 nicht gereifter Weichkäse (Frischkäse) aus Milch oder Molke, pasteurisiert oder höher wärmebehandelt	10¹	10²
2.2.7 Milch- und Molkepulver	10¹	10²
2.4.1 Erzeugnisse von gekochten Krebs- und Weichtieren ohne Panzer bzw. Schale	10²	10³

Verordnung (EG) Nr. 2073/2005

I. Prozesshygienekriterien

Referenzverfahren:

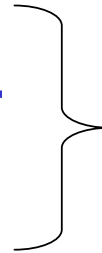
EN/ISO 68888-1 oder -2

Stufe für die das Kriterium gilt:

Ende d. Herstellung

2.2.3: Käse aus Rohmilch

2.2.4: Käse aus wärmebehandelter
Milch u. gereifter Käse aus Milch
oder Molke, pasteurisiert od.
höher wärmebehandelt



Zeitpunkt des höchsten
Staph.-Gehalts

Maßnahmen im Fall unbe-
friedigender Ergebnisse:

Hygiene/Rohstoffauswahl verbessern
bei $>10^5$ KbE/g: SE-Untersuchung

II. Lebensmittelsicherheitskriterien

1.21 Käse, Milch- und Molkepulver gemäß den Kriterien für Koagulase-positive Staphylokokken in Kapitel 2.2 des Anhangs

n	= 5
c	= 0
Grenzwert für SE:	Abwesenheit in 25 g
Referenzverfahren:	Europäisches Screening des CRL
Stufe für die das Kriterium gilt:	in Verkehr gebrachte Erzeugnisse während der Haltbarkeitsdauer



III. Methodische Aspekte

Methoden zur Quantifizierung d. Erregers

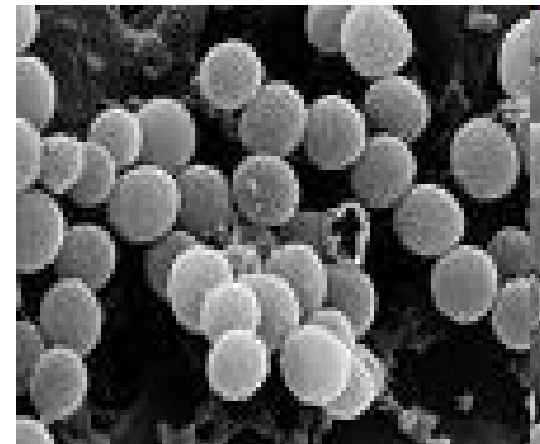
Methoden zur Typisierung d. Erregers

Methoden zum Toxinnachweis (qualitativ/quantitativ)

immunologisch
molekularbiologisch

Screening Verfahren des CRL

Dialytische Aufkonzentrierung
Transia Plate
Vidas SET2



Methoden zur Erregerquantifizierung

Klassische mikrobiologische Verfahren zum Nachweis von Staphylokokken in Lebensmitteln:

Amtliche Methoden nach § 64 LFGB:

- L 00.00.55 = EN/ISO 68888-1

Zählverfahren mit Baird Parker Agar

Bestätigungsreaktion: Röhrchen-Koagulase-Test

- L 00.00.56 = EN/ISO 68888-2

Zählverfahren mit Kaninchenplasma-Fibrinogen-Agar

EN/ISO 68888-1



Study of an alternative to the confirmation step of the Standard EN ISO 6888-1 for enumeration of coagulase-positive staphylococci (BP agar)

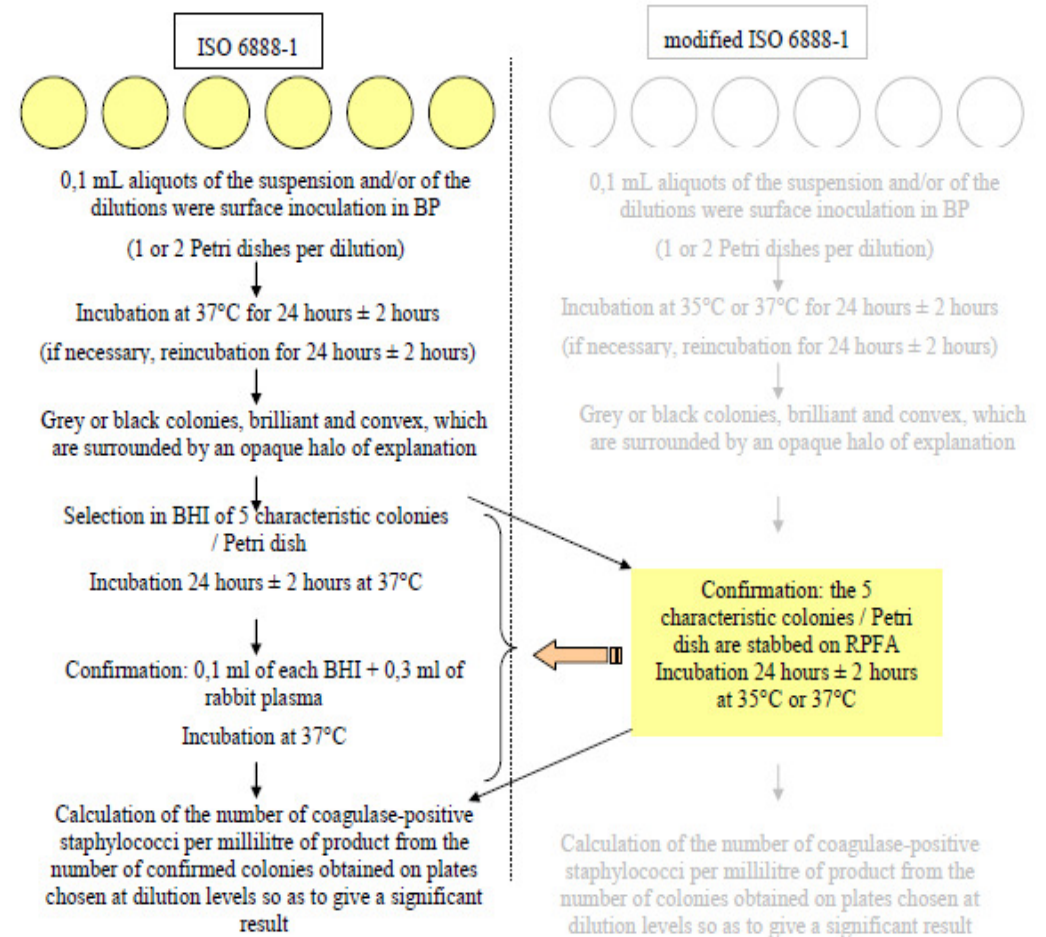
April 2007–June 2008

Report version 1 – 23 April 2009

➤ **Alternativer Bestätigungsschritt möglich**

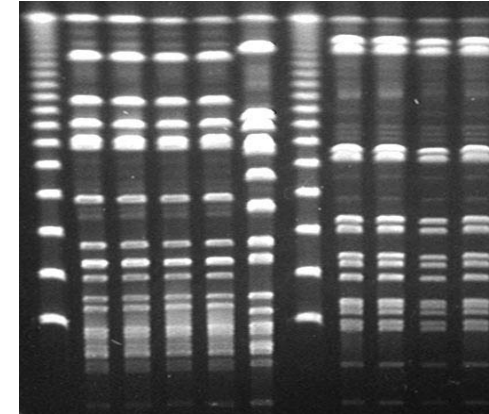
II. METHODS

See the following diagram.

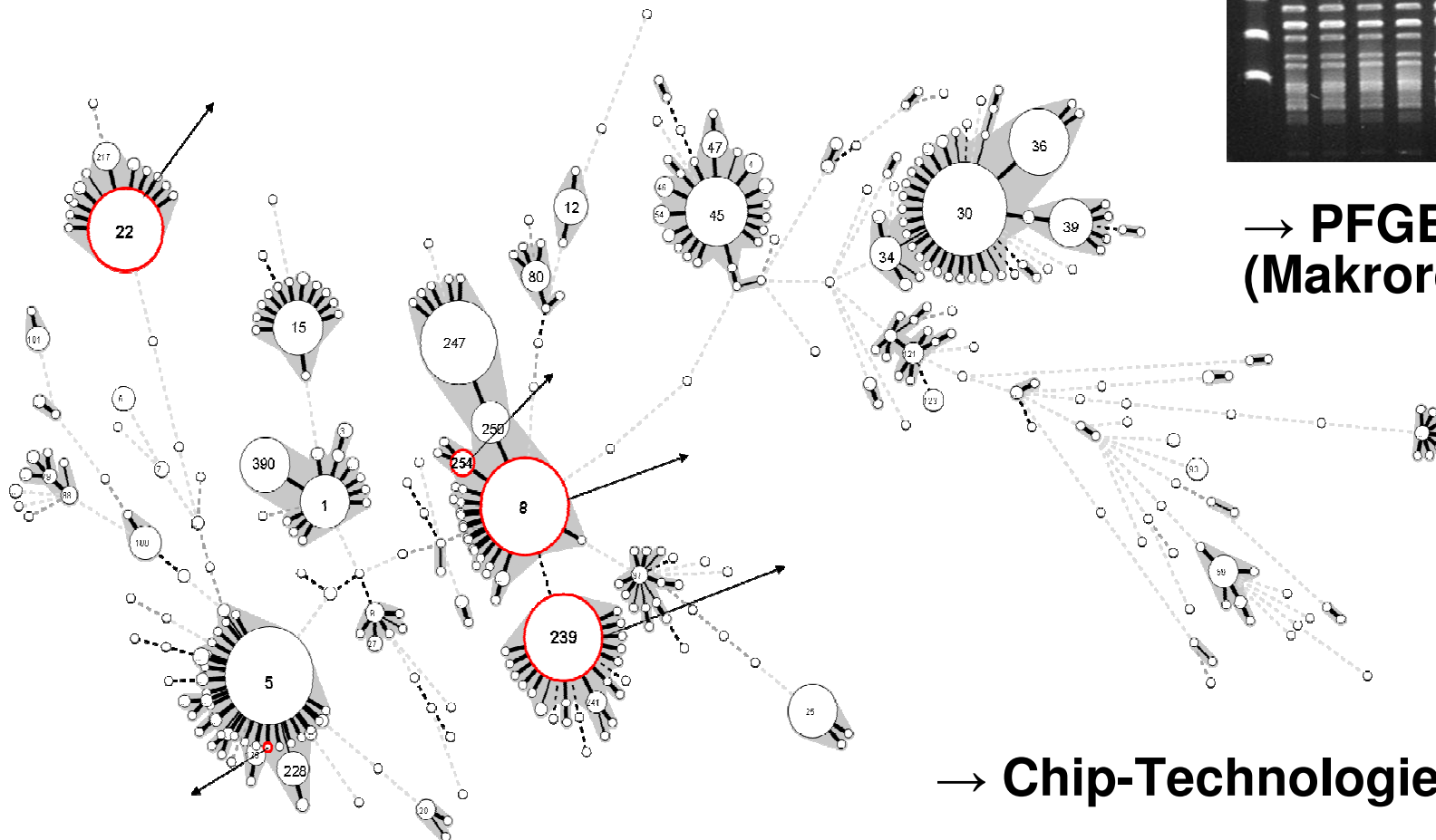


Methoden zur Typisierung des Erregers

- *spa* typing
- MLST typing



→ PFGE
(Makrorestriktion)



→ Chip-Technologie

Methoden zur Detektion von SE

Immunologisch

- Enzym-linked immunosorbent Assays (ELISA), i.d.R. als Sandwich
- kommerzielle Testkits zum Screening
- Einsatz mono-/polyklonaler Antikörper für Quantifizierung (CRL)

Molekularbiologisch

- Detektion v. für SE / SE-codierenden Genen (PCR, single/multiplex)
 - chromosomal, Prophagen- oder Plasmid-codiert
 - oft mehrere Gene, auch Gencluster (*egc*)
 - Nachteil: kein Beweis über Expressierung im Lebensmittel
- Immuno-q-PCR

Screening Verfahren des CRL



EU COMMUNITY REFERENCE
LABORATORY FOR
COAGULASE POSITIVE
STAPHYLOCOCCI



Site de
Maisons-Alfort

LABORATOIRE D'ÉTUDES
ET DE RECHERCHES SUR
LA QUALITÉ ALIMENTAIRE
ET SUR LES PROCÉDÉS
AGROALIMENTAIRES

Detection of staphylococcal enterotoxins types SEA to SEE
in milk & milk products and other food matrices

European screening method of the CRL
"COAGULASE POSITIVE STAPHYLOCOCCI,
INCLUDING *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*"

Version 3, September 2009

Kommerzielle Testkits:

1. Transia Plate SE
2. VIDAS SET2

Generelles Prinzip:

In Abhängigkeit vom Kit 2- oder 3-phasiges Verfahren:

1. Extraktion/Konzentration
2. Vorbehandlung mit Kaninchen IgG **nur bei Transia Plate SE**
3. Immuno-enzymatische Detektion

Screening Verfahren des CRL

1. Schritt = Extraktion / Konzentration:

- 25 g Probenmaterial (+ 40 ml Aqua dest., 38⁰C)
- mischen, homogenisieren
- pH 3,5 einstellen, zentrifugieren
- Überstand neutralisieren (pH 7,3), 2. x zentrifugieren

Dialyse:

- Membran vorbereiten, mit Aqua dest. spülen
- Überstand einfüllen, verschließen
- Inkubation über Nacht in 30% PEG-Lösung, 5⁰C
- Resuspension d. konzentrierten Extrakts mit 5 ml PBS (pH 7,3)

Screening Verfahren des CRL

1. Screening-Verfahren: TRANSIA Plate SE

- **Sandwich-ELISA auf Mikrotiterplatte**
- **SE-Typen: A, B, C1, C2, C3, D, E**
- **Testdauer: < 2 h (ohne Vorbereitung)**
- **Nachweisgrenze (laut Hersteller): 0,25 ng/g**
- **keine Differenzierung verschiedener Enterotoxine**
- **Vorbehandlung mit Kaninchen IgG nötig**
 - **soll falsch positive Reaktionsergebnisse (aufgrund von Kreuzreaktionen mit Prot. A) verhindern**
- **validiert für Milch u. -produkte u. andere Lebensmittel-Matrices**



Screening Verfahren des CRL

2. Screening-Verfahren: VIDAS SET 2 Staphylokokken Enterotoxin

- vollautomatischer Enzyme-linked fluorescent immunoassay (ELFA)
- SE-Typen: A, B, C1, C2, C3, D, E
- Testdauer: ca. 80 min (ohne Vorbereitung)
- Nachweisgrenze (laut Hersteller): 0,05-0,5 ng/g
- keine Differenzierung verschiedener Enterotoxine
- **nur für Milch u. Milchprodukte validiert**



Aktuelle Infos aus dem CRL März 2010

- **Probleme mit Transia Test Kit**
- **falsch positive und falsch negative Ergebnisse (unbefriedigende Selektivität und Sensitivität)**
- **PT trial für NRLs wird verschoben**
- **Hersteller BioControlSystems und CRL arbeiten an d. Problem**
- **Informationsschreiben des NRL-Staph an Labore d. Länder v. 25.03.10**
- **vorübergehende Empfehlung zur Vorgehensweise**
 - **bei offiziellen Kontrollen**
 - **im Falle eines Ausbruchsverdachts**



Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) • Postfach 33 00 13 • D - 14191 Berlin
Nur per Email
an die Landesuntersuchungseinrichtungen

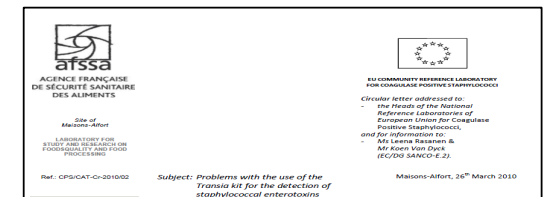
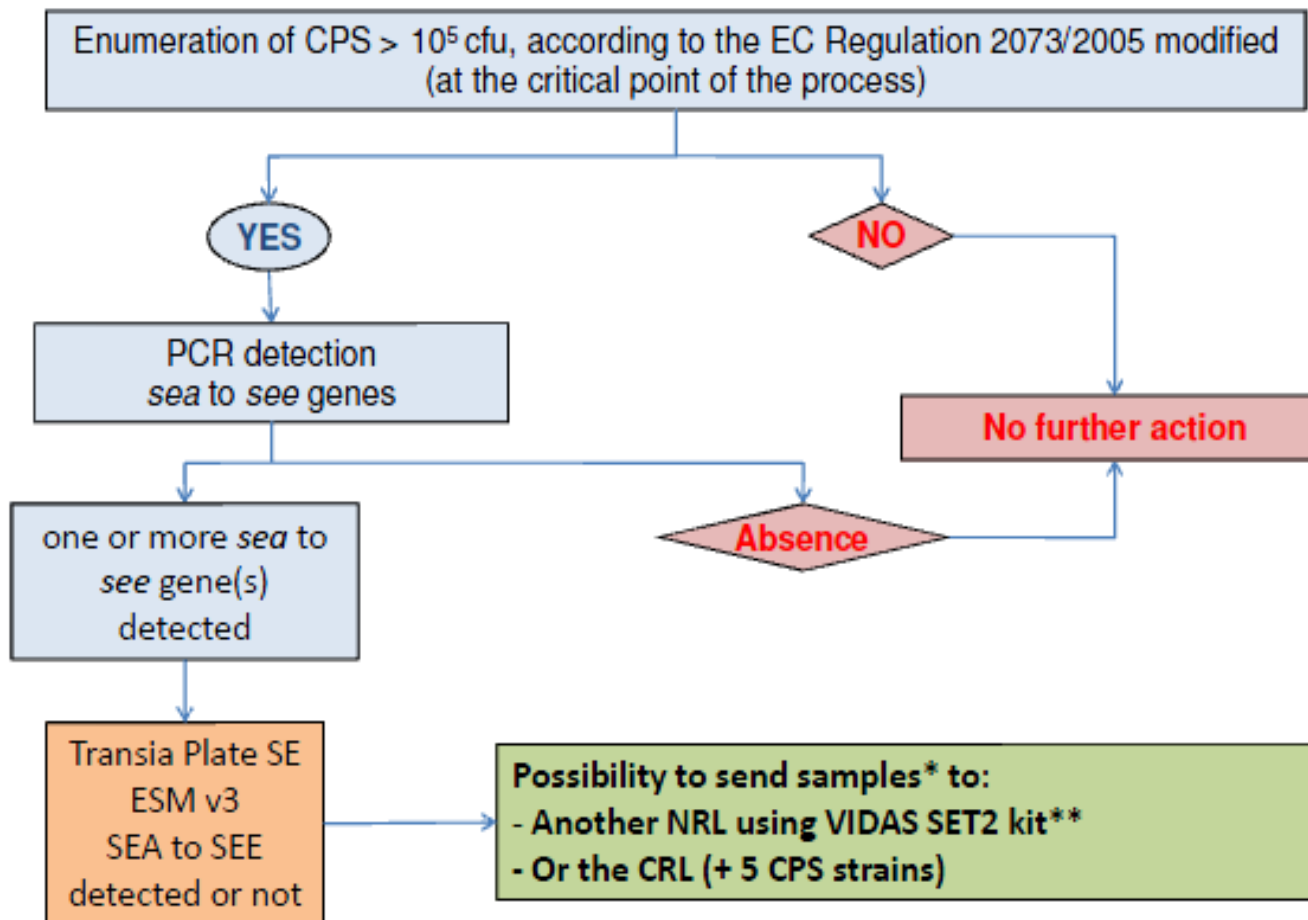
Bundesinstitut für Risikobewertung
Postfach 33 00 13
D - 14191 Berlin
Tel. +49 - (0) 30 - 184 12 - 0
Fax +49 - (0) 30 - 184 12 - 47 41
mailto:info@bfr.bund.de
www.bfr.bund.de

Ihre Zeichen und Nachrichten vom	Gesch. Z.: Bitte bei Anwalt angeben	Tele-Durchwahl/Fax	Datum	Org. Einheits-/Ansprechpartner
	41-3410-00-5579882	030/1 84 12 - 2013/2174	25.03.2010	Drea. Annette Johna / Alexandra Fetsch

Information aus dem gemeinsamen Referenzlabor für Staphylokokken

Vorgehensweise bei offiziellen Kontrollen

Diagram 1: official controls

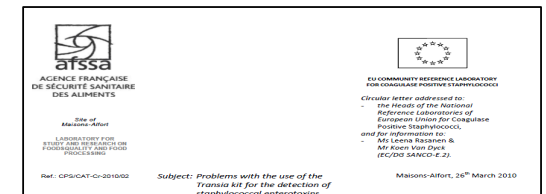
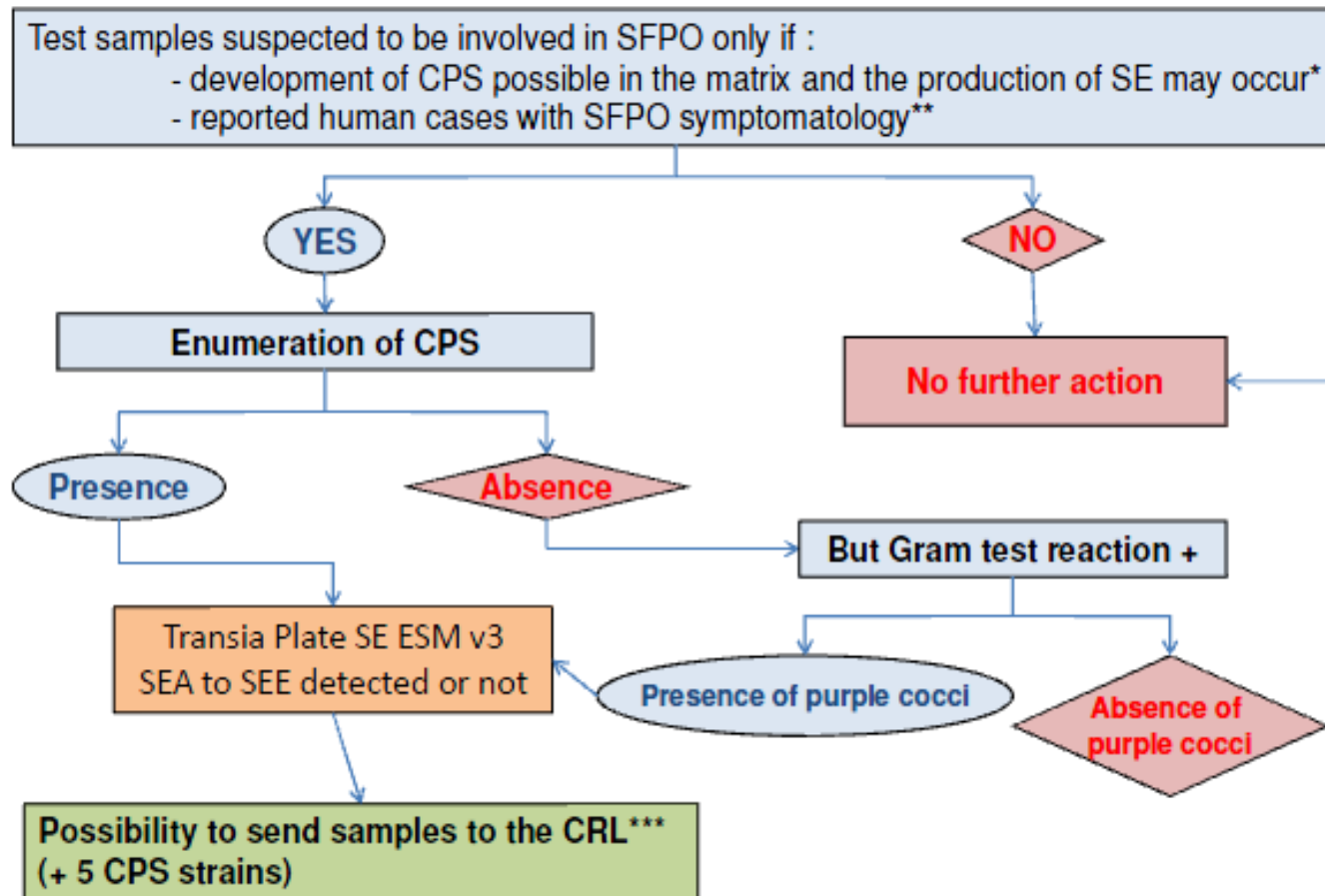


* Need of agreement with the lab before sending samples

** List to come: will be based on the outcome of the survey on SE detection sent to the NRLs

Vorgehensweise bei Ausbruchsverdacht

Diagram 2: SFPO investigations



* For example: don't test fresh vegetables or fruits...

** Symptoms: nausea, abdominal pain, vomiting, diarrhoea in a delay of 30 min to 8 hours after ingestion

*** Need of agreement with the lab before sending samples

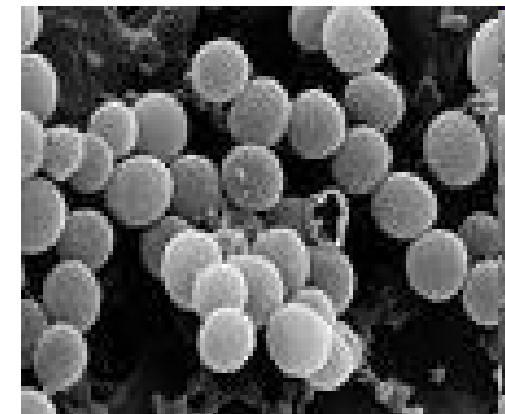
IV. Ergebnisse

EFSA – ECDC Community Summary Report Foodborne outbreaks in the European Union in 2008



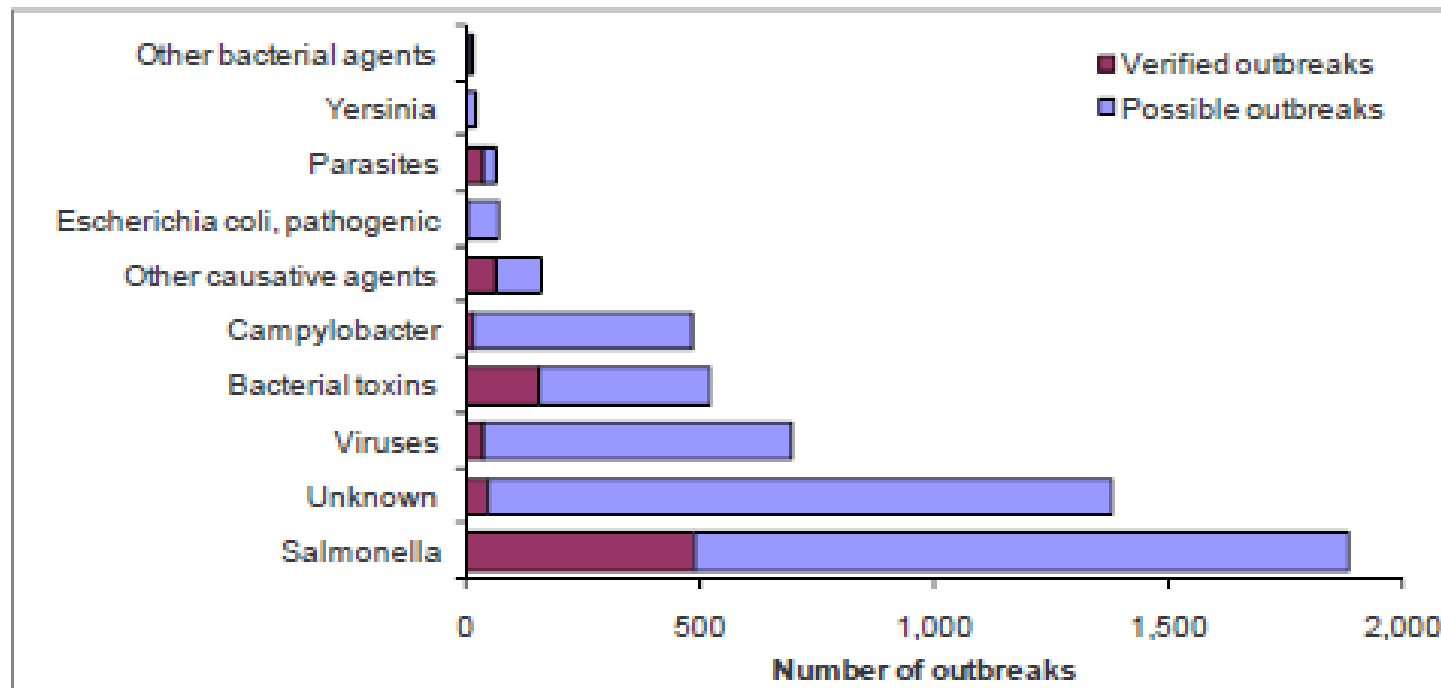
THE COMMUNITY SUMMARY REPORT
ON TRENDS AND SOURCES
OF ZOOSES AND ZOO NOTIC AGENTS
AND FOOD-BORNE OUTBREAKS
IN THE EUROPEAN UNION IN 2008

Issued on 23 December 2009
Published on 28 January 2010



Community Summary Report

Verursachendes Agens bei Lebensmittel-bedingten Ausbrüchen in der EU in 2008

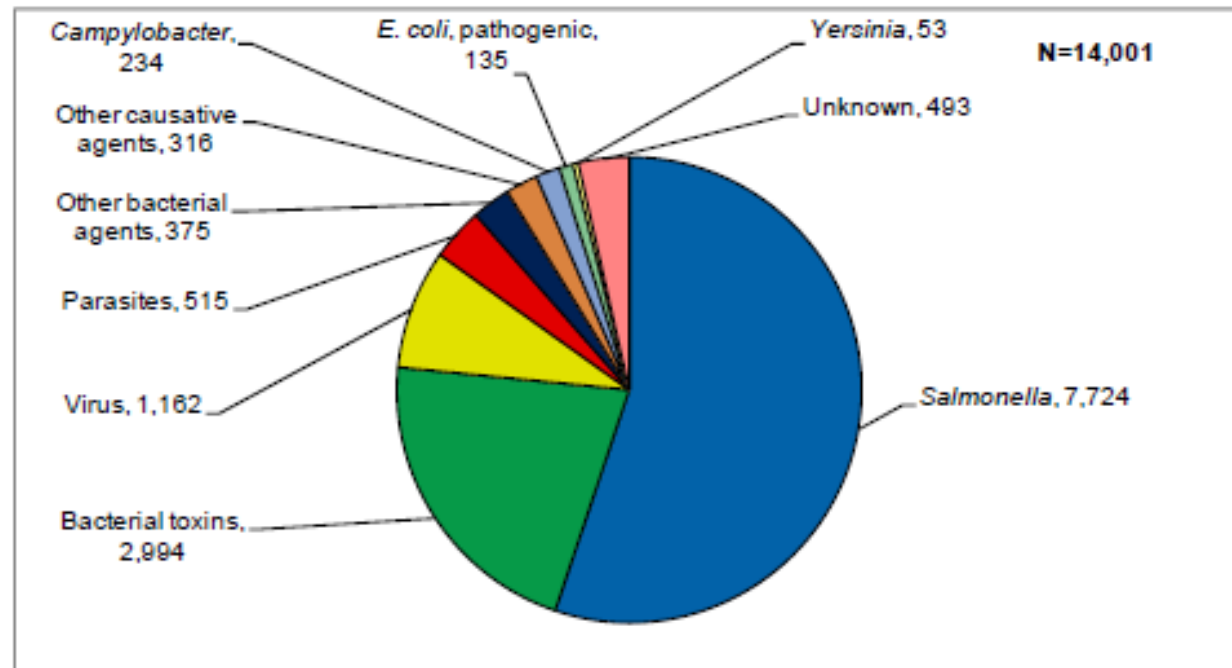


bakterielle Toxine verursachten:

- **9,8 %** (2007: 8,1 %) aller in d. EU gemeldeten Ausbrüche
- **525** (2007: 464) Ausbrüche insgesamt (davon 159 bestätigte, 366 wahrscheinliche)

Community Summary Report

Anzahl gemeldeter humaner Fälle je Agens bei bestätigten lebensmittelbedingten Ausbrüchen in der EU in 2008



In 2008:

- **2.994** humane Fälle durch **bakterielle Toxine** verursacht (kein Todesfall)

Community Summary Report

Agent	Country	Total outbreaks		Possible outbreaks			
		N	Reporting rate per 100,000	N	Human cases		
					Cases	Hospitalised	Deaths
Bacillus	Belgium	2	0.02	0	-	-	-
	Denmark	3	0.05	0	-	-	-
	Finland	3	0.06	2	14	0	0
	France	83	0.13	67	835	32	0
	Italy	3	<0.01	3	111	0	0
	Netherlands	15	0.09	0	-	-	-
	Poland	2	<0.01	0	-	-	-
	Portugal	3	0.03	1	24	24	0
	Spain	7	0.02	5	0	0	0
	Sweden	3	0.03	1	4	0	0
	EU Total	124	0.03	79	988	56	0
	Norway	8	0.17	8	54	0	0
	Switzerland	1	0.01	1	5	0	0
	Clostridium	Belgium	1	<0.01	0	-	-
Denmark		5	0.09	4	117	1	0
France		56	0.09	42	727	24	1
Germany		4	<0.01	0	-	-	-
Hungary		5	0.05	2	240	2	0
Italy		6	0.01	6	42	0	0
Netherlands		2	0.01	0	-	-	-
Poland		4	0.01	4	10	10	0
Portugal		8	0.08	6	16	16	0
Romania		3	0.01	2	4	4	1
Spain		13	0.03	8	0	0	0
United Kingdom		3	<0.01	3	0	0	0
EU Total		110	0.02	77	1,156	57	2
Staphylococcus		Norway	3	0.06	2	4	2
	Belgium	2	0.02	0	-	-	-
	Denmark	1	0.02	0	-	-	-
	Finland	1	0.02	0	-	-	-
	France	211	0.33	168	1,453	139	2
	Germany	1	<0.01	0	-	-	-
	Hungary	3	0.03	1	15	9	0
	Italy	2	<0.01	2	8	0	0
	Lithuania	2	0.06	2	4	4	0
	Netherlands	6	0.04	0	-	-	-
	Poland	10	0.03	7	131	4	0
	Portugal	8	0.08	4	49	47	0
	Romania	3	0.01	2	17	17	0
	Slovakia	2	0.04	1	0	0	0
	Slovenia	1	0.05	1	40	0	0
	Spain	32	0.07	17	0	0	0
	Sweden	6	0.07	5	23	0	0
	EU Total	291	0.06	210	1,740	220	2
	Norway	7	0.15	5	11	1	0
	Switzerland	1	0.01	0	-	-	-

In 2008 in der EU:

durch **Staphylokokken** verursacht:

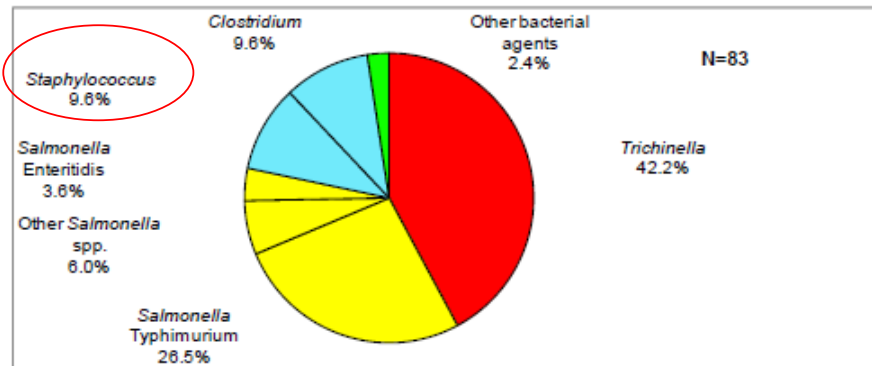
- 291 gemeldete Ausbrüche (Gesamtanteil: 5,5 %) Inzidenz EU: 0,06
- davon 210 wahrscheinliche
- 81 Staphylokokken bestätigte (davon 52 *S. aureus* bestätigte)

- Großteil in F gemeldet: 211 Ausbrüche / 43 bestätigte
- **DE: 1 bestätigter Ausbruch (2007: 0; 2006: 4; 2005: 0)**

➤ 20 % aller Ausbrüche in der EU wurden 2008 von DE gemeldet

Community Summary Report

Figure OUT6. Distribution of outbreaks caused by pig meat and products thereof in the EU, 2008

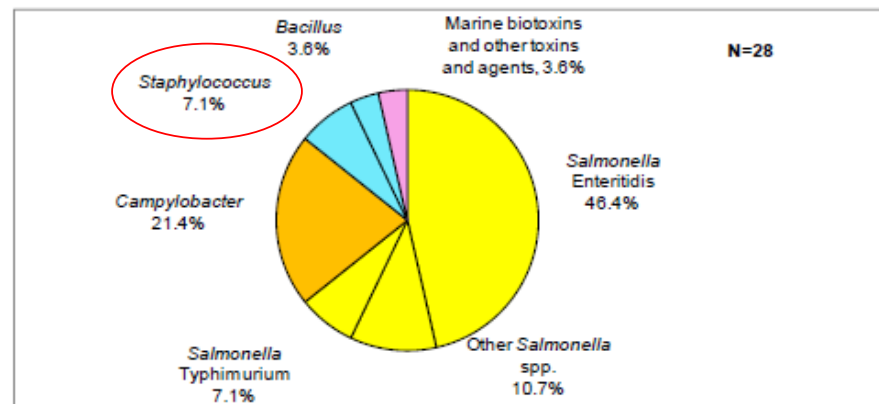


Schweinefleisch und -produkte:

durch **Staphylokokken** verursacht

- 9,6 % der 83 gemeldeten Ausbrüche
- 13,9 % der 842 gemeldeten Fälle

Figure OUT8. Distribution of outbreaks caused by broiler meat (Gallus gallus) and products thereof in the EU, 2008



Hühnerfleisch und -produkte:

durch **Staphylokokken** verursacht

- 7,1 % der 28 gemeldeten Ausbrüche
- 1,7 % der 352 gemeldeten Fälle

- insgesamt große Heterogenität in Bezug auf die Art des bei SE Ausbrüchen beteiligten Lebensmittels
- längst nicht nur Käse und Milch als beteiligtes Lebensmittel

V. Zusammenfassung / Fazit

- **mittlerweile erhebliche Anzahl unterschiedlicher SE- oder SE/-Typen identifiziert**
- **emetische Aktivität nicht immer vorhanden**
- **Bedeutung im Zusammenhang mit Erkrankungen unklar**

- **methodische Möglichkeiten derzeit sehr beschränkt**
- **beruhen i.d.R. auf kommerziellen ELISA-Systemen**
- **nur für klassische SE-Typen (A-E)**
- **keine Identifizierung und Quantifizierung**
- **Sensitivitäts- u. Spezifitätsprobleme**
- **Molekularbiologie als ergänzendes Tool**

- **derzeit Bestrebungen EN/ISO (DIN) d. Methoden-**
normung
 - **Federführung: CRL (AFFSA)**
 - **Normierung des Screening-Verfahrens**

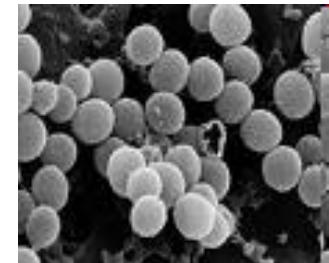


V. Zusammenfassung / Fazit

- **kaum Daten zum Vorkommen von SE in Lebensmitteln**
- **vereinzelt Veröffentlichungen zum Erregerverhalten / Vorkommen in best. Lebensmitteln v.a. aus Asien**

- **Anteil der durch bakterielle Toxine verursachten Ausbrüche in der EU hoch**
- **kaum gemeldete Ausbrüche in DE in 2008**
- **hohe Variabilität hinsichtlich der Lebensmittel**

- **Dunkelziffer dürfte insgesamt hoch sein**
- **Bedeutung von SE aus lebensmittelhygienischer Sicht möglicherweise unterschätzt**
- **Anregung von Studien (z.B. Aufnahme in BÜP)**



NRL für Koagulase positive Staphylokokken

Das Team



Wissenschaftler:

- Dr. Alexandra Fetsch (Leitung)
- Dr. Juliane Bräunig
- Dr. Annette Johne
- Britta Kraushaar

Technisches Personal:

- Ulrike Kämpe
- Jane Kowall

- Jessica Hiller (Diplomandin)

Danke... für Ihre Aufmerksamkeit

Dr. Alexandra Fetsch

Bundesinstitut für Risikobewertung

Thielallee 88-92 • D-14195 Berlin

Tel. 030-8412-2174 • Fax 030-8412-2159

alexandra.fetsch@bfr.bund.de • www.bfr.bund.de

