

3.5 Fachbereich 5

Diagnostik und Epidemiologie

Die Aufgaben des Fachbereiches „Diagnostik und Epidemiologie“ umfassen die Bereiche der Molekularbiologie, der klassischen Mikrobiologie (Bakteriologie, Virologie, Immunologie) sowie der Parasitologie, wobei der Schwerpunkt der Arbeiten auf der Erfassung, Pathogenese, Epidemiologie und Prävention von Zoonosen (Krankheiten, die vom Tier auf den Menschen übertragen werden) liegt. Zugleich werden Aufgaben der Tierkörperbeseitigung und der Fischkrankheiten bearbeitet.

Die Arbeitsschwerpunkte der experimentellen und gutachtlichen Tätigkeiten sind die Reduzierung von Gefahren, denen der Verbraucher durch vom Tier auf den Menschen übertragbare Krankheiten ausgesetzt ist. Besonders intensiv werden dabei solche Zoonosen bearbeitet, bei denen das Lebensmittel eine Vektorfunktion des Krankheitserregers übernehmen kann.

Der Fachbereich vollzieht die amtliche Zulassung von In-vitro-Tierseuchendiagnostika.

Einzelne Fachgebiete nehmen die Aufgabe „Nationaler Referenzlaboratorien“ wahr.

3.5.1 Aufgabenbeschreibung der Fachgebiete

3.5.2 Aufgabenbeschreibung Nationale Referenzlaboratorien (NRL)

3.5.3 Ausgewählte Arbeitsergebnisse

3.5.3.1 Molekularbiologische und veterinärmedizinische Salmonella-Zentrale / NRL Salmonella

3.5.3.1.1 NRL Epidemiologie der Zoonosen (NRL-E)

3.5.3.2 Bakteriologie, NRL Escherichia Coli

3.5.3.2.1 Entwicklung und Validierung von Methoden

3.5.3.2.2 Bearbeitung eingesandter Proben / typisierte Stämme und Herstellung von Referenzmaterial

3.5.3.2.3 Laborvergleichsuntersuchungen

3.5.3.2.4 Weitere Aktivitäten

3.5.3.2.5 Bundesweiter Ringversuch - Basis für die Standardisierung eines molekular- biologischen Verfahrens zur Detektion, Isolierung und Charakterisierung Shi- gatoxin-produzierenden *E. coli* in Lebensmitteln

3.5.3.3 Forschungsbericht: Neues porcines Influenzavirus-Isolat

3.5.3.4 Forschungsbericht: Untersuchungen zur Überlebensfähigkeit von *Trichinella spiralis* in Mettwurst

3.5.4 Mitarbeit in internationalen Gremien

3.5.1 Aufgabenbeschreibung der Fachgebiete

Die einzelnen Fachgebiete führen folgende Aufgaben durch:

Fachgebiet „Molekularbiologie und veterinärmedizinische Salmonellazentrale“

Die Aufgaben des Fachgebietes reichen von der Erfassung des Salmonellosegeschehens als Nationales Referenzlabor für Salmonellen (NRL-Salm) in der Bundesrepublik Deutschland bis zu Bearbeitung spezieller Fragen der Antibiotikaresistenz und Gentechnik. Daneben ist das Fachgebiet gutachterlich bei der Zulassung antimikrobiell wirksamer Futtermittelzusatzstoffe beteiligt. Außerdem sind in das Fachgebiet die Gebiete des Nationalen Referenzlaboratoriums für Zoonosen und die Arbeitsgruppe Fischkrankheiten und –haltung eingegliedert. Im Vordergrund der Arbeit steht jedoch die Erfassung der Epidemiologie der Salmonellen. So ist das Fachgebiet auch O.I.E.-Referenzlabor für Salmonellen.

Fachgebiet „Bakteriologie“

Im Fachgebiet „Bakteriologie“ (Standort Dessau) werden schwerpunktmäßig (Nationales veterinärmedizinisches Referenzlabor für E. coli [NRL-EC]) die Diagnostik und Epidemiologie der Escherichia coli VTEC/EHEC bearbeitet. Weitere Schwerpunkte sind die Diagnostik der Listerien sowie (als Partner für das Fachgebiet Immunologie und Diagnostika) die molekularbiologische Differentialdiagnostik für Brucellen zur Abgrenzung von serologischen Kreuzreaktionen gegenüber Yersinien.

Fachgebiet „Allgemeine Virologie und Elektronenmikroskopie“

Die Aufgaben des Fachgebietes „Allgemeine Virologie und Elektronenmikroskopie“ umfassen Maßnahmen, die der Prophylaxe, der Diagnostik und der Bekämpfung einschließlich der Abtötung (Desinfektion/Tierkörperbeseitigung) von Zoonosen- und Tierseuchenerregern dienen. Ausgehend von Virusinfektionen erstrecken sich die Aufgaben aber auch auf andere Infektionserreger. So wird die Thematik der Risikobeurteilung und Gefahrenabwehr bezüglich der Bovinen spongiformen Enzephalopathie (BSE) im Fachgebiet bearbeitet.

Es wird an der Neugestaltung und Fortschreibung der Zoonosen- und Tierseuchengesetzgebung im weitesten Sinne mitgewirkt. Die gutachterliche Arbeit erstreckt sich aber auch auf Gebiete der viralen Kontamination von Lebens- und Arzneimitteln.

Das Fachgebiet vollzieht die gesetzliche Aufgabe der „Zulassung von in-vitro-Diagnostika zur Zoonosen- und Tierseuchenbekämpfung“ (§17c Tierseuchengesetz).

Die für das gesamte BgVV zuständige Elektronenmikroskopie ist hier angegliedert.

Fachgebiet „Virale Zoonosen“

Hauptarbeitsbereich des Fachgebietes sind Untersuchungen zur Diagnostik, Epidemiologie und Molekularbiologie von Influenzaviren, zur Prävalenz des Virus der Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME) in den Hochendemiegebieten Deutschlands sowie spezielle diagnostische Fragen des Nachweises von Coxiella burnetii in Milch.

Fachgebiet „Immunologie und Diagnostika“ und „Parasitologie“

Im Fachgebiet werden aktuelle Fragen zur Diagnostik und Epidemiologie von Zoonosen und Tierseuchen sowie parasitärer Zoonosen bearbeitet. Schwerpunkte sind zur Zeit die Epidemiologie und Diagnostik der Brucellose und Borreliose, der Trichinellose bei Haus- und Wild-

tieren, die Biologie der Zecken bezüglich ihrer Eigenschaft als Krankheitsüberträger und Fragen der Wurmerkrankungen von Mensch und Tier (z.B. Fuchsbandwurm).

3.5.3 Aufgabenbeschreibung der Nationalen bzw. gemeinschaftlichen veterinärmedizinischen Referenzlaboratorien

Nationales veterinärmedizinisches Referenzlaboratorium für Salmonellen (NRL-Salm)

Die Salmonellose gehört weltweit zu den wichtigsten Zoonosen. Über Lebensmittel kann sie den Menschen erreichen und zu Durchfällen, gelegentlich auch zu schweren Erkrankungen führen. Zu den besonderen Aufgaben des Referenzlabors gehört es deshalb, auf einen optimalen Gesundheitsstatus der Einzeltiere und Tierbestände, die zur Gewinnung von Lebensmitteln dienen, hinzuwirken und diesen Status aufrechtzuerhalten. Die Sicherung des Gesundheitsschutzes im Hinblick auf Lebens- und Futtermittel ist ein weiterer Aspekt. Das Referenzlaboratorium soll einen kontinuierlichen Überblick über die aktuelle epidemiologische Situation der Salmonellen geben.

Nationales veterinärmedizinisches Referenzlaboratorium für Brucellose (NRL-BRUC)

In Deutschland gilt die Brucellose als getilgt. Dennoch ist in den letzten Jahren eine Zunahme von Brucellose-Fällen bei Menschen und Brucellose-Ausbrüchen in Viehbeständen zu verzeichnen. Auslandsreisen, Immigration und der Import lebender Tiere scheinen die wesentlichen Ursachen zu sein. Damit ist Deutschland einem ständigen Infektionsdruck ausgesetzt, dem eine andauernde intensive Beobachtung des Brucellose-Geschehens im Inland entgegengesetzt werden muss. Dies erfordert die Kontrolle des Negativstatus, die Abklärung von Kreuzreaktionen und die Herstellung und Abgabe von Diagnostika.

Nationales veterinärmedizinisches Referenzlaboratorium für Trichinellose (NRL-TRICH)

Die Trichinellose oder Trichinenkrankheit ist eine sehr seltene Erkrankung des Menschen, die durch den Verzehr von rohem Fleisch trichinöser Tiere ausgelöst wird. Bei ausreichend erhitztem Fleisch werden Trichinen abgetötet. Um eine Gefährdung des Verbrauchers auszuschließen, ist es Vorschrift, jedes geschlachtete Schwein und Pferd auf Trichinenbefall zu untersuchen. Die Befallsraten sind gering (ein bis zwei Tiere auf 40 Millionen geschlachtete Schweinen); sie liegen bei Wildschweinen minimal höher. Da schwere Epidemien mit mehreren hundert erkrankten Menschen i.d.R. von einzelnen befallenen Tieren ausgehen, kann auf die Untersuchung jedes einzelnen Tieres nicht verzichtet werden.

Nationales Referenzlaboratorium für die Epidemiologie der Zoonosen (NRL-E)

Zoonosenerreger werden häufig über Lebensmittel übertragen. Eine effektive Bekämpfung der Erreger ist nur aufgrund fundierter Kenntnisse der Infektionsreservoirs möglich. Zugleich kann eine gut organisierte Erregerüberwachung frühzeitig Gefahren aufdecken, die durch neu eingeschleppte Krankheitserreger drohen. Mit der Einrichtung des Referenzlaboratoriums wurde die Möglichkeit einer bereichsübergreifenden Analyse der Infektionswege von der Umwelt über Futtermittel, Nutz- und Haustiere sowie über Lebensmittel hin zum Menschen geschaffen.

Nationales Referenzzentrum für E. coli (NRL-EC)

Unter den Escherichia coli-Stämmen gilt nur der enterohämorrhagische Escherichia coli (EHEC) als Zoonosenerreger. Der Keim kommt im Darmtrakt hauptsächlich von Wiederkäuern vor und hat in der jüngsten Vergangenheit als Lebensmittelinfektionserreger besondere Be-

deutung erlangt. Schon in geringer Anzahl können diese Coli-Keime schwerwiegende Erkrankungen verursachen und neben blutigem Durchfall bei Kleinkindern und Menschen mit geschwächtem Immunsystem das hämolytisch-urämische Syndrom (HUS) auslösen. Mit dem HUS-Syndrom kann eine dauerhafte Schädigung der Nieren einhergehen; in 10 % der Fälle verläuft es tödlich. Da derzeit keine ausreichenden therapeutischen Möglichkeiten zur Verfügung stehen, hat die epidemiologische Aufklärung als Basis für Präventivmaßnahmen eine besondere Bedeutung.

Nationales Referenzlaboratorium für durch Zecken übertragene Erkrankungen (NRL-ZüK)

Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME), Lyme-Borreliose, Q-Fieber, Ehrlichiose und Babesiose sind Erkrankungen, die in Europa durch Zecken übertragen werden. Einige dieser genannten Zoonosen-Erreger werden auch durch Lebensmittel, insbesondere Milch, auf den Menschen übertragen (FSME-Virus, *Coxiella burnetii*).

Das neu gegründete NRL-ZüK hat folgende Aufgaben: Umfassende Beratung von Behörden, Ärzten, dem ÖGD, interessierter Wissenschaftler anderer Disziplinen, der Bevölkerung, von Betroffenenengruppen, der Industrie über ZüK. Dazu gehört die Herausgabe von Merkblättern und anderen Informationsmaterialien für verschiedene Zielgruppen.

Weiterhin werden wissenschaftlich-experimentell eigene Forschungsprojekte bearbeitet und die Ergebnisse in Form von wissenschaftlichen und populärwissenschaftlichen Veröffentlichungen verbreitet. Dazu gehören

- der Nachweis genannter Erreger in Lebensmitteln zum Schutz des Verbrauchers,
- der Nachweis der Erreger in Zecken, um Naturherdgebiete zu charakterisieren (FSME),
- die Einschätzung des Risikos für die Bevölkerung, nach einem Zeckenstich eine Erkrankung durch einen der o.g. Erreger zu erleiden.

Das NRL-ZüK arbeitet in den von ihm selbst wissenschaftlich bearbeiteten Bereichen mit den in Deutschland und Europa diesbezüglichen Arbeitsgruppen standardisierend und koordinierend zusammen.

Nationales Referenzlaboratorium für bakterielle und virale Muschelkontaminationen (Teilgebiet virale Muschelkontamination) - NRL-Muschelkontaminanten -

Das NRL-Muschelkontaminanten wurde im August 1999 neu etabliert und befindet sich im Aufbau. Es hat folgende Untersuchungsinhalte:

- lebende Muscheln (zweischalige Mollusken, also auch Austern etc.) aus Erzeugungsgeländen zur Einstufung der Gebiete in Kategorien
- lebende Muscheln, die zum Verzehr vorgesehen sind
- erhitzte bzw. gekochte Muscheln können mit den genannten Methoden ebenfalls untersucht werden

Aufgaben:

- Koordinierung der Tätigkeit der nationalen Laboratorien, die in dem betreffenden Mitgliedsstaat mit den virologischen Muschelanalysen beauftragt sind
- Unterstützung der zuständigen Behörde des betreffenden Mitgliedsstaates bei der Gestaltung des Kontrollsystems auf dem Gebiet der viralen Muschelkontaminationen
- Durchführung regelmäßiger Vergleichstests zwischen den verschiedenen nationalen Laboratorien, die mit den genannten Analysen beauftragt sind
- Weitergabe der Informationen des gemeinschaftlichen Referenzlaboratoriums an die zuständigen Behörden und die mit den genannten Analysen beauftragten nationalen Laboratorien

Gemeinschaftliches Referenzlaboratorium für die Epidemiologie der Zoonosen (CRL-E)

Die Daten aus allen nationalen Referenzlaboratorien der Europäischen Union werden an das Gemeinschaftliche Referenzlaboratorium für die Epidemiologie der Zoonosen (CRL-E) gemeldet, das als Europäisches Referenzlaboratorium seit 1994 ebenfalls am BgVV eingerichtet ist. Wichtigste Aufgabe ist die Koordination der Überwachung der Zoonose-Situation in der Europäischen Gemeinschaft und damit der Verbraucherschutz im Handelsverkehr. Das Referenzlabor ist direkt der Generaldirektion Sanco der Europäischen Gemeinschaft unterstellt. Die Berichte der Mitgliedstaaten werden aufbereitet, um die Europäische Kommission bei der Berichterstattung vor dem Ständigen Veterinärausschuss über die Zoonose-Situation in Europa zu unterstützen und gezielte Bekämpfungsmaßnahmen vorschlagen zu können.

Die im Jahre 1994 begonnene Tätigkeit als Gemeinschaftliches Referenzlabor für die Epidemiologie der Zoonosen wurde auch im Jahr 2001 mit finanzieller Unterstützung durch die Europäische Kommission fortgesetzt. Hauptaufgabe ist die Koordinierung eines Netzwerkes zur Erhebung, Sammlung und Auswertung der Informationen zur Zoonosen-Situation in der Europäischen Union, die in enger Zusammenarbeit mit den Vertretern der EU-Mitgliedstaaten durchgeführt wird. Schwerpunkt der Arbeit war insbesondere Anpassung und Weiterentwicklung der Datenerhebung für die Anforderungen der quantitativen Risikobewertung.

Wie in den Vorjahren wurde ein umfassender Bericht zur Zoonosen-Situation in der EU erarbeitet. Eine kontinuierliche Verbesserung von Umfang und Qualität der nationalen Berichte sowie die Vergleichbarkeit der Daten konnte erzielt werden. Größtes Problem bleibt der Unterschied in der Überwachungsaktivität der Mitgliedsstaaten. Diese soll insbesondere durch gesetzliche Neuregelungen erreicht werden.

Auch in den Jahren 2000 und 2001 fand ein jährliches Arbeitstreffen mit den Vertretern der Nationalen Referenzzentren für die Epidemiologie der Zoonosen aller EU-Mitgliedstaaten statt. In diesem Arbeitstreffen wurden die Anforderungen an den Zoonosenbericht sowie die Darstellung der derzeitigen Zoonosensituation diskutiert und abgestimmt. Das Handbuch für die Berichterstattung wurde entsprechend aktualisiert.

Im Jahre 1999 wurde ein Untersuchungsprogramm für die Salmonellenbelastung in pflanzlichen Futtermitteln in der EU gestartet. Neben der Beratung bei der Ausgestaltung des Stichprobenplanes war es Aufgabe des CRL-E, die Auswertung der resultierenden Daten vorzunehmen. Ein erster Bericht wurde in 2001 der Kommission vorgelegt.

Die weiteren Aktivitäten des CRL-E konzentrierten sich auf eine Intensivierung der Kooperation mit anderen international arbeitenden Arbeitsgruppen im Bereich der Zoonosen (Enter-net, WHO Surveillance Programm, etc.). Weiterhin kooperierte das CRL-E mit verschiedenen EU finanzierten und nationalen Projekten, die epidemiologische Fragestellungen zum Inhalt haben.

Wesentliches Ergebnis der Arbeit des CRL-E ist die Erstellung des jährlichen Berichtes zur Zoonosensituation in der EU. Eine Zusammenfassung wird seit 2001 auf der Website der EU unter http://europa.eu.int/comm/food/fs/sfp/mr/mr08_en.pdf publiziert.

3.5.3 Arbeitsergebnisse

3.5.3.1 Molekularbiologische und veterinärmedizinische Salmonella-Zentrale

3.5.3.1.1. NRL Salmonella

Entwicklung und Validierung von fünf Methoden

- Nachweis von Salmonellen mittels PCR: zwei Ringversuche
- Kultureller Nachweis der d-Tartrat-Verwertung
- Molekularbiologischer Nachweis der d-Tartrat-Verwertung
- Molekularbiologischer Nachweis von *Salmonella* Typhimurium DT104
- Validierung des Sensititer-Systems

Proben und Serovare

Anzahl der eingesandten Proben und Serovare: 4656/3699

Die Stämme bzw. Serovare wurden mit 18 Methoden auf ihre Eigenschaften getestet:

Zahl der Ergebnisberichte an EU/internat. Stellen: 12

Nationale Behörden: 609/589 Befunde über 2977/2291 Isolate

Universitäten und Bundeseinrichtungen: 119/102 Befunde über 1235/971 Isolate

Sonstige Einsender: 91/87 Befunde über 444/370 Isolate

Davon: Einsendung beanstandungsfähig: 4580/3490, insbesondere nach

§ 8 und § 35 LMBG

Futtermittel Gesetz

Futtermittel Einfuhr VO

Hühner Salm VO.

Rinder Salm VO

Hühnereier VO

Fleischhygiene Gesetz etc.

Klärung von Infektionsquellen/Ausbrüchen

Ca 60 Infektionen in Beständen und bei Lebensmittelausbrüchen

Bewertung der Ergebnisse in 2000/2001 siehe **Tabellen 1 und 2**

Bestätigungsanalysen

Durchführung von Bestätigungsanalysen an 1210/1108 Isolaten, davon 1187/1065 Salmonellen, bzgl. §35 LMBG

Art des hergestellten/gewonnenen Referenzmaterials:

Referenzstämme: 253

Referenz DNA: 253

Referenzmaterial wurde in 43/39 Fällen an Behörden (und verschiedene Laboratorien) versandt.

Amtliche Empfehlungen

- DIN 10135: Verfahren zum Nachweis von Salmonellen mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)
- DIN 10134: Allgemeine verfahrensspezifische Anforderungen zum Nachweis von Mikroorganismen mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) in Lebensmitteln
- §35 LMBG: Verfahren zum Nachweis von Salmonellen mit der PCR.

Tabelle 1: Herkunftsmaterialien der Salmonella-Isolate am NRL-Salm in den Jahren 2000 und 2001

Herkunftsmaterial	2000	2001
Mensch	14	5
Tier	1952	1887
Lebensmittel	1161	893
Futtermittel	485	269
Umwelt	302	265
Pharmapräparate	1	0
Keine Angaben	0	171
Summe	3915	3490

Tabelle 2: Häufigste Salmonella-Serovare am NRL-Salm in den Jahren 2000 und 2001

Rang	Serovar	2000	Serovar	2001
1	S. Typhimurium	1637	S. Typhimurium	1511
2	S. Enteritidis	443	S. Enteritidis	409
3	S. Paratyphi B (dT+)	213	S. 4,12 : d : -	238
4	S. Senftenberg	109	S. Senftenberg	97
5	S. Livingstone	107	S. Infantis	85
6	S. Infantis	107	S. Subsp. I, rauh	72
7	S. 4,12 : d : -	94	S. Mbandaka	61
8	S. Anatum	89	S. Livingstone	61
9	S. Derby	78	S. Paratyphi B (dT+)	59
10	S. Subsp. I, rauh	61	S. Subsp. IIIb	56

3.5.3.1.2 Nationales Referenzlaboratorium für die Epidemiologie der Zoonosen

2001 hat das Nationale Referenzlaboratorium für die Epidemiologie der Zoonosen (NRL-E) die gesetzlich festgelegten Aufgaben, i.e. den "Jährlichen Trendbericht über den Verlauf und die Quellen von Zoonose-Erregern" auch im dritten Jahr nach seiner Ernennung erfüllt (vgl. Bundesanzeiger v. 22.06.96).

Zu Beginn des Jahres wurden dazu wie in den Jahren zuvor Fragebögen für 1998 in den Bundesländern verteilt. Die Meldungen der Bundesländer ermöglichten eine epidemiologische Datenzusammenstellung, die Informationen über das Vorkommen von Tuberkulose, Brucellose, Salmonellose, E.coli-VTEC, Campylobacteriose und einige Erreger mehr bei Tieren, Lebensmitteln, Futtermitteln und einer Reihe von Umweltproben bundesweit zusammenführt. Aus den zusammengefassten und bewerteten Daten sowie unter Hinzufügung von Beiträgen der nationalen veterinärmedizinischen Referenzlaboratorien wurde für die einzelnen Zoonosen ein "Deutscher Trendbericht über den Verlauf und die Quellen von Zoonosen-Infektionen nach der Zoonosen-RL (92/117/EWG) für 2000" erstellt, der als deutscher Beitrag an die EU-Kommission zur Erfüllung der Zoonosen-RL weitergeleitet wurde. Dieser Bericht wurde ebenfalls in den Bundesländern verteilt.

Ausgehend vom deutschen Trendbericht über Zoonosen für 2000 wurde ein BgVV-Heft (BgVV-Heft 6/2001) zur Veröffentlichung vorbereitet. Diese erweiterten Zusammenstellungen dienen allen epidemiologisch Interessierten (z.B. Universitäten, Journalisten, Studenten etc.) und erlauben eine im Vergleich zu den vorherigen BgVV-Heften fortlaufende epidemiologische Übersicht in einem weiten Bereich. Dieses BgVV-Heft wird wie die vorherigen (1996-1999) auf der BgVV-Homepage zur Verfügung gestellt (unter "Publikationen" und unter "Zoonosen/ Epidemiologie der Zoonosen"). In 2001 wurde bereits der deutsche Trendbericht über Zoonosen für 2000 an dieser Stelle in die Homepage eingefügt.

Mit den Beauftragten der Bundesländer wurde ein Treffen im BgVV durchgeführt, auf dem die Grundlagen der Zoonosen-Mitteilungen besprochen wurden. Die Ergebnisse der Mitteilungen für 2000 wurden wieder auf der Arbeitstagung des ALTS (Arbeitskreis Lebensmittelhygienischer Tierärztlicher Sachverständiger) mit Teilnehmern aus den einsendenden Instituten vorgestellt und diskutiert.

Das NRL-E nahm auch in diesem Jahr am jährlichen 'Workshop on Analytical Methods in the Epidemiology of Zoonoses' im BgVV mit den Teilnehmern der anderen EU-Mitgliedstaaten teil, bei dem in Arbeitsgruppen Grundlagen für die neue Zoonosen-RL erarbeitet wurden.

Im NRL-E werden auch weiterhin die Aktivitäten im Zusammenhang mit der Benennung als OIE-Referenzlaboratorium für Salmonellen koordiniert. Davon ausgehend wurde ein Forschungsprojekt über den Salmonellennachweis mittels Immunofluoreszenz aus Schweineseren und -Fleischsäften betreut. Das von der Humboldt-Stiftung (Bonn) geförderte Projekt wurde von einer philippinischen Wissenschaftlerin durchgeführt.

3.5.3.1.2.1 Neuer Chemilumineszenz-Test zum Nachweis von Salmonellen bei Schlachtschweinen

Infektionen durch Enteritis-Salmonellen sind die am häufigsten erfassten Ursachen von Durchfallerkrankungen. Sie werden überwiegend durch den Verzehr von kontaminierten Lebensmitteln tierischen Ursprungs ausgelöst (**Abbildung 1**). Schweine sind nach dem Geflügel die zweitwichtigste Infektionsquelle für Salmonellen beim Menschen. Schweine übertragen hauptsächlich *S. typhimurium*, Geflügel dagegen überwiegend *S. enteritidis*. In **Abbildung 2** ist die Entwicklung der Salmonellen-Belastungen beim Schwein in den letzten Jahren dargestellt: Seit 1998 wurde bei Schlachthofuntersuchungen von Schweinefleisch ein Anstieg der Salmonellen festgestellt. Schweine sind somit die Hauptursache für *S.typhimurium*-Infektionen durch tierische Lebensmittel (**Abbildung 3**).

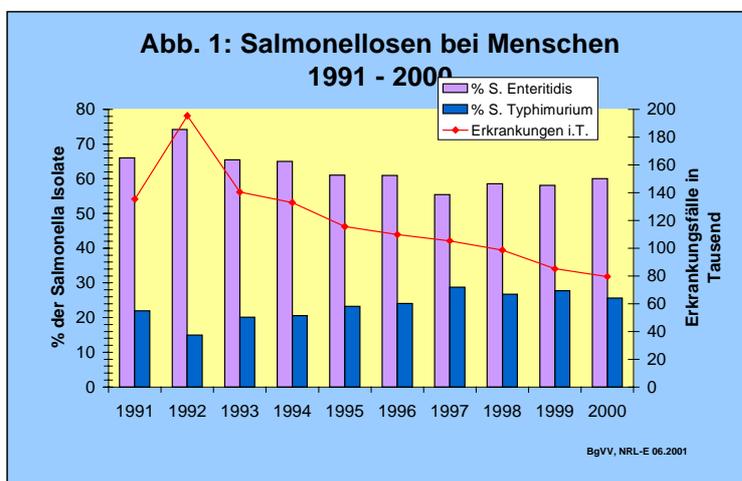


Abbildung 1: Salmonellose des Menschen.

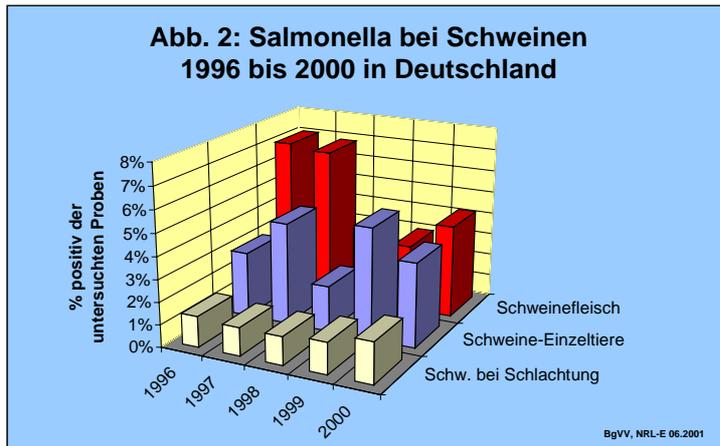


Abbildung 2: Das Schwein ist eine wichtige Quelle der Salmonellosen

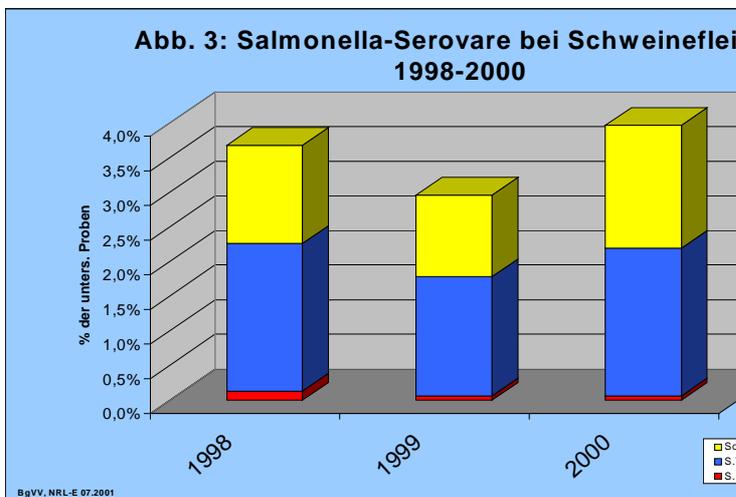


Abbildung 3: S. typhimurium macht den größten Anteil bei Schweinen aus.

Gefördert durch die Alexander-von-Humboldt-Stiftung (Bonn) wurde im BgvV ein Forschungsvorhaben durchgeführt, um eine neue Methode zu überprüfen, mit der die Salmonellen-Infektionen bei Schlachtschweinen überprüft werden kann. Bisher und nach dem Vorbild aus Dänemark wurden sog. Fleischsaftproben in einem ELISA-Verfahren untersucht (vgl. **Tabelle 1** und **Tabelle 2**). Nach einigen Vorarbeiten in den letzten Jahren wurde der Chemilumineszenz-Test (CLIA) zur Untersuchung von Fleischsäften entwickelt. Dabei wurde ein Vergleich zwischen der dänischen ELISA-Methode und dem CLIA angestellt.

Tabelle 1: Das System für Schlachtschweine in Deutschland

- Die Reaktion jeder untersuchten Fleischsaftprobe wird als positiv oder negativ bewertet.
- Nach der geplanten Schweine-Salmonellen-Verordnung führt die Bewertung der Untersuchungsergebnisse zur Einstufung des Betriebes in einer der Kategorien (I, II oder III. s. Tab. 2).
- Bei Verdacht eines positiven Salmonellen-Antikörperstatus oder nach Feststellung eines positiven Salmonellen-Antikörperstatus sind betriebseigene Maßnahmen im Herkunftsmastbetrieb durchzuführen. Von der Antikörper-Kategorie hängt auch der Fleischpreis ab.

Tabelle 2: Methoden zum Nachweis von Antikörpern gegen Salmonellen beim Schwein

1. Fleischsaft-ELISA

Nach dem dänischen Vorbild werden Salmonella-Antikörper beim Schwein durch den Einsatz von Fleischsaft im ELISA-Test nachgewiesen.

2. Chemiluminescent Immunoassay (CLIA): Lumineszenz-Testverfahren

Das Ziel dieser Studie ist es, die Verwendbarkeit vom CLIA zum Nachweis von Salmonella-Antikörpern in Fleischsäften vom Schlachtschwein herauszufinden.

'Lumineszenz' nutzt die kalte Lichterzeugung durch eine chemische Reaktion, die den Leuchtkäfern abgucken worden ist.

Die Fähigkeit dieses Testsystems zum Nachweis von Salmonella-Antikörpern wurde bereits früher beim Masthähnchen ermittelt.

Vergleich zwischen ELISA und CLIA - Vorteile und Nachteile -

In **Abbildung 4** ist eine typische Zusammenstellung von ELISA-Ergebnissen zu erkennen. Die negativen und fraglichen Ergebnisse erscheinen zusammengedrängt am linken Rand. Positive Proben sind relativ schwer von den negativen abzutrennen.

In **Abbildung 5** ist eine typische Zusammenstellung von CLIA-Ergebnisse zu erkennen. Die negativen und fraglichen Ergebnisse erscheinen gleichmäßig verteilt im möglichen Nachweis-Spektrum. Die positiven Proben lassen sich relativ gut von den negativen abtrennen.

In Zweifelsfällen kann also ein Schweinebestand mittels des CLIA sicherer beurteilt werden. Der ELISA wird weiterhin der preisgünstige Standard-Test bleiben. Der CLIA steht als Referenzmethode zur Verfügung.

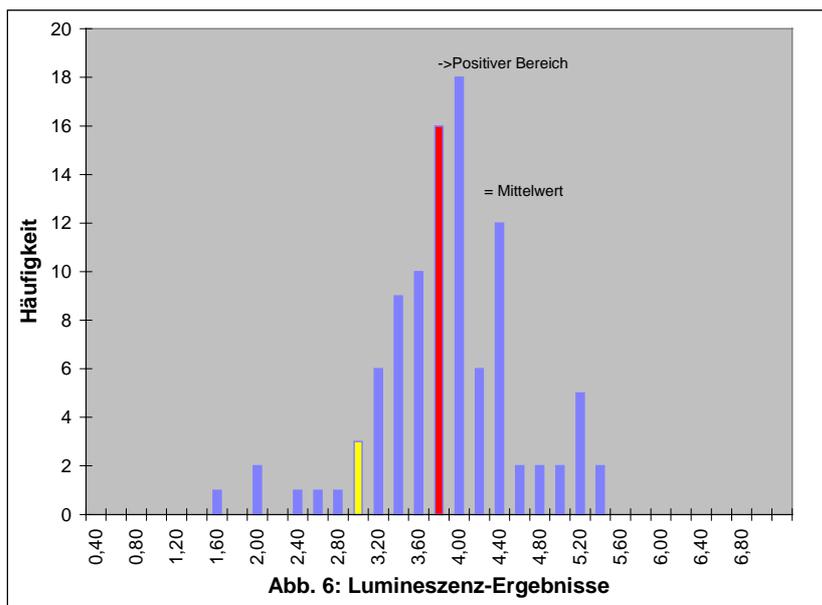


Abbildung 4: Häufigkeitsverteilung der Reaktionswerte im ELISA

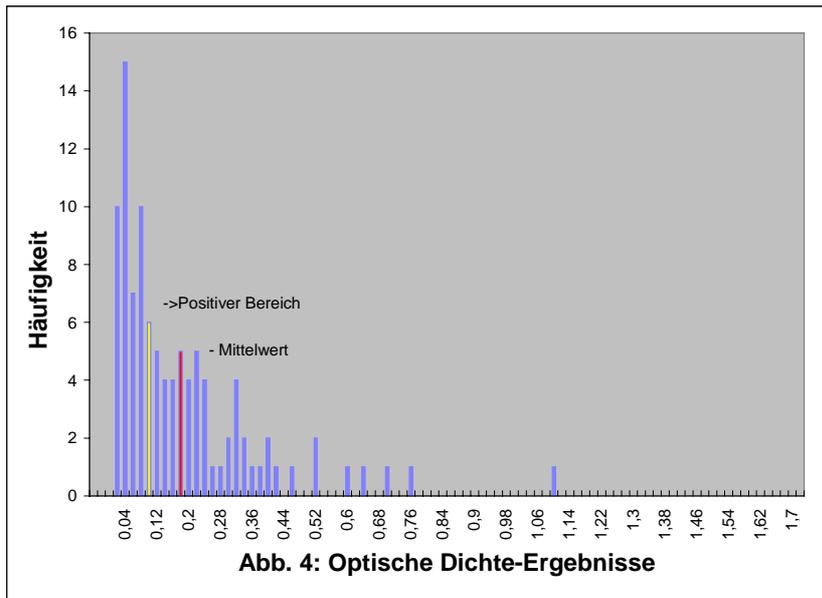


Abbildung 5: Häufigkeitsverteilung der Reaktionswerte im CLIA

Schlussfolgerungen

Auf der Basis der Ergebnisse dieser Untersuchungen kann der CLIA als Referenzmethode für den Nachweis von Salmonella-Antikörpern in Fleischsaftproben von Schlachtschweinen angewendet werden.

Matthias Hartung, Bernadette M. Zamora, Carsten Nöckler

3.5.3.2 Bakteriologie, Nationales Veterinärmedizinisches Referenzlabor für Escherichia coli

3.5.3.2.1 Entwicklung und Validierung von Methoden

Die Entwicklung und Validierung einer molekularbiologischen Methodenkaskade wurde in 2001 abgeschlossen. In Absprache mit dem BMVEL erfolgt die Veröffentlichung im Koordinierungsabschlussbericht zum (BMG) - Forschungsvorhaben 'Parameter für die Identifizierung und Differenzierung von enterohämorrhagischen Escherichia coli (EHEC) in Lebensmitteln und Lebensmittel liefernden Tieren'.

Art der Methode: Untersuchung von Hackfleisch; Nachweis, Isolierung und Charakterisierung Verotoxin-bildender Escherichia coli (VTEC) in Hackfleisch mittels PCR und DNA-Hybridisierungstechnik.

Organisation und Durchführung eines bundesweiten Ringversuchs mit elf Teilnehmern (zwei Bundesinstitute, zwei Universitäten, sechs Landesuntersuchungsämter, ein Unternehmen aus der Wirtschaft); Aufnahme der Methodenkaskade in die amtliche Methodensammlung nach §35 LMBG. Gegenwärtig Prüfung hinsichtlich Übernahme als CEN-Vorschrift.

Des Weiteren wurde in 2001 die 2. Normvorlage des 'Verfahrens zum Nachweis von VTEC in Lebensmitteln' im DIN-Normenausschuss bearbeitet. Das Verfahren hat das in Dessau im Fachgebiet "Bakteriologie" erarbeitete "Vorläufige Verfahren zum Nachweis Verotoxin-

bildender E. coli in Lebensmitteln" zur Basis, das als anzuwendende Methode für verschiedene Substrate geeignet ist. In Hinblick auf den Zusatz von Enhancern (Ersatz von Mitomycin C durch Carbadox) zur Sensitivitätssteigerung wurde ein Mutagenitätsgutachten in Auftrag gegeben und zusätzlich in die Auswertung einbezogen.

3.5.3.2.2 Bearbeitung eingesandter Proben; typisierte Stämme und Herstellung von Referenzmaterial

Insgesamt wurden 725 Serovare im NRL E. coli bearbeitet. Die Zahl setzt sich aus 496 Proben für die E. coli-Diagnostik und 229 Proben für die Listeria-Typisierung zusammen. Von 222 E. coli-Isolaten wurden das EHEC-Virulenzmuster (fünf Virulenzfaktoren) bestimmt einschließlich der Serotypisierung. Zusätzlich wurden 310 E. coli-Isolate verschiedenen Ursprungs ausschließlich serotypisiert.

Im Rahmen von laufenden Forschungsprojekten wurden 185 Rinderhackproben aus dem Handel untersucht (460 Einzelbestimmungen).

Außerdem wurden 630 heterogene Proben (Kot, Stuhl, Umwelt, Milch) aus einer Milchviehanlage bei Dessau einem Screening unterzogen und VTEC isoliert sowie charakterisiert (1492 Einzelbestimmungen).

Es wurden 222 **Bestätigungsanalysen** durchgeführt und 1332 **Einzelanalysen** hinsichtlich Virulenzfaktoren VTEC/EHEC.

Herstellung und Gewinnung von Referenzmaterial

Abgabe von 18 verschiedenen, monospezifischen veterinärmedizinischen diagnostischen E. coli - Antiseren

(Das NRL-Ec stellt keine Referenzmaterialien im eigentlichen Sinne her. Das obliegt dem WHO-Coli-Centre in Kopenhagen)

Serumherstellung und Austestung

Es wurden 21 neue veterinärmedizinische diagnostische E.coli-Antiserumchargen produziert.

Im Jahre 2001 wurden insgesamt 229 Listeria-Praxisisolate serologisch untersucht und eine Zahl von Listeria-Antiseren zu abgeben.

Beschaffung und Versand von Standardsubstanzen / Vergleichsmaterial

Die Übernahme und Abgabe von Standard- bzw. Vergleichssubstanzen/-Stämmen erfolgten bisher nur innerhalb des BgVV oder zwischen wissenschaftlichen Kooperationspartnern zur Methodensicherung oder Validierung. Es handelte sich dabei um Feldisolate mit kompletter Charakterisierung, die durch Vergleichsuntersuchungen in verschiedenen Labors gesichert wurden.

3.5.3.2.3 Laborvergleichsuntersuchungen

Durchführung und Organisation von Laborvergleichsuntersuchungen

Im Rahmen des Forschungsprojektes 'Parameter für die Identifizierung und Differenzierung von enterohämorrhagischen Escherichia coli (EHEC) in Lebensmitteln und Lebensmittel lie-

fernden Tieren' wurden mit der Universität in Gießen und der Universität in Würzburg Laborvergleichsuntersuchungen (z.T.codiert) zur Methodenoptimierung und Subtypisierung mittels ELISA und PCR durchgeführt.

Das NRL-Ec nahm teil am Ringversuch 'Nachweis von E. coli O157 - Stämmen mittels PCR' Die bundesweite Koordinierung erfolgte durch die Universität in Gießen.

Des Weiteren ist der Vergleich einer quantitativen VTEC-Isolierungsmethode, entwickelt an der Universität in Gießen, mit den in Dessau entwickelten qualitativen Isolierungsmethoden an natürlich infizierten Lebensmitteln zu erwähnen. Die Durchführung und Federführung dieser Vergleichsuntersuchungen erfolgten durch das NRL-Ec.

Zusätzlich wurde an klinischen Stuhlproben, bereitgestellt durch die Universität in Würzburg, die Leistungsfähigkeit der 'Dessauer Methode' im Vergleich zu kommerziellen Testsystemen nachgewiesen. Der Versuchsplan wurde in allen Fällen federführend vom NRL-Ec (Koordinator) aufgestellt.

Teilnahme an Laborvergleichsuntersuchungen

Ausserdem erfolgten Organisation, Durchführung und Auswertung eines bundesweiten Ringversuches zur Aufnahme einer molekularbiologischen Methodenkaskade in die amtliche Methodensammlung nach §35 LMBG (siehe unten).

3.5.3.2.4 Weitere Aktivitäten

- Durchführung von Fachtagungen und -gesprächen
- Konsultation zur Kontrolle der VTEC/EHEC-Diagnostik in Deutschland durch Vertreter der EU-Kommission
- Konsultation im Landesuntersuchungsamt (LUA) Braunschweig zu Fragen der VTEC-Diagnostik und Methodenoptimierung
- Zwei Labordemonstrationen (für LUA Braunschweig und für einen polnischen Kollegen zur Isolierung von VTEC aus Kot mittels 'Dessauer Methode' bzw. DNA - Hybridisierungstechnik)

3.5.3.2.5 Bundesweiter Ringversuch - Basis für die Standardisierung eines molekularbiologischen Verfahrens zur Detektion, Isolierung und Charakterisierung Shigatoxinproduzierenden *E. coli* in Lebensmitteln

Zur Gruppe der Shigatoxin-produzierenden *Escherichia coli* (STEC) gehören die enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC), die beim Menschen gefährliche Krankheiten, wie das lebensbedrohliche Hämolytisch-Urämische Syndrom (HUS), die Hämorrhagische Colitis (HC) oder die Thrombotisch-Thrombocytopenische Purpura (TTP) hervorrufen können. Hauptinfektionsquellen für den Menschen sind rohe, vom Tier stammende Lebensmittel, wie Rinderhackfleisch, Rohmilch und entsprechende Produkte.

Um einen effektiven Verbraucherschutz zu gewährleisten, ist der Einsatz einheitlicher, spezifischer und sensitiver Methoden in den Institutionen des Bundes und der Länder, die sich mit dieser Problematik beschäftigen, notwendig.

Aus diesem Grunde wurde im NRL-Ec des BgVV eine molekularbiologische Methodenkaskade entwickelt, die folgende Teilschritte beinhaltet: bakterielle Anreicherung, PCR-Screening, spezifische Isolierung der STEC aus positiv gescreenten Proben mittels DNA-Hybridisierung, Bestätigung der Isolate als STEC und deren Charakterisierung mittels PCR. Diese Methodenkaskade wurde in der Arbeitsgruppe 'Molekularbiologische Methoden/Mikrobiologie' nach §35 LMBG im BgVV diskutiert und bestätigt.

In enger Zusammenarbeit zwischen dem NRL-Ec des BgVV und dem Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde der Universität in Gießen wurde ein bundesweiter Ringversuch organisiert, dessen Ergebnisse hier vorgestellt werden.

Teilnehmer

Am Ringversuch nahmen insgesamt elf Arbeitsgruppen aus folgenden Instituten teil:
BgVV / NRL-Ec / Dessau

Bundesanstalt für Milchforschung/Institut für Hygiene und Produktsicherheit, Kiel

Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde, Universität Gießen

Institut für Lebensmitteltechnologie, Universität Hohenheim, Stuttgart

Landesuntersuchungsamt für das Gesundheitswesen Nordbayern, Erlangen

Landesuntersuchungsamt für das Gesundheitswesen Südbayern, Oberschleißheim

Staatliches Untersuchungsamt Hessen, Kassel

Landesveterinär- und Lebensmitteluntersuchungsamt, Halle

Staatliches Lebensmitteluntersuchungsamt, Braunschweig

Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt, Freiburg

Fa. Gene-Scan GmbH, Freiburg

Material

Jede Arbeitsgruppe erhielt zehn Hackfleischproben, die für alle Gruppen einheitlich aus zwei Grundmatrices hergestellt wurden. Je fünf Proben für jede Arbeitsgruppe wurden einheitlich mit definierten STEC/EHEC Stämmen in Dosen zwischen 54 KbE und 308 KbE/25g Hackfleisch artifiziell im Labor kontaminiert.

Methoden

Die entsprechenden Fleischproben wurden in einem Zwei-Stufenprozess hinsichtlich ihres Gehaltes an STEC angereichert. Danach wurde 1 ml der Anreicherungskultur so aufgearbeitet, dass die DNA einem PCR-Prozess zugeführt werden konnte. In dieser PCR wurden allgemeine Suchprimer eingesetzt, die alle Subtypen von Shigatoxingenen mit Ausnahme des relativ unbedeutenden stx 2f detektieren (Screening). Damit wurden allgemein Ja/Nein-Aussagen hinsichtlich Gehalt an STEC festgestellt. Aus positiv gescreenten Proben mussten nun die STEC spezifisch unter allen anderen Keimen (Begleitflora) isoliert werden. Hierzu wurde die DNA-Hybridisierungstechnik eingesetzt. Die markierten DNA-Sonden wurden einfach unter Anwendung von Referenzstämmen mittels PCR hergestellt. Nach Isolierung und Bestätigung als STEC wurden die Isolate charakterisiert; das heißt, es waren die Shigatoxingene stx 1 und stx 2 sowie das eae-Gen zu bestimmen. Die einzelnen Details der Methodenkaskade können von NRL-Ec (Dr. Gallien) per [E-mail](#) abgefordert werden.

Diskussion

Die Infektionsdosis für eine EHEC-Infektion ist mit ca. 100 KbE extrem niedrig. Somit ist der Einsatz einheitlicher, spezifischer und vor allem sensitiver Methoden in den Institutionen des Bundes und der Länder, die sich mit der EHEC-Problematik beschäftigen, für die Gewährleistung eines effektiven Verbraucherschutzes notwendig.

Die hier entwickelte molekularbiologische Methodenkaskade wurde nach diesem Ringversuch in die Methodensammlung nach § 35 LMBG aufgenommen. Des Weiteren wird gegenwärtig eine Übernahme als DIN-Vorschrift und im europäischen Rahmen als CEN-Vorschrift geprüft. Die gesamte Arbeitsvorschrift mit allen Detailschritten kann von den Autoren bezogen werden.

Peter Gallien, Angelika Stahl, Michael Bülte

3.5.3.3. Neues porcines Influenzavirus-Isolat (H1N2) als Mehrfachreassortante aus humanen und aviären Virusstämmen identifiziert

Die Arbeiten im Influenzalabor des Fachgebiets "Virale Zoonosen" waren in den letzten Jahren dadurch gekennzeichnet, dass wichtige methodische Entwicklungen im Bereich der PCR-Analytik durchgeführt wurden, die sofort in der molekularen Charakterisierung neuer und alter Virusisolate aus Schweinepopulationen Deutschlands ihre Anwendung fanden. Dies betrifft RT-PCR-Techniken zum direkten subtypunabhängigen Nachweis unbekannter Influenzaviren über das M-Protein-Gen als auch weitere PCR-Reaktionen zur Typisierung von Stämmen und zur Bestimmung von H1- und H3- bzw. auch von N1- und N2- Subtypen. Letztere sind Subtypen, die in der Schweinepopulation regelmäßig zirkulieren und die derzeit auch beim Menschen vorkommen. Die PCR-Amplifikate wurden durch die Sequenzierung überprüft und charakterisiert. Die Einführung dieser Techniken ist nicht nur die Voraussetzung für eine moderne, schnelle und treffsichere Diagnostik dieses sprichwörtlich wandlungsfähigen Virus; sie werden auch im Rahmen der Forschungstätigkeit zur Aufklärung wichtiger zoonotischer Zusammenhänge eingesetzt.

Die Mitarbeiter im Influenzalabor verschaffen sich einen ständig zu aktualisierenden Überblick über die zirkulierenden Stämme, insbesondere unter dem Blickwinkel des Vergleichs der Isolate untereinander und des Vergleichs mit Stämmen aus anderen Spezies. Sie versuchen, sowohl die Mutationsraten als auch veränderte Genmuster zu erkennen. Die Ergebnisse kommen dem Veterinärwesen bei der Bekämpfung dieser Tierseuche zu Gute, über die Klärung zoonotischer Zusammenhänge aber auch der Humanmedizin. Eine zentrale Sammlung und Typisierung der animalen Isolate, ähnlich wie in der Humanmedizin, gibt es zur Zeit noch nicht. Nur damit ist es aber möglich, einen Überblick über die epidemiologische Situation zu erhalten und sowohl Empfehlungen für die Diagnostik als auch für immunprophylaktische Maßnahmen, wie etwa die Aktualisierung von Impfstoffzusammensetzungen, zu geben.

Das Influenzalabor ist bestrebt, zoonotische Beziehungen zu erkennen, zur Klärung von Fragen der Wirtsspezifität und des Überwindens von Wirtsbarrieren beizutragen und einen Überblick über das riesige tierische Reservoir an Influenza-A-Viren zu erreichen. Regelmäßig können Influenzavirussubtypen mit einem Hämagglutinin 1 bzw. 3 in Kombination mit den Neuraminidasen 1 bzw. 2 aus Schweinepopulationen gewonnen werden. Diese Untersuchungen führten zur Klärung der verwandtschaftlichen Beziehungen (Driftresultate) der Isolate. Bei den Arbeiten zur Charakterisierung des H1 konzentrierten sich die Untersuchungen besonders auf ein neues porcines Isolat des Subtyps H1N2. Dabei handelt es sich um eine Erstbeschreibung für Deutschland.

Dieses H1N2-Isolat wurde umfassend charakterisiert. Die Sequenzierung nach Amplifikation in der H1-spezifischen RT-PCR ergab im Sequenzvergleich mit den in der Genbank (NCBI) verfügbaren Sequenzen von Referenzstämmen die größte Homologie mit den H1N2-Isolaten aus England. Die Isolate entsprechen im HA damit ca. 20 Jahre alten humanen Stämmen des Subtyps H1N1. Auch die Neuraminidase ist human-like, sie stammt aus H3N2-Viren. Das interne M-Protein-Gen dagegen konnte als aviär charakterisiert werden. Damit handelt es sich bei diesem Isolat zweifelsfrei um eine Mehrfach-Reassortante. Diese Tatsache unterstreicht die Rolle des Schweins als sogenanntes „mixing vessel“, in dem bei Mehrfachin-

fektion durch die verschiedenen Influenza-A-Viren neue Viren mit unterschiedlichen Genverteilungsmustern und damit veränderter Pathogenität und Immunogenität entstehen können. Das gewonnene Isolat hatte in Schweinen zu deutlichen Erkrankungen und histologischen Veränderungen der Lungen geführt.

Dieses Isolat weicht extrem von den sonst in Deutschland zirkulierenden H1-Isolaten ab, die als „avian-like“ zu charakterisieren sind und die den von anderen Arbeitsgruppen für Europa beschriebenen Stämmen entsprechen.

Die tierischen Influenza A-Viren bilden ein großes Erregerreservoir, das durch Mutationen und Reassortments ständig wächst und sowohl Tiere als auch auf direktem oder indirektem Wege den Menschen bedroht. Eine Kenntnis dieser Vorgänge sollte ebenso Ziel wissenschaftlicher Untersuchungen sein wie ein besseres Verständnis der Mechanismen der Änderung der Rezeptorspezifität und weiterer Viruseigenschaften, das Überwinden von Wirtsbarrieren und die Überwachung der in der Humanpopulation zirkulierenden Stämme. Diese angewandte Forschung mündet direkt ein in die Aktualisierung der diesbezüglichen Diagnostika bzw. Impfstoffe, um alle Teilnehmer dieses zoonotischen Kreislaufs effektiv schützen zu können. Das Beispiel dieser neuen Reassortante H1N2, die sich als neue Linie bei porcinen Influenzaviren zu etablieren scheint, macht erneut deutlich, dass die virologische Überwachung dieser sehr wichtigen viralen Zoonose Influenza als eine permanente Aufgabe begriffen werden muss.

Christina Schrader, Jochen Süß
 Monika Ebel, Henriette Hintelmann, Ute Polster

3.5.3.4 Forschungsbericht: Untersuchungen zur Überlebensfähigkeit von *Trichinella spiralis* in Mettwurst

Zusammenfassung

In experimentellen Untersuchungen wurde die Überlebensfähigkeit von *Trichinella (T.) spiralis* in Mettwurst in Abhängigkeit von der Lagerungszeit geprüft. Zu diesem Zweck wurde Rohwurst aus trichinienhaltigem Schweinefleisch hergestellt und zwischen dem ersten und 15. Tag nach Lagerung auf die Larven-Befallsrate untersucht. Die aus der Wurst isolierten Larven wurden in vitro (Kultivierung in Dulbecco-Medium) auf ihre Vitalität untersucht und anschließend die Ergebnisse mit denen der In-vivo-Prüfung (experimentelle Infektion von Meerschweinchen) verglichen.

Die Larven-Befallsrate nahm in der Rohwurst mit fortschreitender Lagerung vom ersten zum 7. Tag mit 228 bzw. 58 Larven pro Gramm kontinuierlich ab und änderte sich dann bis zum 15. Tag kaum noch. Parallel dazu verringerten sich mit längerer Lagerung auch die Vitalität und Infektiosität der aus der Rohwurst isolierten Larven, wobei in der In-vivo-Untersuchung bis einschließlich des achten Tages Muskellarven im Meerschweinchen nachgewiesen werden konnten.

In frischer Rohwurst werden Trichinenlarven durch die Verarbeitung nicht wirksam abgetötet und können ein Verbraucherrisiko darstellen. Mit zunehmender Lagerung der Rohwurst nimmt das Risiko einer Infektion ab. Aus den Ergebnissen der experimentellen Infektion im Meerschweinchen erwiesen sich diejenigen *Trichinella*-Larven, die aus Mettwurst nach achttägiger Lagerung isoliert wurden, als nicht mehr infektiös. Allerdings sind in der Praxis Rohwürste nach acht Tagen im Allgemeinen bereits verzehrt.

Einleitung

Rohwurst ist als mögliche Quelle für Trichinellose-Erkrankungen beim Menschen hinreichend aus der Literatur bekannt. Eine Infektion ist sowohl über rohes trichinenhaltiges Fleisch aus dem domestischen Zyklus, wie z.B. *T. spiralis* in Schweinefleisch, als auch aus dem silvatischen Zyklus (z.B. *T. britovi*, *T. spiralis* in Wildschweinfleisch, *T. nativa* in Bärenfleisch) möglich. So waren in den USA in den Jahren 1991 bis 1996 unter den 134 aufgeklärten Trichinellose-Fällen 60% auf den Verzehr von Schweinefleisch und 40% auf den Verzehr von Fleisch von Wildtieren (Bär, Wallroß, Puma) zurückzuführen. Bei der Infektionsquelle Schweinefleisch entfielen ca. 90% der Fälle auf Rohwurst. Im Jahr 1990 erkrankten 90 Flüchtlinge aus Südostasien im Bundesstaat Iowa (USA) an Trichinellose, nachdem sie aus frischem kommerziellen Schweinefleisch hergestellte Rohwurst verzehrt. Andere Autoren berichten über einen Trichinellose-Ausbruch in der Provinz Buenos Aires (Argentinien) mit 18 Personen nach dem Verzehr von Rohwurst, die aus Schweinefleisch hergestellt wurde und eine Befallsrate von 5,3 Larven pro g hatte. Im Februar 1997 erkrankten mehrere Personen in der Türkei an Trichinellose, die Wildschweinwurst von einem Wochenmarkt in Istanbul verzehrt hatten. Sichergestellte Wurst enthielt *T. spiralis* mit einer Befallsrate von 22 Larven pro g. Im März 1996 erkrankten in der Provinz Pescara (Italien) zehn Personen nach dem Verzehr von Wildschweinwurst, in der *T. britovi* mit einer Befallsrate von 5,0 Larven pro g nachgewiesen wurde.

Auch in Deutschland waren größere Trichinellose-Ausbrüche beim Menschen zumeist auf den Verzehr von Rohwurst zurückzuführen. So infizierten sich im Jahr 1977 in Ebermannstadt (Bayern) mehr als 70 Personen nach dem Verzehr von aus Wildschweinfleisch hergestellter Rohwurst. Im Jahr 1982 erkrankten in Bitburg (Rheinland-Pfalz) mehr als 400 Personen nach dem Verzehr von frischer Mettwurst, die aus Schweinefleisch hergestellt wurde. Auch beim letzten Ausbruch im Jahr 1998 mit 44 betroffenen Personen in mehreren Städten Nordrhein-Westfalens (NRW), wie u.a. in Bonn und Düsseldorf, konnte als Ursache frische Mettwurst ermittelt werden, die aus frischem Sauennacken und tiefgefrorenem Schweinebauch hergestellt worden war. Da die fragliche Wurst nach der Herstellung und Vermarktung innerhalb von fünf Tagen frisch verzehrt wurde, war es nicht mehr möglich, Mettwurst der betreffenden Produktcharge für spätere Kontrolluntersuchungen sicherzustellen. Die Ermittlung der Infektionsquelle erfolgte anhand epidemiologischer Untersuchungen mit Hilfe einer vom Robert Koch-Institut durchgeführten Fall-Kontrollstudie. Alle erwähnten Ausbrüche waren stets darauf zurückzuführen, dass trichinenhaltiges Wild- bzw. Schweinefleisch nicht oder nicht ordnungsgemäß untersucht, zu Rohwurst verarbeitet und letztendlich zur Infektionsquelle für den Verbraucher wurde.

Die Überlebensfähigkeit von *Trichinella*-Muskellarven in Rohwurst ist von verschiedenen Faktoren abhängig, wobei zwischen produkt- und verfahrensbedingten Faktoren unterschieden werden kann. Hierzu gehören u.a. die Wasseraktivität (a_w) und der Einfluss verschiede-

ner in Rohwurst verarbeiteter Nitritpökelsalze auf das Überleben von *Trichinella*-Muskellarven. Bei Verwendung von Natriumchlorid mit einer Konzentration von 2,5% kann eine Abtötungsrate von bis zu ca. 97% über eine Reifungszeit von 12 Tagen erreicht werden.

Bei der Rohwurstherstellung werden heutzutage neben Nitritpökelsalz auch spezielle Starterkulturen (z.B. Laktobazillen) mit dem Ziel verarbeitet, eine schnellere Reifung mit einer raschen Absenkung des pH-Wertes zu erreichen. Darüber hinaus vermögen diese Starterkulturen eventuell im Fleisch vorhandene pathogene Keime in ihrer Vermehrung zu hemmen. Unter Berücksichtigung dieser Technologie wurde für den eigenen Versuchsansatz Mettwurst gewählt, welche auch Ursache des letzten o.a. Ausbruches in NRW im Jahr 1998 war. Das Ziel bestand darin, die Überlebensfähigkeit von *T. spiralis* in Abhängigkeit von der Lagerungszeit der Rohwurst zu prüfen. Außerdem sollte untersucht werden, ob mit Hilfe einer In-vitro-Methode die Vitalität von *Trichinella*-Larven besser beurteilt werden kann und inwieweit diese Ergebnisse mit denen der Infektiositätsprüfung in vivo verglichen werden können.

Material und Methoden

Zur Gewinnung von trichinösem Schweinefleisch wurde ein Hausschwein experimentell mit 40.000 Larven von *T. spiralis* (BgVV-Stamm) infiziert und nach drei Monaten geschlachtet. Anschließend wurde die Larven-Befallsrate (LpG=Larven pro Gramm Muskulatur) von jeweils 100 g der zur Herstellung der Mettwurst verwendeten Muskelpartien nach der Methode der künstlichen Verdauung im Magnetrührverfahren (Richtlinie 77/96/EWG) bestimmt.

Als Ausgangsmaterial zur Herstellung von frischer Mettwurst diente Schultermuskulatur mit einem Anteil von ca. 60% und einer Larven-Befallsrate von 316 LpG sowie Schweinebauch mit einem Anteil von ca. 40% und einer Larven-Befallsrate von 104 LpG. Dieses Material wurde gewürfelt und nach Zugabe von 2% Nitritpökelsalz, Fertiggewürzmischung mit 8 g pro kg (bestehend aus Zucker, Natriumascorbat und Gewürzextrakt) sowie einer Starterkultur „Biostart“ (Fa. Raps) mit 1 g pro kg Brät gründlich durchmischt. Anschließend erfolgte die Zerkleinerung im Fleischwolf mit einer 3mm-Lochscheibe und nach nochmaliger Durchmischung das Abfüllen in handelsübliche Sterildärme für frische Mettwürste zu jeweils 200 g. Zum Umröten und Reifen wurden diese in eine Klimakammer für 72 h bei 18°C und 90% relativer Luftfeuchtigkeit und danach bei 17°C und 85% relativer Luftfeuchtigkeit bis zum maximal 15. Tag verbracht. Als Kontrolle wurden unmittelbar nach der Herstellung 50 g des Fleischbrätes analog der Mettwurst auf die Larven-Befallsrate und Larven-Vitalität untersucht.

Die Untersuchung der trichininhaltigen Mettwurst erfolgte am 1., 2., 3., 4., 7., 8., 9., 10., 11., 14. und 15. Tag nach Herstellung. Nach der Bestimmung des pH-Wertes wurden 50 g der Mettwurst nach der o.a. Methode im Magnetrührverfahren verdaut und die Larven-Befallsrate in LpG ermittelt. Im Anschluß daran wurden die Trichinenlarven nach fünfmaligem Waschen in Dulbecco-Medium in diesem 2 h bei 37°C inkubiert und die Vitalität der Larven unter dem Stereomikroskop (Objektiv 40x) nach folgenden Kriterien beurteilt:

1. Bewegungsindex (Anteil der sich bewegenden Larven von insgesamt 20 pro Gesichtsfeld beobachteten Larven in %)
2. Bewegungsaktivität (Stärke der Bewegung von „-“, „-/+“ und „+“ bis „+++“)
3. Form der Larven (geschlängelt, spiralförmig, gebogen)

An die Vitalitätsprüfung schloß sich der Tierversuch an, in dem die isolierten Larven auf ihre Infektionsfähigkeit geprüft wurden. Zu diesem Zweck wurden Meerschweinchen mit jeweils 500 Larven aus dem jeweiligen Versuchsansatz experimentell infiziert. Die Sektion und Untersuchung der Muskulatur auf Larven erfolgte sieben bis neun Wochen nach der Infektion. Zur Bestimmung der Larven-Befallsrate erfolgte die trichinoskopische Untersuchung von

insgesamt 28 haferkorngroßen Stückchen aus beiden Zwerchfellpfeilern mit einem Gesamtgewicht von etwa 0,2 g.

Ergebnisse

Unmittelbar nach der Herstellung wurde in 50 g des Fleischbrätes eine Larven-Befallsrate von 195 LpG ermittelt. Die aus dem Brät isolierten Larven hatten einen Bewegungsindex von 95%. Im Dulbecco-Medium wurde die Bewegungsaktivität mit „+++“ beurteilt, wobei alle Larven ein geschlängeltes Aussehen hatten. Die Ergebnisse zur Untersuchung der Mettwurst in Abhängigkeit der Lagerungszeit sind in der **Tabelle 1** dargestellt. Danach nahm die Befallsrate in der Mettwurst mit längerer Lagerung vom ersten zum vierten Tag mit 228 LpG auf 124 LpG um etwa die Hälfte ab und verringerte sich vom vierten zum siebten Reifungstag mit 124 bzw. 58 LpG wiederum um jeweils etwa die Hälfte. Bis zum abschließenden 15. Reifungstag war eine deutlich Veränderung nicht mehr erkennbar. Der pH-Wert in der frischen Mettwurst schwankte über den Gesamtzeitraum der Untersuchung im Bereich von 5,25 und 5,72 nur geringfügig.

Tabelle 1: Ergebnisse zu LpG und pH-Wert in frischer Mettwurst sowie In-vitro und In-vivo-Prüfung der isolierten Larven (1. bis 15. Tag nach Lagerung)

Tag nach Lagerung	LpG in Wurst	pH	Vitalitätsprüfung in Dulbecco-Medium			LpG in Meerschw.
			Bewegungsindex (%)	Bewegungsaktivität	Larvenform	
1	228	5,52	95	+++	geschlängelt	1610
2	208	5,64	90	+++	geschlängelt	n.d.
3	193	5,72	80	++	geschlängelt	1785
4	124	5,63	70	++	geschlängelt	n.d.
7	58	5,57	50	+	spiralförmig	n.d.
8	50	5,53	20	+	spiralförmig	30
9	48	5,65	10	-/+	gebogen	0
10	57	5,25	5	-/+	gebogen	0
11	80	5,53	5	+	gebogen	0
14	79	5,48	5	-/+	gebogen	0
15	60	5,72	5	-/+	gebogen	0

n.d. = nicht durchgeführt

Bei der Vitalitätsprüfung in Dulbecco-Medium lag der Bewegungsindex am ersten Tag nach Lagerung bei 95% und verringerte sich kontinuierlich bis zum 15. Tag auf 5%. Auch das Aussehen der in vitro untersuchten Larven veränderte sich deutlich. Vom ersten bis zum vierten Tag dominierte die geschlängelte Form mit einer starken Bewegungsaktivität von „+++“ (**Abb. 1a**). Im Vergleich dazu waren die Larven, die aus der Mettwurst am siebten und achten Tag nach Lagerung isoliert wurden, bei abgeschwächter Bewegungsaktivität von „+“ spiralförmig aufgerollt (**Abb. 1b**). Zwischen dem neunten und 15. Tag nach Lagerung zeigten die aus der Mettwurst isolierten Larven eine charakteristische halbkreisförmig gebogene Form, wobei in der Mehrzahl der Fälle eine Bewegung mit „-/+“ kaum noch festzustellen war (**Abb. 1c**).



Abb. 1: *T. spiralis*-Larve in Dulbecco-Medium - Prüfung in vitro (1a: geschlängelt; 1b: spiralförmig; 1c: gebogen)

Wie die Ergebnisse der experimentellen Untersuchungen in vivo zeigten, betrug die Befallsrate im Meerschweinchen, die mit Larven aus der Mettwurst nach dem ersten Lagerungstag infiziert wurden, insgesamt 1610 LpG. Die Befallsrate der Larven des dritten Lagerungstages änderte sich mit 1785 LpG kaum. Im Gegensatz dazu nahm die Befallsrate im Meerschweinchen, das mit Larven aus Mettwurst am 8. Tag nach Lagerung infiziert worden war, mit 30 LpG deutlich ab. Im Anschluß daran konnten Muskellarven in den Meerschweinchen, die mit Larven aus der Mettwurst am 9., 10., 11., 14. und 15. Tag nach Lagerung infiziert wurden, nicht nachgewiesen werden.

Diskussion und Schlußfolgerungen

Bei der Verarbeitung des trichinösen Schweinefleisches zu frischer Mettwurst wurde die Larven-Befallsrate durch die mechanische Art und Weise der Zubereitung (Wolfen) nicht wesentlich beeinflusst. Dafür spricht die Tatsache, dass sich die Befallsrate im Fleisch (mit 316 LpG in der Schulter bzw. 104 LpG im Schweinebauch, Durchschnitt ca. 200 LpG) im Vergleich zu der im fertigen Brät mit 195 LpG kaum veränderte.

Durch Zugabe einer Starterkultur bei der Herstellung des Brätes wurde am ersten Tag nach der Lagerung in der Mettwurst ein pH-Wert von 5,52 erreicht, der sich in den Folgetagen nicht mehr wesentlich änderte. Offenbar wurde im Prozeß der Reifung der Mettwurst unter dem Einfluß des Nitritpökelsalzes und dem sauren pH-Wert die Kutikula der *Trichinella*-Larven mit zunehmender Lagerungszeit mehr und mehr geschädigt. Dieses würde auch erklären, dass sich die Befallsrate in der Mettwurst vom ersten Tag mit 228 LpG zum achten Lagerungstag mit 50 LpG deutlich verringerte. In welcher Art eine Schädigung der Kutikula erfolgt und dadurch die Larve den Vorgang der künstlichen Verdauung nicht mehr überstehen kann, muß durch weitergehende Untersuchungen abgeklärt werden.

Nach den Ergebnissen des Larven-Vitalitätstests in Dulbecco-Medium nahm die Vitalität der Larven, die aus der Mettwurst isoliert wurden, mit längerer Lagerungszeit deutlich ab. Mit Hilfe einer kombinierten Beurteilung von Bewegungsindex, Bewegungsaktivität und Larvenform war eine gute Aussage über die Vitalität der *Trichinella*-Larven möglich. Aus den Ergebnissen der experimentellen Infektion im Meerschweinchen erwiesen sich diejenigen *Trichinella*-Larven, die aus Mettwurst nach achttägiger Lagerung isoliert wurden, als nicht mehr infektiös. Aus dem Vergleich der Ergebnisse der Untersuchungen in vitro und in vivo kann ein enger Zusammenhang zwischen der Vitalität und Infektiosität der Larven vermutet werden. Danach erwiesen sich *Trichinella*-Larven, die in der Vitalitätsprüfung einen Bewegungsindex von weniger als 20% hatten und bei gebogener Larvenform kaum noch beweglich waren, im Tierversuch als nicht mehr infektiös. Inwieweit der Larven-Vitalitätstest in Dulbecco-Medium als In-vitro-Methode eine zuverlässige Aussage liefert und letztendlich auch

als Alternative zum klassischen Tierversuch (In-vivo-Methode) eingesetzt werden kann, muß in vergleichenden experimentellen Studien weiter untersucht werden.

Bezüglich der Risikobewertung von *Trichinella*-Larven in Mettwurst lassen sich folgende Schlußfolgerungen ableiten:

- Sofern es zur Verarbeitung von trichinenhaltigem Schweinefleisch zu frischer Mettwurst kommt, werden die Larven durch die Technologie der Verarbeitung nicht wirksam abgetötet und können ein Risiko für den Verbraucher darstellen.
- Mit zunehmender Lagerung der frischen Mettwurst verringern sich die Larven-Befallsrate, Vitalität und Infektiosität der *Trichinella*-Muskellarven, wobei eine Inaktivierung des Erregers nach einer Lagerung von mehr als acht Tagen möglich ist.
- Da frische Mettwurst nach dem Kauf i.d.R. frisch verzehrt wird (die Zeitspanne zwischen Herstellung, Lagerung und Verzehr beträgt meist nur wenige Tage), ist die Wahrscheinlichkeit einer wirksamen Inaktivierung der Larven zum Verzehrzeitpunkt eher gering.

Karsten Nöckler, Harald Kolb

3.5.4. Mitarbeit in internationalen Gremien

Europäischer Koordinator des Food PCR Projekts für Salmonellen

Vorsitz verschiedener Arbeitsgruppen zur Erfassung der Resistenz bei Salmonellen (AR-BAO)

Das CRL-E (Gemeinschaftliches Referenzlabor für die Epidemiologie der Zoonosen) arbeitet entsprechend seiner Aufgabenstellung in allen Bereichen eng mit den Mitgliedsstaaten der Europäischen Union zusammen.