

DOI 10.17590/20170911-122344

## Botulismus-Risiko durch gesalzene und getrocknete Plötzen

Stellungnahme Nr. 026/2017 des BfR vom 11. September 2017

Botulismus ist eine schwere Erkrankung, die durch Botulinum-Neurotoxine ausgelöst wird. Diese Neurotoxine werden vor allem von Bakterien der Spezies *Clostridium botulinum* gebildet und über Nahrungsmittel aufgenommen. Die Erkrankung führt in der Regel zu spezifischen neurologischen Störungen, z. B. Sehstörungen, Mundtrockenheit, Sprech- und Schluckstörungen, und kann tödlich verlaufen.

In Deutschland und Spanien wurden Ende 2016 mehrere humane Botulismus-Fälle gemeldet, die auf den Verzehr von gesalzene und getrocknete Plötzen zurückzuführen waren. Nach Bekanntwerden der Botulismus-Fälle wurde die verdächtige Ware aus den belieferten Unternehmen zurückgerufen, und in den betroffenen Staaten öffentlich vor dem Verzehr gewarnt. Aus diesem Anlass hat das Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) auf der Basis von Literaturstudien und mathematischen Modellierungen das Vorkommen und Verhalten von *Clostridium botulinum* in ausgenommenen und nicht ausgenommenen, gesalzene und getrocknete Plötzen abgeschätzt.

Das Risiko für den Menschen, an Botulismus zu erkranken, ist abhängig vom Gesundheitszustand der gefangenen Plötzen, von der weiteren Behandlung und Verarbeitung der Fische sowie von der Art des Verzehrs. Die Ergebnisse zeigen, dass *Clostridium botulinum* Typ E in niedriger Konzentration im Darm von Plötzen vorkommen kann, sich dann dort vermehrt und Botulinum-Neurotoxine bilden kann, ohne dass der Fisch erkennbar verdirbt. Abhängig von der Lagertemperatur und der Art der Weiterverarbeitung bis zum Verzehr der Fische ist es möglich, dass sich die Bakterien weiter vermehren und Neurotoxine bilden. Durch ausreichende Kühlung sowie das richtige Salzen und Trocknen der Fische und dem damit verbundenen deutlich reduziertem Wassergehalt kann die Vermehrung und Toxinbildung auch gestoppt werden. Das Risiko, an Botulismus zu erkranken, steigt, wenn Innereien von nicht ausreichend erhitzten Plötzen mitverzehrt werden.

Deshalb rät das BfR, Plötzen zeitnah nach dem Fang sorgfältig und vollständig auszunehmen und danach innen und außen gründlich zu waschen. Außerdem sollten Plötzen bis zur Salzung bei maximal 3 °C gelagert, während einer mehrtägigen Salzung zusätzlich gekühlt und vor einer Trocknung oberhalb von 8 °C ausreichend gesalzen werden. Verbraucherinnen und Verbrauchern rät das BfR, gesalzene und getrocknete Plötzen nur zu verzehren, wenn diese vorher für mindestens zehn Minuten einer Kerntemperatur von 85 °C oder darüber ausgesetzt waren. Zudem sollten keine Innereien von nicht ausreichend erhitzten Plötzen gegessen werden.

Da dem BfR weder Daten zur Herstellung der beanstandeten Chargen noch zur Häufigkeit des Verzehrs von gesalzene und getrocknete Plötzen vorliegen, ist eine umfassende wissenschaftliche Risikobewertung nicht möglich. Die vorliegende Bewertung berücksichtigt die Unsicherheiten bezüglich der Herstellungsverfahren, die sehr unterschiedlich sein können, sowie hinsichtlich der Prognosemodelle. Derzeit liegen keine experimentellen Studien zum Verhalten von *Clostridium botulinum* entlang der Prozesskette von ausgenommenen und nicht-ausgenommenen gesalzene und getrocknete Plötzen vor.

|                                   |   | <b>BfR-Risikoprofil:<br/>Botulismus durch gesalzene und getrocknete Plötzen<br/>(Stellungnahme Nr. 026/2017)</b> |   |   |   |
|--|---|--|---|---|---|
| <b>A Betroffen sind</b>  | <b>Allgemeinbevölkerung</b>   |  |   |   |  |
| <b>B Wahrscheinlichkeit von Botulismus-Fällen durch den Verzehr von gesalzene und getrockneten Plötzen[1]</b>      | Praktisch ausgeschlossen  | Unwahrscheinlich   | Möglich   | Wahrscheinlich  | Gesichert   |
| <b>C Schwere der gesundheitlichen Beeinträchtigung durch den Verzehr von gesalzene und getrockneten Plötzen[2]</b> | Keine Beeinträchtigung  | Leichte Beeinträchtigung   | Mittelschwere Beeinträchtigung                                    | Schwere Beeinträchtigung  |   |
| <b>D Aussagekraft der vorliegenden Daten[3]</b>  | Hoch:<br>Die wichtigsten Daten liegen vor und sind widerspruchsfrei |  | Mittel:<br>Einige wichtige Daten fehlen oder sind widersprüchlich | Gering:<br>Zahlreiche wichtige Daten fehlen oder sind widersprüchlich |   |
| <b>E Kontrollierbarkeit durch Verbraucher[4]</b>   | Kontrolle nicht notwendig   | Kontrollierbar durch<br>Vorsichtsmaßnahmen   | Kontrollierbar durch Verzicht                                     | Nicht kontrollierbar  |   |

Dunkelblau hinterlegte Felder kennzeichnen die Eigenschaften des in dieser Stellungnahme bewerteten Risikos (nähere Angaben dazu im Text der Stellungnahme Nr. 026/2017 des BfR vom 11. September 2017).

**Erläuterungen**

Das Risikoprofil soll das in der BfR-Stellungnahme beschriebene Risiko visualisieren. Es ist nicht dazu gedacht, Risikovergleiche anzustellen. Das Risikoprofil sollte nur im Zusammenhang mit der Stellungnahme gelesen werden.

**Zeile B – Wahrscheinlichkeit der gesundheitlichen Beeinträchtigung**

[1] – Die Wahrscheinlichkeit an Botulismus zu erkranken, ist abhängig davon, ob und in welchen Mengen die gesalzene und getrocknete Plötze Bakterien des Typs *Clostridium botulinum* enthalten, sowie von der weiteren Verarbeitung und von der Art des Verzehrs. Das Risiko steigt beim Verzehr unzureichend erhitzter Plötzen sowie beim Verzehr der Fischinnereien.

**Zeile C – Schwere der gesundheitlichen Beeinträchtigung**

[2] – Die Schwere der Erkrankung ist abhängig vom Typ und der Menge der aufgenommenen Botulinum-Neurotoxine. Leichte Krankheitsverläufe mit Magen-Darm Symptomen bis hin zu Todesfällen sind möglich.

**Zeile D – Aussagekraft der vorliegenden Daten**

[3] – Dem BfR liegen weder Informationen zur Häufigkeit des Verzehrs von Plötzen noch zu den Verarbeitungsprozessen vor, die je nach Herstellern unterschiedlich sein können. Gleiches gilt für experimentelle Studien, die nötig wären, um das Verhalten von *Clostridium botulinum*-Stämmen und Botulinum-Neurotoxinen entlang der Prozesskette der gesalzene und getrocknete Plötzen besser abschätzen zu können.

**Zeile E - Kontrollierbarkeit durch Verbraucher**

[4] – Die Angaben in der Zeile „Kontrollierbarkeit durch Verbraucher“ sollen keine Empfehlung des BfR sein, sondern haben beschreibenden Charakter. Das BfR hat in seiner Stellungnahme Handlungsempfehlungen abgegeben: Das BfR empfiehlt die Kühlkette einzuhalten, gesalzene und getrocknete Plötzen nur nach ausreichender Erhitzung zu verzehren und auf den Verzehr von Fischinnereien zu verzichten. Die Hersteller sind für die Qualität der Plötzen-Produkte verantwortlich. Da die Vermehrung von *Clostridium botulinum* Typ E nicht zu Verderbserscheinungen führt, ist dies weder für Lebensmittelunternehmer noch für Konsumenten erkennbar.

## 1 Gegenstand der Bewertung

In Deutschland und Spanien wurden Ende 2016 mehrere humane Botulismus-Fälle gemeldet, die auf den Verzehr von gesalzenen und getrockneten Plötzen zurückzuführen waren. Das BfR hat vor dem Hintergrund dieses Ausbruchsgeschehens das Risiko bewertet, dass sich in ausgenommenen und nicht ausgenommenen Plötzen Botulinum-Neurotoxine (BoNT) bilden.

Die Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA) hat im Dezember 2016 gemeinsam mit dem Europäischen Zentrum für Krankheitsverhütung und -kontrolle (ECDC) die Ergebnisse der Ausbruchsuntersuchung in einem Bericht zusammengefasst<sup>1</sup>. Die epidemiologische Untersuchung ergab, dass alle erkrankten Personen osteuropäischer Abstammung waren. In einigen osteuropäischen Staaten ist es üblich, gesalzene und getrocknete Plötzen traditionsgemäß ohne Erhitzung zu verzehren. In Resten der verzehrten Plötzen, die in Deutschland im Haushalt eines Erkrankten entnommen wurden, konnte das Gen für BoNT Typ E, aber nicht das Neurotoxin, nachgewiesen werden. Das ursächliche Produkt wurde in zahlreiche europäische Staaten vertrieben und überwiegend in Geschäften, die auf osteuropäische Lebensmittel spezialisiert sind, zum Verkauf angeboten. Nach Bekanntwerden der Botulismus-Fälle wurde die verdächtige Ware aus den belieferten Unternehmen zurückgerufen, und in den betroffenen Staaten wurde öffentlich vor dem Verzehr gewarnt. Im Dezember 2016 wurde bekannt, dass in einer Probe einer zurückgerufenen Charge gesalzener und getrockneter Plötzen BoNT Typ E nachweisbar war. Diese Probe wurde in Spanien anlässlich der dort aufgetretenen Botulismus-Fälle im Einzelhandel entnommen.

Gemäß Verordnung (EG) Nr. 853/2004, Anhang I, Nr. 7.4 ist gesalzene und getrocknete Plötze ein verarbeitetes Fischereierzeugnis, das in der vorliegenden Stellungnahme als „Fischerzeugnis“ bezeichnet wird.

Dem BfR liegen weder Informationen zur Herstellung und Behandlung der zurückgerufenen Chargen noch Daten zur Häufigkeit des Verzehrs dieser Fischerzeugnisse vor. Darüber hinaus zeigen die in das Europäische Schnellwarnsystem für Lebensmittel und Futtermittel (RASFF) eingestellten Informationen über die zurückgerufenen Chargen, dass die Herkünfte, Herstellungs- und Verpackungsarten sowie die Haltbarkeitsfristen und notwendigen Lagertemperaturen von gesalzenen und getrockneten Plötzen unterschiedlich sind.

Um dennoch das Vorkommen und Verhalten von *Clostridium botulinum* in gesalzenen und getrockneten Plötzen abschätzen zu können, hat das BfR Literaturstudien durchgeführt und modellbasierte Abschätzungen auf Basis bestehender prädiktiver mikrobieller Modelle vorgenommen.

## 2 Ergebnis

Neben *Clostridium (C.) botulinum* besitzen auch einige *C. butyricum*- und *C. baratii*-Stämme die Fähigkeit, Neurotoxine zu bilden. Da Letztere für die gesundheitliche Bewertung von gesalzenen und getrockneten Plötzen von untergeordneter Bedeutung sind, hat sich das BfR auf die Betrachtung des Wachstums und der Toxinbildung von *C. botulinum* in frischen und verarbeiteten Plötzen beschränkt.

*C. botulinum* Typ E kann in niedrigen Konzentrationen im Darm von Plötzen vorkommen, sich dort vermehren und BoNT bilden. Außerdem ist es möglich, dass an Botulismus erkrankte und gestorbene Plötzen zu Lebensmitteln verarbeitet werden. Abhängig von der weiteren Behandlung der Plötzen und den angewandten Verfahren zur Haltbarmachung kann

*C. botulinum* Typ E in den Plötzen bis zum Verzehr weiter wachsen und Neurotoxine bilden. In stark gesalzenen und getrockneten Plötzen mit deutlich reduzierter Wasseraktivität ( $a_w$ -Wert<sup>1</sup>  $\leq 0,93$ ), ist eine Vermehrung von *C. botulinum* jedoch unwahrscheinlich.

Die Vermehrung von *C. botulinum* Typ E führt nicht zu Verderbserscheinungen und ist daher weder für Lebensmittelunternehmer noch für Konsumenten erkennbar. Deshalb ist es möglich, dass Menschen BoNT-haltige Plötzen verzehren. Je größer die Mengen an BoNT in den von Menschen verzehrten Plötzen sind, desto wahrscheinlicher ist es, dass Botulismus-Fälle auftreten und desto schwerer werden die Krankheitsverläufe sein. Todesfälle sind möglich. Das Botulismusrisiko des Menschen steigt noch weiter an, wenn die Innereien der nicht ausgenommenen, gesalzenen und getrockneten Plötzen mitverzehrt werden, da *C. botulinum* und BoNT Typ E vor allem im Darm der Fische vorkommen.

Nach dem Ergebnis der im BfR durchgeführten Literaturstudien und modellbasierten Abschätzungen sind aus mikrobiologischer Sicht die nachfolgenden Maßnahmen geeignet, die Wahrscheinlichkeit der Bildung von BoNT und anderen bakteriellen Toxinen in und auf Plötzen zu reduzieren. Jede einzelne dieser Maßnahmen kann dazu beitragen, das Botulismusrisiko des Menschen und das Risiko für andere lebensmittelbedingte Intoxikationen durch gesalzene und getrocknete Plötzen zu minimieren.

1. Frische Plötzen bei Temperaturen von  $\leq 3$  °C lagern
2. Plötzen, die durch Salzen und Trocknen haltbar gemacht werden sollen, zeitnah nach dem Fang sorgfältig und vollständig ausnehmen; danach innen und außen gründlich waschen
3. Plötzen, die über mehrere Tage gesalzen werden, vorsichtshalber zusätzlich kühlen
4. Plötzen, die mehrere Tage bei Temperaturen oberhalb von 8 °C getrocknet werden sollen, vorher ausreichend salzen, um eine Vermehrung von *C. botulinum* Typ E während der Trocknung durch Senkung der Wasseraktivität auf einen  $a_w$ -Wert von  $\leq 0,97$  auszuschließen
5. Gesalzene und getrocknete Plötzen vor der Abgabe an Verbraucherinnen und Verbraucher ausreichend stabilisieren ( $a_w$ -Wert im Zentrum der dicksten Stelle des Fisches  $\leq 0,85$ ), um auch eine Vermehrung von anderen bakteriellen Toxinbildnern, insbesondere *Staphylococcus aureus*, während der ungekühlten Lagerung zu verhindern
6. Gesalzene und getrocknete Plötzen nur nach ausreichender Erhitzung verzehren (z. B. mindestens zehn Minuten auf mindestens 85 °C Kerntemperatur erhitzen)
7. Keine Innereien von nicht ausreichend erhitzten Plötzen verzehren

Eine detaillierte Bewertung der Vermehrung und Neurotoxinbildung von *C. botulinum* in ausgenommenen und nicht ausgenommenen, gesalzenen und getrockneten Plötzen war dem BfR aufgrund fehlender Tenazitäts- und Prozessierungsdaten nicht möglich. Aus dem gleichen Grund kann das BfR auch keine spezifischeren Risikominimierungsmaßnahmen empfehlen.

<sup>a</sup>  $a_w$ -Wert: activity of water; Maß für die Verfügbarkeit von Wasser in Lebensmitteln und/oder Speisen. Je größer der  $a_w$ -Wert, desto mehr Wasser steht dem Wachstum/Stoffwechsel von Bakterien zur Verfügung.

### 3 Begründung

#### 3.1 Risikobewertung

##### 3.1.1 Mögliche Gefahrenquelle

###### 3.1.1.1 *Clostridium botulinum*

*C. botulinum* ist ein grampositives, strikt anaerob wachsendes, sporenbildendes Stäbchenbakterium. *C. botulinum* ist weltweit verbreitet, wobei in verschiedenen geografischen Regionen Neurotoxinbildner unterschiedlichen Typs vorkommen können<sup>2</sup>. Seine Sporen finden sich im Erdboden, in Sedimenten von Gewässern und bei praktisch allen Lebensmitteln tierischen und vor allem pflanzlichen Ursprungs<sup>3</sup>. Das Bakterium wird außerdem im Magen-Darm-Trakt gesunder Menschen und Tiere gefunden.

*C. botulinum*-Stämme werden in die Gruppen I bis IV eingeteilt, von denen aber nur die Gruppen I und II lebensmittelhygienisch relevant sind.

Entsprechend der Ausbildung verschiedener Neurotoxintypen, die bisher mit den Buchstaben A bis G bezeichnet wurden, werden die Stämme noch weiter untergliedert. Vor wenigen Jahren wurde in den USA ein weiterer Toxintyp (H) entdeckt<sup>4</sup>.

*C. botulinum*-Stämme der Gruppe I können ein oder mehrere der Toxintypen A, B und F bilden, während solche der nicht-proteolytischen Gruppe II nur jeweils eines der Toxintypen B, E oder F exprimieren. Während das Typ B-Toxigen auf kleinen Plasmiden codiert vorliegt, ist das Typ F-Toxigen ausschließlich chromosomal codiert. Das Typ E-Toxigen ist überwiegend chromosomal codiert, kann aber auch auf Plasmiden vorkommen<sup>5</sup>. Sequenzunterschiede auf Nukleotid- und Aminosäureebene innerhalb der Serotypen A, B, E und F führten zu einer weiteren Unterteilung dieser Serotypen in Subtypen. Unter Berücksichtigung der Mosaikformen der Serotypen C und D sind mittlerweile 41 Subtypen bzw. genetische Varianten bekannt<sup>5</sup>.

Die proteolytischen Stämme der Gruppe I vermehren sich bei Temperaturen zwischen 10 °C und 42 °C und unter strikt anaeroben Bedingungen ab einem pH-Wert von 4,6. Nicht-proteolytische Stämme der Gruppe II werden erst unterhalb von 3,3 °C im Wachstum unterdrückt<sup>3</sup>. Es gilt generell, dass die Zeit (und die Variabilität) zur Auskeimung und zur ersten Verdopplung von *C. botulinum* von der Zellhistorie (Behandlung) und den konkreten Wachstumsbedingungen abhängt<sup>6</sup>. Unter anaeroben Bedingungen und bei ausreichendem Nährstoffangebot sind die Bakterien in der Lage, während der Vermehrung BoNT zu bilden. Klassisches Beispiel hierfür sind nicht ausreichend erhitzte Konserven. Als Präventionsmaßnahme werden Konserven bei der Herstellung sehr hoch erhitzt (sog. Botulinumkochung, 121 °C für drei Minuten). Sporen von Stämmen der Gruppe I sind deutlich hitzeresistenter als von Stämmen der Gruppe II. Angaben zu D<sup>2</sup>- und z-Werten<sup>3</sup> finden sich in einer Übersicht von Brown (2000)<sup>7</sup>. Bei nicht oder nicht ausreichend hitzebehandelten Lebensmitteln muss besonderer Wert auf die Einhaltung der Kühlkette gelegt werden, da die Auskeimung von Sporen durch Kühlung verzögert oder unterbunden werden kann<sup>8</sup>.

Die Expression der Neurotoxine erfolgt bei nicht-proteolytischen Typ B-Stämmen bei Eintritt in die früh-exponentielle Phase<sup>9</sup>. BoNT Typ E wird ebenfalls während der exponentiellen

<sup>b</sup> Der D-Wert ist die Zeitspanne, die bei einer gegebenen Temperatur zur Reduktion einer Mikroorganismenpopulation auf 10 % erforderlich ist.

<sup>c</sup> Der z-Wert ist die Temperaturerhöhung, die erforderlich ist, um die Abtötungszeit auf 1/10 zu verringern.

Wachstumsphase gebildet, wobei die Toxinexpression in der späten Exponentialphase am höchsten ist<sup>10</sup>.

*C. botulinum* Typ E ist in der Regel mit dem aquatischen Milieu assoziiert<sup>11</sup> und weist eine hohe genetische Variabilität auf<sup>12-14</sup>. Lebensmittelbedingte Ausbrüche von *C. botulinum* Typ E wurden in der Vergangenheit dementsprechend oft durch Fisch und Fischerzeugnisse verursacht, die unter verschiedenen Bedingungen gelagert und prozessiert wurden, die Wachstum und Toxinproduktion zulassen.

Stämme der Gruppe III (Typen C und D) treten hauptsächlich beim Botulismus von Wasser- und Hausgeflügel (Typ C) sowie bei weiteren (Haus)-Säugetieren (Typ D und C) in Erscheinung<sup>15, 16</sup>. Die Gruppe IV wurde mittlerweile einer eigenen Spezies, *C. argentinense*, zugeordnet und ist bislang weder für das Tier noch für den Menschen als pathogen beschrieben.

### 3.1.1.2 Weitere Neurotoxinbildende *Clostridium* spp.

Neben *C. botulinum* besitzen auch einige *C. butyricum*- und *C. baratii*-Stämme die Fähigkeit, Neurotoxine zu bilden<sup>17</sup>. So wurde für *C. butyricum* die Möglichkeit der Bildung von BoNT Typ E beschrieben.

Eine in Großbritannien durchgeführte Studie ergab, dass in 31 % der 978 untersuchten Lebensmittelproben *C. butyricum* nachweisbar war, jedoch keines der Isolate die genetische Ausstattung zur Bildung von BoNT Typ E besaß<sup>18</sup>.

Ein Wachstum nicht-toxinbildender Stämme von *C. butyricum* wurde ab einer Temperatur von 8 °C beobachtet<sup>19</sup>. Toxinbildende Stämme benötigen für ihr Wachstum etwas höhere Temperaturen (10-11 °C). Sie ähneln damit in ihrem Verhalten eher proteolytischen *C. botulinum*-Stämmen, was ein Grund für die geringere Relevanz bezüglich lebensmittelbedingter Intoxikationen sein könnte<sup>20</sup>. In künstlich kontaminierten Lebensmitteln war BoNT Typ E erstmals nach 15 Tagen bei 12 °C bzw. fünf Tagen bei 25 °C nachweisbar<sup>21</sup>, was ebenfalls eher proteolytischen als nicht-proteolytischen *C. botulinum*-Stämmen ähnelt. Die Angaben zur Säureresistenz von *C. butyricum* sind unterschiedlich. Die minimalen pH-Werte, die Wachstum ermöglichen, liegen zwischen 4,2 und 5,2<sup>19-21</sup>. Der niedrigste  $a_w$ -Wert, der noch Wachstum zulässt, liegt nach Ghodduzi et al. (2013)<sup>20</sup> bei 0,96.

## 3.1.2 Gefährdungspotenzial/Charakterisierung der Gefahr

### 3.1.2.1 Botulismus

Die durch BoNT hervorgerufene Vergiftung wird als Botulismus bezeichnet. Während BoNT der Typen A, B, E und F Botulismus beim Menschen hervorrufen, werden BoNT Typ C und BoNT Typ D häufig mit Botulismus bei Rindern und Geflügel assoziiert. Trotz seiner Toxizität wurde BoNT Typ G bisher noch nicht mit natürlich vorkommendem Botulismus in Verbindung gebracht.

BoNT werden vom Menschen oral über den Verzehr von kontaminierten Lebensmitteln aufgenommen, eine Übertragung von Mensch zu Mensch findet nicht statt. Die klinischen Symptome beginnen nach einer Inkubationszeit von 12 Stunden bis zu wenigen Tagen zunächst unspezifisch mit Übelkeit, Erbrechen und Magen-Darmstörungen. Dann zeigen sich die für den humanen Botulismus spezifischeren Symptome wie Doppelsehen, Pupillenstarre, Sprachstörungen und später Atemlähmung und Ersticken bei vollem Bewusstsein. Der Tod kann innerhalb von 24 Stunden nach Erkrankungsbeginn eintreten<sup>11</sup>.

BoNT sind Neurotoxine, welche die Freisetzung des gebundenen Neurotransmitters Acetylcholin im peripheren Nervensystem verhindern und zu Lähmungserscheinungen führen. BoNT Typ A verfügt über die höchste Toxizität beim Menschen. Es handelt sich um die giftigste bekannte Substanz. Die tödliche Dosis für einen gesunden Erwachsenen liegt bei den als humanpathogen beschriebenen BoNT Typen (A, B, E und F) zwischen 0,1 und 1 µg Toxin pro Person<sup>22, 23</sup>. Andere Autoren nennen für die BoNT Typen E und F als Dosis, die beim Menschen Krankheitssymptome auslöst, ungefähr 10 µg<sup>24</sup>. Die Mortalität bei lebensmittelbedingtem Botulismus liegt bei ungefähr 10 %<sup>25</sup>.

BoNT werden auch zur Therapie von verschiedenen Erkrankungen eingesetzt. In einer Studie ließen sich Freiwillige BoNT Typ A oder Typ E injizieren. Als Ergebnis zeigte sich, dass die Paralyse des Muskels bei Injektion von BoNT Typ E weniger lange anhielt als bei Injektion von BoNT Typ A<sup>26</sup>. Dies könnte erklären, warum Erkrankungen durch BoNT Typ E im Vergleich zu Erkrankungen durch BoNT Typ A als weniger schwer wahrgenommen werden. Eine Untersuchung von 309 Botulismusfällen, die durch unterschiedliche Toxin-Typen verursacht wurden, zeigte Unterschiede in der Schwere der klinischen Symptomatik. Bei Patienten mit Typ A-Botulismus mussten 67 % der Personen künstlich beatmet werden. Im Gegensatz hierzu waren es bei Typ B-Botulismus 52 % und bei Typ E-Botulismus nur 39 % der Patienten, die eine künstliche Beatmung benötigten<sup>27</sup>.

Darüber hinaus kommen bei Kleinkindern im Alter von bis zu zwölf Monaten Fälle des Säuglingsbotulismus vor. Dabei keimen mit der Nahrung aufgenommene Sporen von *C. botulinum* im Darm aus, vermehren sich aufgrund der noch unzureichend entwickelten Darmflora und bilden BoNT. Die Hauptinfektionsquelle ist Honig<sup>3</sup>. Auch in Deutschland wurden in den vergangenen Jahren einzelne Fälle von Säuglingsbotulismus gemeldet.

Eine weitere Erkrankungsform ist der Wundbotulismus. Dieser kann auftreten, wenn *C. botulinum* über großflächige Wunden in den Körper gelangt und unter anaeroben Bedingungen BoNT bildet, die dann in den Blutkreislauf gelangen. Gelegentlich treten solche Erkrankungsformen bei drogenabhängigen Personen auf, wenn es durch kontaminierte Kanülen zu einer Übertragung der Bakterien kommt<sup>28</sup>.

Botulismus ist eine selten auftretende, aber sehr schwer verlaufende Erkrankung. Die Abfrage der Foodborne Outbreak Online Database der USA listet insgesamt nur 17 bestätigte Ausbrüche in den Jahren 2010 bis 2015, die durch BoNT ausgelöst wurden. Hierbei erkrankten 80 Personen, 67 wurden hospitalisiert und vier Personen starben. Eine Unterscheidung, durch welche Toxin-Typen die Erkrankungen ausgelöst wurden, ist nicht möglich. An diesen Ausbrüchen beteiligte Lebensmittelvehikel aus dem Bereich Fisch waren „salted salmon“, „fish eggs“, „fermented fish heads“ und „flipper“<sup>29</sup>.

Auch in Europa kommt Botulismus nur selten vor. Zwischen 2010 und 2015 wurden jährlich 85-137 bestätigte Fälle an das ECDC übermittelt, die meisten aus Italien und Rumänien<sup>1</sup>. Der BoNT Typ wird seit 2013 erfasst; in den Jahren 2013/2014 erkrankten vier Personen an BoNT Typ E, im Jahr 2015 wurden keine BoNT Typ E-Fälle übermittelt. In den Jahren 2010 bis 2015 wurden außerdem 51 bestätigte lebensmittelbedingte Krankheitsausbrüche, die durch BoNT ausgelöst wurden, an die EFSA übermittelt. Nur selten lag die Angabe der BoNT Typen vor (sieben Ausbrüche), BoNT Typ E wurde nicht als Ausbruchsagens gemeldet. Die größte Anzahl von Ausbrüchen wurde im Jahr 2015 mit 15 Ausbrüchen registriert. Nur bei zwei Ausbrüchen (je ein Ausbruch in 2010 und 2013) wurde „fish and fishery products“ als Vehikel angegeben. Am häufigsten wurden die Kategorien „Canned food products“ (9), „Pig meat and products thereof“ (9), „Vegetables and juices and other products thereof“ (7) sowie „Other meat and meat products“ (7) genannt<sup>1, 29</sup>.

In Deutschland wurden in den Jahren 2010 bis 2015 insgesamt 38 humane Botulismusfälle (0-9 pro Jahr) an das Robert Koch-Institut übermittelt. Im Jahr 2016 wurden 14 Fälle gemeldet<sup>30</sup>. Im Rahmen des Bundesweiten Systems zur Erfassung von Daten zu Lebensmitteln, die an lebensmittelbedingten Krankheitsausbrüchen beteiligt sind (BELA), wurden zwischen 2010 und 2015 insgesamt zwei Ausbrüche durch BoNT erfasst<sup>31, 32</sup>. Bei einem Ausbruch im Jahr 2010 konnte kein Lebensmittelvehikel ermittelt werden und bei dem zweiten Botulismus-Ausbruch im Jahr 2014 war ein im Privathaushalt hergestellter Bohnensalat Auslöser der Erkrankungsfälle<sup>33, 34</sup>.

Eine Betrachtung der veröffentlichten Literatur zeigt, dass Botulismus nach wie vor typischer Weise durch den Verzehr von im Privathaushalt selbst hergestellten Konserven, nicht ausreichend gepökeltem Schinken oder vakuumverpackten Fischerzeugnissen ausgelöst wird<sup>23, 35</sup>. In der Literatur wird über Jahrzehnte hinweg immer wieder über Fälle von Botulismus durch Lebensmittel aus Fisch oder Meeressäugern berichtet, die häufig traditionell hergestellt und von verschiedenen Volksgruppen verzehrt wurden. Oft handelte es sich dabei um nicht ausgenommene, ganze Fische, die in Salz und/oder Salzlake gereift wurden. Häufig erfolgte die Reifung ungekühlt und im Freien (Lufttrocknung). Die Produkte wurden nach der Herstellung in der Regel ohne weitere Erhitzung verzehrt<sup>36</sup>.

Ein sehr großer Ausbruch ereignete sich im April 1991 in Kairo. Nach dem Verzehr von Faseikh (auch als Fesikh bezeichnet), der in einem Geschäft in Kairo erworben wurde, erkrankten 91 Personen an Botulismus, 18 Personen starben. In klinischen Proben und Fischproben, die von demselben Vertreiber stammten, konnte BoNT Typ E nachgewiesen werden. Faseikh ist ein traditionell ägyptisches Lebensmittel, welches hauptsächlich zum Nationalfeiertag Sham-el-Nessim verzehrt wird. Üblicherweise wird zur Herstellung Fisch aus dem Roten Meer oder Nildelta verwendet. Der Fisch wird auf Bleche zum Trocknen gelegt, die mit Baumwolltüchern abgedeckt werden. Die maximal eintägige Reifung erfolgt in einem dunklen, kühlen Raum. Anschließend wird der Fisch in offene Holzfässer verbracht und mit grobem Salz geschichtet gelagert. Die Fässer verbleiben offen in einem dunklen, kühlen Raum für mindestens zwei Wochen bis zu einem Jahr. Andere Herstellungsvarianten sehen zusätzlich eine Reifung in der Sonne für einen Tag vor. Der Verzehr erfolgt in der Regel ohne weitere Erhitzung. Wie der Fisch im Rahmen dieses Ausbruchs tatsächlich hergestellt wurde, ließ sich nicht ermitteln. Bei diesem Ausbruch handelte es sich um den ersten bekannt gewordenen Ausbruch nach dem Verzehr von Faseikh in Ägypten, obwohl dieser Fisch bereits seit der Zeit der Pharaonen hergestellt und verzehrt wird. Als mögliche Gründe hierfür wurden diskutiert, dass *C. botulinum* erst zu diesem Zeitpunkt durch Einfuhr von Fisch aus anderen Regionen nach Ägypten eingetragen wurde oder dass Modifikationen bei der traditionellen Herstellung des Produktes zu größeren mikrobiologischen Risiken geführt haben<sup>37</sup>.

Ein weiterer Ausbruch durch den Verzehr von Faseikh wird aus Kanada berichtet. Hier wurde der Fisch in einem Einzelhandelsgeschäft in Toronto produziert. Es wurden verschiedene Fischarten zur Herstellung verwendet. Die Fische wurden nicht ausgenommen und zur Reifung in Kunststoffeimer verbracht und mit Salz geschichtet. Die Reifung erfolgte für 5-6 Stunden bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Fische im Kühlraum weiter gelagert. Nach drei Tagen wurde die durch die Salzung entstandene Flüssigkeit abgegossen und die Fische wurden weitere 18 Tage bei 4 °C gereift. Insgesamt verzehrten mindestens 13 Personen den Fisch, drei erkrankten an Botulismus. In humanen Proben und Resten des verzehrten Fisches konnten sowohl *C. botulinum* als auch BoNT Typ E nachgewiesen werden. Auch weitere Proben aus dem Einzelhandelsgeschäft zeigten positive Ergebnisse. Die Untersuchung von Fischproben ergab einen pH-Wert von durchschnittlich 7,3 im Fischmuskelfleisch und 7,0 in den Eingeweiden. Der  $a_w$ -Wert in beiden Matrices betrug 0,92<sup>38</sup>.

Ein weiteres kommerziell hergestelltes Fischprodukt führte 1987 zu einem internationalen Krankheitsausbruch. Nach dem Verzehr von Kapchunka (auch Rybetz, Ribeyza, Rostov genannt)<sup>36</sup>, ein nicht ausgenommener, gesalzener, luftgetrockneter Weißfisch, der in New York hergestellt wurde, erkrankten sechs Personen in Israel und zwei Personen in New York. Die Fälle in Israel verzehrten Fisch aus New York, der von Verwandten im Handgepäck bei ca. 20 °C für ungefähr 24 Stunden transportiert wurde. Kapchunka ist ein traditionell in Russland und Osteuropa verzehrtes Produkt, welches Auswanderer auch in anderen Regionen produzieren. Hier wurde eine Charge von ungefähr 275 nicht ausgenommenen Weißfischen in einen Kübel schichtweise mit Salz verbracht und anschließend mit Salzlösung übergossen. Die Reifung erfolgte gekühlt für 23-28 Tage. Anschließend wurden alle sichtbaren Salzkristalle entfernt und der Fisch einzeln auf Haken in einem Trockenraum bei ungefähr 18 °C für 3-7 Tage aufgehängt und später ohne weitere Erhitzung verzehrt. Bei Patienten und aus Resten des verzehrten Fisches konnte *C. botulinum* isoliert werden. Im Fisch wurde außerdem BoNT Typ E nachgewiesen. Die Salzgehalte in den untersuchten Fischresten waren mit weit über 10 % in der wässrigen Phase sehr hoch. Als mögliche Szenarien für die Vermehrung von *C. botulinum* wurde diskutiert, dass die Vermehrung bereits vor der Salzung stattgefunden haben könnte, obwohl die Zeit zur Vermehrung dann sehr kurz gewesen wäre. Eine weitere Möglichkeit könnte eine ungleiche Salzverteilung innerhalb der Fische gewesen sein. Der Salzgehalt wurde im Fischmuskelfleisch bestimmt und nicht in den Eingeweiden, die unter Umständen einen sehr viel geringeren Salzgehalt gehabt haben könnten<sup>39, 40</sup>. Bereits im Jahr 1985 wurden Botulismus-Fälle bei russischen Immigranten in New York berichtet, die ebenfalls auf den Verzehr von Kapchunka zurückzuführen waren<sup>41</sup>.

Der Verzehr von nicht ausgenommenem Weißfisch, der im Privathaushalt gesalzen und in verschließbaren Plastikbeuteln bei Raumtemperatur für ungefähr einen Monat gereift wurde, löste 2005 in New Jersey Erkrankungen bei fünf Personen aus. Reste des Fisches konnten positiv auf BoNT Typ E getestet werden, bei den Erkrankten konnte jedoch kein BoNT nachgewiesen werden. Die Patienten litten überwiegend an gastrointestinalen Symptomen. Nur Einige zeigten auch neurologische Ausfälle. Es wurde vermutet, dass die Personen nur eine geringe BoNT-Dosis aufgenommen hatten und der Nachweis von BoNT in klinischen Proben deshalb misslang<sup>42</sup>.

Ebenfalls in New Jersey ereignete sich 1992 ein Krankheitsausbruch bei vier Familienmitgliedern nach dem Verzehr von Moloha (nicht ausgenommener, salz-gereifter Fisch), der auf einem lokalen Fischmarkt gekauft wurde. Der Fisch wurde ohne weitere Erhitzung verzehrt. In humanen Proben und Resten des verzehrten Fisches konnte BoNT Typ E nachgewiesen werden. Zur Art und Weise der Herstellung des Fisches liegen keine Informationen vor, da der Produzent nicht ermittelt werden konnte<sup>43</sup>.

Auch aus Alaska wurden mehrere Krankheitsausbrüche nach dem Verzehr von Produkten aus Fisch und Meeressäugern berichtet. Bei allen krankheitsauslösenden Vehikeln handelte es sich um selbst hergestellte, traditionelle Lebensmittel. Hergestellt wurden fermentierte Fischeier (stink eggs), fermentierte Lachsköpfe (stink heads) und fermentierter Weißfisch<sup>44</sup>. Shaffer et al. (1990)<sup>45</sup> stellten bei Recherchen zu traditionellen Herstellungsmethoden fermentierter Lebensmittel in Alaska fest, dass die Reifung dieser Erzeugnisse ursprünglich in Holzfässern in Schächten des sehr kalten Bodens (Permafrostboden) erfolgte. Neuere Herstellungspraktiken verzichten auf diese Kühlung und lassen die Produkte teilweise in verschlossenen Plastikfässern bei Raumtemperatur reifen, um die Reifung dadurch zu beschleunigen<sup>45</sup>. Bei den in Alaska traditionell produzierten Erzeugnissen aus Meeressäugern handelt es sich hauptsächlich um Walhaut und Walspeck (Mutuk) sowie um Seehundsflossen und Biberschwänze (stinky tails). Auch diese Lebensmittel tauchen regelmäßig in den Statistiken über Krankheitsausbrüche auf<sup>29, 44, 46, 47</sup>.

In Norwegen führte der Verzehr von im Privathaushalt hergestelltem Rakfisk (fermentierter Fisch in Norwegen) im Jahr 2003 zur Erkrankung von vier Personen<sup>48</sup>. Rakfisk ist ein halb-fermentierter Fisch, der häufig im Privathaushalt hergestellt wird. Die Fische werden ausgezogen und mit Salz und Zucker versetzt. Anschließend werden sie mehrere Wochen bei 5-8 °C gereift und ohne Erhitzung verzehrt<sup>48</sup>.

Auch in Deutschland kam es zu einem Ausbruch nach dem Verzehr von getrocknetem Fisch bei drei Mitgliedern einer Familie. Im Jahr 2003 wurde ein in der Elbe gefangener Fisch (Meerbrasse) im Privathaushalt ausgezogen, in Salzlake unter Druck gereift, anschließend einige Tage luftgetrocknet und ohne weitere Zubereitung verzehrt. Bei einem Patienten wurde klinisch und im Labor Botulismus diagnostiziert. Auch in Resten des verzehrten Fisches konnte BoNT Typ E nachgewiesen werden<sup>48</sup>.

*C. butyricum* führte bislang zu Fällen von Säuglingsbotulismus<sup>49-51</sup> und einem lebensmittelbedingten Ausbruch, der auf den Verzehr einer gesalzenen und fermentierten Paste aus Sojabohnen und Wachskürbis zurückgeführt wurde<sup>52</sup>.

Für *C. baratii* wurde gezeigt, dass einige Stämme in der Lage sind, beim Menschen Botulismus vom Typ F hervorzurufen<sup>53, 54</sup>. Bislang wurden jedoch nur wenige Fälle von lebensmittelbedingtem Botulismus durch *C. baratii* beschrieben<sup>55-58</sup>. Zwei Publikationen aus den USA und Frankreich beschreiben diesbezüglich Nudeln mit einer Fleisch-Tomatensauce als Vehikel<sup>55, 57</sup>, wobei Tréhard et al. (2016)<sup>57</sup> BoNT Typ F-bildende *C. baratii* in der Zutat Hackfleisch nachweisen konnten. Bei zwei weiteren Ausbrüchen wurden BoNT Typ F-bildende *C. baratii*-Stämme sowie das Neurotoxin selbst lediglich in humanen Stuhlproben, nicht jedoch in den verdächtigen Lebensmitteln nachgewiesen<sup>56, 58</sup>.

### 3.1.3 Exposition

#### 3.1.3.1 Herstellungsverfahren

Die Plötze lebt als anspruchsloser Schwarmfisch in stehenden und langsam fließenden Gewässern in fast ganz Europa nördlich der Alpen und der Pyrenäen bis zum Ural. Hierzu gehören auch regulierte Fließgewässer wie Kanäle für die Binnenschifffahrt und Hafenbecken. Sie lebt auch auf den britischen Inseln und im Brackwasser der Ostsee, fehlt aber im nördlichen Skandinavien und im südlichen Balkan. Die Plötze dient als Köderfisch zum Angeln von Raubfischen. Sie ist aufgrund ihres häufigen Vorkommens und der Tatsache, dass sie leicht zu fangen ist, für Anfänger ein beliebter Angelfisch<sup>59</sup>.

Rechtliche Regelungen zum Ausnehmen von Fischen finden sich in der Verordnung (EG) Nr. 853/2004. Gemäß Anhang III, Kapitel III, Nr. 2 müssen „Arbeitsgänge wie Köpfen und Ausnehmen in hygienischer Weise ausgeführt werden. Ist das Ausnehmen unter technischen und handelsrelevanten Gesichtspunkten möglich, so muss es möglichst bald nach dem Fang oder der Anlandung erfolgen. Die Erzeugnisse müssen unmittelbar nach diesen Arbeitsgängen gründlich mit Trinkwasser oder - an Bord von Fischereifahrzeugen - mit sauberem Wasser gewaschen werden.“

In einem in Deutschland durchgeführten Forschungsvorhaben wurde untersucht, ob sich ausgezogenen und unausgezogenen gelagerte Fische hinsichtlich ihrer mikrobiologischen, sensorischen und parasitologischen Eigenschaften unterscheiden und ob sich daraus ein erhöhtes Risiko für den Verbraucher ergibt<sup>60</sup>. Die im BfR-Vorgängerinstitut, dem Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV), durchgeführten Untersuchungen erlaubten zwar keine Schlussfolgerungen über eine Vermehrung von *C.*

*botulinum* im Fischdarm im Verlauf der Lagerung. Dennoch hat das BgVV auf der Grundlage einer Literaturlauswertung empfohlen, Fische, die zur Herstellung von Fischerzeugnissen mit verlängerter Haltbarkeit bestimmt sind, immer schnellstmöglich auszunehmen, gründlich zu waschen und unter strikter Einhaltung der Kühlkette zu lagern.

Fisch wird schon seit langer Zeit durch Salzen und Trocknen konserviert. Die angewandten Verfahren und Salzgehalte können aber sehr unterschiedlich sein. Eine Übersicht mit Prozessierungsleitlinien für die Herstellung von getrockneten Fischen und Fischerzeugnissen finden sich z. B. im Kapitel 4 des HACCP Trainingskurses des New York Sea Grant, Cornell<sup>61</sup>.

In einem von Matis<sup>4</sup> (2007)<sup>62</sup> veröffentlichten Bericht wird der Effekt einzelner Prozessierungsverfahren zur Trocknung von Fischfilets auf den Salzgehalt und den  $a_w$ -Wert beschrieben: Beispielsweise werden Fischfilets in den Wintermonaten nach dem Waschen in Salzlake, draußen vor Regen geschützt, für ca. 4-6 Wochen bei ca. 0 °C getrocknet. Ggf. werden sie in Innenräumen bei 10-15 °C weiter getrocknet, bis der gewünschte Trocknungsgrad erreicht ist. Die durchschnittlichen  $a_w$ -Werte der Fischfilets lagen nach dieser Prozessierung bei 0,75. Alternativ kann die Trocknung in Innenräumen erfolgen, entweder kalt bei -1 °C bis +2 °C für 12-20 Stunden und dann für weitere 20 Stunden bei 18-22 °C oder warm für vier Tage bei 18-22 °C. Sofern das warme Trocknungsverfahren verwendet werden soll, muss jedoch die zuvor eingesetzte Salzlake höher konzentriert sein (5 %). Die durchschnittlichen  $a_w$ -Werte der Fischfilets lagen nach Abschluss dieses Verfahrens bei 0,65. Die Fischfilets hatten nach der Trocknung Salzgehalte zwischen 1,2 % und 4,2 % und Wassergehalte zwischen 11,3 % und 15,9 %. Sie werden anschließend tiefgefroren gelagert<sup>62</sup>.

Welchen Einfluss das Salzen und Trocknen auf die Wasseraktivität eines Salzfisherzeugnisses (Fischrogen aus Meeräschen) hat, zeigt eine Studie von Hsu & Deng (1980)<sup>63</sup>. Während des 28-stündigen Salzens mit 15 % Trockensalz reduzierte sich der  $a_w$ -Wert des Rogens von 0,975 auf 0,86. Durch das 6-stündige Entsalzen stieg der  $a_w$ -Wert wieder auf über 0,95 an, um dann im Zuge der siebentägigen Trocknung in der Sonne (ca. 30 °C) auf 0,83 im finalen Produkt abzusinken. Der Salzgehalt im finalen Produkt betrug 4,5 %<sup>63</sup>.

Über die Verfahren zur Herstellung der zurückgerufenen Chargen von gesalzeneu und getrockneten Plötzen liegen dem BfR keine Informationen vor. In das RASFF eingestellte Abbildungen der Etiketten auf den Verpackungen zeigen, dass die zurückgerufenen Chargen verschiedene Salzgehalte und Kühlanforderungen hatten. Ausgenommene, gesalzene und getrocknete Plötzen (Hersteller A, Produkt A), die laut Angaben auf dem Etikett einen Salzgehalt von 5 % haben sollen und lediglich kühl und trocken zu lagern sind, hatten eine Haltbarkeitsfrist von vier Monaten. Die ausgenommenen Plötzen wurden zu mehreren verpackt in einer Fertigpackung vertrieben und hatten ein geschätztes Einzel-Gewicht von <50 Gramm. Nicht ausgenommene, gesalzene und getrocknete Plötzen, die als lose Ware gehandelt wurden, hatten laut Angaben auf dem Etikett einen Salzgehalt von 1,8 % und sollten bei max. +3 °C gelagert werden (Hersteller B, Produkt B). Die Gewichte dieser Plötzen und die vom Hersteller B festgelegte Haltbarkeitsfrist von Produkt B sind dem BfR nicht bekannt. Zurückgerufen wurde außerdem eine Charge ausgenommene, gesalzene und getrocknete Plötzen des Herstellers B (Produkt C) sowie eine Charge nicht-ausgenommene, gesalzene und getrocknete Plötzen eines weiteren Herstellers (Hersteller C, Produkt D). Zu den Produkten C und D liegen dem BfR keine weiteren Informationen zur Herstellung vor.

Zur Verbesserung des Wissens über dieses Fischerzeugnis hat das BfR ausgenommene und nicht ausgenommene, gesalzene und getrocknete Plötzen von drei verschiedenen An-

<sup>d</sup> Matis Ltd. is an Icelandic Food and Biotech R&D institute founded in 2007 (<http://www.matis.is/english>)

biestern im Internet beschafft, um deren  $a_w$ - und pH-Werte zu bestimmen. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigen, dass die Größen der verarbeiteten Plötzen sehr unterschiedlich sind und dass die Wasseraktivitäten in den untersuchten Fischen durch das Salzen und Trocknen ausreichend gesenkt wurden, um die Vermehrung von proteolytischen und nicht-proteolytischen *C. botulinum*-Stämmen zu hemmen. (Tabelle 1)

**Tabelle 1: Wasseraktivität und pH-Werte von im Internet käuflich erworbenen, ausgenommenen und nicht ausgenommenen, gesalzenen und getrockneten Plötzen**

| Parameter                             | Nicht ausgenommen | Nicht ausgenommen | Ausgenommen  |
|---------------------------------------|-------------------|-------------------|--------------|
| Einzelgewichte von drei Teilproben    | 74,3-108,7 g      | 20,3-32,6 g       | 91,4-170,3 g |
| pH-Wert <sup>1</sup> Innereien        | 5,9*              | 5,9               | entfällt     |
| pH-Wert <sup>1</sup> Fischfleisch     | 6,2               | 6,1               | 6,3          |
| $a_w$ -Wert <sup>1</sup> Innereien    | 0,89*             | 0,71              | entfällt     |
| $a_w$ -Wert <sup>1</sup> Fischfleisch | 0,88              | 0,72              | 0,74         |

<sup>1</sup>) Gerundete Mittelwerte von drei untersuchten gesalzenen und getrockneten Plötzen einer Verpackungseinheit

\*) Innereien bestanden überwiegend aus Rogen

### 3.1.3.2 Vorkommen, Überleben und Wachstum von *C. botulinum* in gesalzenen und getrockneten Fischerzeugnissen

Sporen von *C. botulinum* Typ E sind im aquatischen Milieu weit verbreitet und werden im Wasser, in Sedimenten und in Meeresorganismen gefunden. Fische können *C. botulinum* z. B. über pflanzliche Nahrung aufnehmen. Dass diese Nahrung sehr stark mit *C. botulinum* besiedelt sein kann, zeigt exemplarisch eine Untersuchung von Lan Chun et al. (2015)<sup>64</sup>, die eine mit 96 % sehr hohe Prävalenz von *C. botulinum* Typ E in Cladophora Algen des Great Lake in Michigan (USA) gefunden haben. Diese sind weit verbreitet und können als Nahrungsquelle von Plötzen durchaus in Frage kommen<sup>65</sup>. Zudem kann *C. botulinum* Typ E auch über Sedimente von Gewässern aufgenommen werden<sup>12</sup>. Von Gram (2001)<sup>66</sup> zusammengestellte Daten zeigen, dass in 86-100 % der in Dänemark und vor der Küste Skandinaviens entnommenen Sedimentproben solche Sporen gefunden wurden und dass die in diversen Studien ermittelten Prävalenzen in verschiedenen Fischarten zwischen 0 % und 100 % lagen. Die in diesen Studien ermittelten Konzentration an *C. botulinum* Typ E lagen im Bereich von 1-5300 MPN (most probable number) pro Kilogramm Fisch<sup>66</sup>.

Sporen von *C. botulinum* Typ E kommen überwiegend im Fischdarm vor<sup>67</sup>. Durch sorgfältiges Ausnehmen und Waschen der Fische lässt sich die Sporenkonzentration zwar reduzieren<sup>68</sup>, aber eine Übertragung auf das Fischfleisch nicht vollständig verhindern. Aus diesem Grund muss in Europa auch bei ausgenommenen Fischen grundsätzlich mit dem Vorkommen von *C. botulinum*-Sporen gerechnet werden.

In Fischen vorhandene Sporen von nicht-proteolytischem *C. botulinum* können unter aeroben und anaeroben Bedingungen in einem Temperaturbereich von 1-40 °C auskeimen; das Optimum liegt im Bereich von 20-25 °C. Die Bildung von Toxinen erfolgt optimalerweise in einem pH-Wertebereich von 5,5-8,0<sup>69</sup>.

Unter optimalen Laborbedingungen ist ein Wachstum und damit auch eine Toxinbildung im Temperaturbereich von 3-45 °C möglich; das Optimum liegt im Bereich von 25-30 °C<sup>67</sup>. In Laboruntersuchungen von Lebensmitteln konnte gezeigt werden, dass sich nicht-

proteolytischer *C. botulinum* innerhalb von weniger als zehn Tagen bei 8 °C vermehren und Toxin bilden kann.<sup>70</sup>

In beimpften Nährmedien ( $10^4$  Sporen/ml) wurde das Wachstum und die Toxinbildung von nicht-proteolytischem *C. botulinum* nach fünf Wochen bei 3 °C, 3-4 Wochen bei 4 °C und 2-3 Wochen bei 5 °C festgestellt<sup>71</sup>. In gesalzenen, getrockneten oder gesäuerten Lebensmitteln kann die minimale Wachstumstemperatur aber höher sein. Voraussetzung für die Vermehrung des Erregers ist außerdem ein niedriges Redoxpotential, aber sogar ein 20 %iger Sauerstoffgehalt soll unter bestimmten Bedingungen das Wachstum in verpackten Lebensmitteln nicht verhindern<sup>67</sup>. Auch die Zusammensetzung der Begleitflora kann diesbezüglich einen Einfluss auf das Wachstum in einer sauerstoffhaltigen Atmosphäre haben. So kamen Kasai et al. (2005)<sup>72</sup> zu dem Schluss, dass proteolytische *C. botulinum*-Stämme in der Lage sind, in gekochtem Reis und einer Atmosphäre mit 5 % Sauerstoff nach einer Woche nachweisbare Toxinmengen zu bilden, wenn in dem Reis zusätzlich Amylase-bildender *Bacillus subtilis* vorhanden war. Generell muss jedoch davon ausgegangen werden, dass mit zunehmendem Sauerstoffgehalt innerhalb einer Verpackung und ansteigendem Redoxpotential das Wachstum von *C. botulinum* stark vermindert wird. So zeigten Lund et al. (1984)<sup>73</sup>, dass eine Erhöhung des Sauerstoffgehalts auf 0,79 % bzw. eine Erhöhung des Redoxpotentials von -400 mV auf +250 mV das Wachstum von *C. botulinum* Typ E verlangsamte.

Studien haben gezeigt, dass die Zugabe von Salz das Wachstum und damit die Toxinbildung von *C. botulinum* in Nährmedien verzögern kann. Nach Zugabe von 4 % (Gewichtsprozent) Salz zu beimpften Nährmedien ( $10^4$  Sporen/ml) wurde das Wachstum von nicht-proteolytischem *C. botulinum* erst nach elf Wochen bei 5 °C bzw. zwei Wochen bei 8 °C festgestellt. Die Erhöhung des Salzgehalts auf 4,5 % (Gewichtsprozent) verlangsamte die Vermehrung weiter, so dass erst nach sechs Wochen bei 8 °C Wachstum festgestellt wurde<sup>71</sup>.

Lalitha und Gopakumar (2007)<sup>74</sup> gelang der Nachweis von BoNT Typ E in mit ca. 100 Typ E-Sporen beimpftem Medium (pH 7) ohne Salzzusatz nach zwei Tagen bei 15 °C, zwölf Tagen bei 10 °C und 28 Tagen bei 4 °C. Im gleichen Medium mit 3 % Salz war BoNT Typ E erst nach sechs Tagen bei 15 °C, 25 Tagen bei 10 °C und bei 4 °C innerhalb von 35 Tagen gar nicht nachweisbar. Nach Zugabe von 5 % Salz zu diesem Medium konnten sich nur noch in hoher Konzentration eingeeimpfte proteolytische *C. botulinum*-Stämme vermehren und bei 15 °C innerhalb von 12 bis 18 Tagen BoNT bilden. Durch eine leichte Ansäuerung des Mediums auf einen pH-Wert von 5,5 ließ sich das Wachstum und die Toxinbildung von *C. botulinum* noch weiter verzögern<sup>74</sup>.

In einer anderen Studie wurden künstlich kontaminierte Fischproben (ca. 10 Typ E-Sporen/g) mit unterschiedlichen Salzgehalten sieben Tage bei 25 °C gelagert. In 46 von 87 Proben mit 2-3,5 % Salz und in 30 von 51 Proben mit bis zu 3,9 % Salz war BoNT nach einer Woche nachweisbar. Nach Ansicht der Autoren besteht in gesalzenem Fisch insbesondere dann die Gefahr einer BoNT-Bildung, wenn das Salz innerhalb des Fisches oder zwischen den Fischen ungleich verteilt ist<sup>75</sup>.

Wachstumslimitierende Faktoren für nicht-proteolytische *C. botulinum*-Stämme sind nach Angaben von Hudson und Lake (2012)<sup>67</sup> Salzgehalte von  $\geq 5$  % (Gewichtsprozent) bzw.  $a_w$ -Werte von  $\leq 0,9707$ . Proteolytische *C. botulinum*-Stämme wachsen bei Salzgehalten von  $\leq 10$  % (Gewichtsprozent) bzw.  $a_w$ -Werten von  $\geq 0,9353$ . Die Autoren verweisen in ihrer Publikation außerdem auf ein CODEX-Dokument mit Empfehlungen zur Verhütung einer BoNT-Bildung in Räucherfisch. Danach sind bei einer Lagertemperatur von 3-10 °C mindestens 5 % Salz in der wässrigen Phase und bei höheren Lagertemperaturen mindestens 10 % Salz

in der wässrigen Phase nötig, um eine Vermehrung von Typ E-Stämmen in diesen Fischerzeugnissen zu verhindern. Ausgenommen von dieser Empfehlung sind sehr trockene Produkte ( $a_W$ -Werte  $\leq 0,75$  bzw.  $\leq 10$  % Wassergehalt), die nicht gekühlt werden müssen<sup>67</sup>.

Cann und Taylor (1979)<sup>68</sup> konnten zeigen, dass die Bildung von BoNT nicht nur vom Bakterienstamm und Salzgehalt im Fischerzeugnis abhängt, sondern auch von der dort vorhandenen Sporenkonzentration. 3,0 % Salz in der wässrigen Phase waren ausreichend, um die Toxinbildung in künstlich mit ca. 100 *C. botulinum*-Sporen pro Gramm kontaminierten, heiß geräucherten Forellen (ausgenommen und nicht ausgenommen) zu verhindern, die 30 Tage bei 10 °C gelagert wurden. 2,5 % Salz in der wässrigen Phase verhinderte bei gleichen Lagerungsbedingungen nur bei den natürlich kontaminierten Forellen (ausgenommen und nicht ausgenommen) die Bildung von BoNT Typ E, aber nicht bei den künstlich kontaminierten Fischen. Eine weitere Absenkung des Salzgehalts in der wässrigen Phase auf 2,0 % führte nur in nicht ausgenommenen Forellen zum Nachweis von BoNT Typ E<sup>68</sup>.

In einer anderen Studie wurden Regenbogenforellenfilets mit 3,2 % Salz in der wässrigen Phase künstlich mit  $<10$  *C. botulinum* Typ E-Sporen pro Gramm kontaminiert, anschließend kalt geräuchert und dann unter Vakuum verpackt. Nach drei Wochen Lagerung bei 8 °C oder vier Wochen bei 4 °C war BoNT in untersuchten Proben nachweisbar, ohne dass im sechswöchigen Untersuchungszeitraum ein Wachstum von *C. botulinum* Typ E festgestellt wurde. In Regenbogenforellenfilets mit 6,7 % Salz in der wässrigen Phase ließ sich während der sechswöchigen Lagerung unter Vakuum bei 6 °C weder Wachstum noch BoNT nachweisen. In diesen Proben gelang der Nachweis von BoNT trotz des hohen Salzgehalts nach 26 Wochen bei 6 °C<sup>76</sup>.

Dufresne et al. (2000)<sup>77</sup> erforschten den Einfluss verschiedener Verpackungsfolien auf die Bildung von BoNT in Proben von kalt oder heiß geräucherten Forellenfilets, die mit ca. 100 *C. botulinum* Typ E-Sporen kontaminiert worden waren. Die Salzgehalte, angegeben als Gewichtsprozente, lagen bei 1,7 % (kalt geräuchert) bzw. 2,1 % (heiß geräuchert) und die  $a_W$ -Werte bei 0,985 (kalt geräuchert) bzw. 0,978 (heiß geräuchert). In allen Proben, die 28 Tage bei 4 °C oder sieben Tage bei 12 °C gelagert wurden, ließ sich kein BoNT nachweisen. Bei einer Lagertemperatur von 8 °C zeigten sich Unterschiede zwischen den Probenmatri-ces<sup>77</sup>.

In erhitzten und leicht gesalzenen Weißfischproben (1,6-2,9 % Salz in der wässrigen Phase), die mit etwa 1000 Typ E-Sporen pro Gramm kontaminiert waren und bei 27 °C gelagert wurden, war nach sieben Tagen BoNT nachweisbar. Hingegen konnten 4,4 % Salz in der wässrigen Phase die Toxinbildung hinauszögern, so dass BoNT erst am 35. Tag detektiert wurde. Der  $a_W$ -Wert sank im gleichen Zeitraum von 0,974 auf 0,964. Aber auch die Absenkung des pH-Wertes während der Lagerung von 6,4 auf 5,4 kann einen wachstumshemmenden Effekt gehabt haben<sup>78</sup>.

Nach einem Bericht von Brand et al. (1988)<sup>79</sup> über Botulismus-Fälle bei bestimmten Fisch fressenden Vögeln, scheint es darüber hinaus möglich, dass BoNT Typ E schon im lebenden Fisch gebildet und auf diesem Weg von Fisch fressenden Vögeln aufgenommen werden kann. Forschungsergebnisse von Yule et al. (2006)<sup>80</sup> stützen zwar diese Hypothese, schätzen das Risiko für einen erwachsenen Menschen aufgrund der Dosis-Wirkungsbeziehung aber als gering ein, selbst wenn der Fisch roh verzehrt wird. Ihrer Meinung nach ist es unwahrscheinlich, dass ein Fisch lebend gefangen wird, der eine für den Menschen gefährliche Menge an BoNT enthält, weil auch Fische an Botulismus erkranken und sterben können.

In einer Studie von Huss et al. (1979)<sup>81</sup> wurden Sporen von *C. botulinum* Typ E direkt in den Rückenmuskel oder über die Analöffnung in den Darm von Heringen eingebracht. Bei niedriger Sporenkonzentration im Darm (10 Sporen/g) und Lagerung der nicht ausgenommenen Heringe bei 15 °C unter Vakuum war BoNT Typ E nach zwei Tagen in den Därmen und nach drei Tagen in deren Fischfilets nachweisbar. Wurden 100 Sporen pro Gramm in die Heringsdärme eingebracht, war BoNT Typ E schon nach zwei Tagen in deren Fischfilets nachweisbar<sup>81</sup>. Durch die Lagerbedingungen wäre zwar auch der organoleptische Verderb fortgeschritten, allerdings nicht zwangsläufig so weit, dass eine Verarbeitung, beispielsweise zu stark gesalzenen Fischerzeugnissen, ausgeschlossen wäre<sup>82</sup>. Wurden 100 Sporen pro Gramm in die Heringsdärme eingebracht und die Heringe bei 10 °C unter Vakuum gelagert, war BoNT Typ E erst nach acht Tagen in deren Fischfilets nachweisbar<sup>81</sup>.

Entsprechend einer Veröffentlichung von Brygoo (1953)<sup>83</sup> verlieren BoNT Typ A in Oberflächenwasser bei Raumtemperatur bereits nach 1-2 Tagen, BoNT Typ B nach 2-3 Tagen und BoNT Typ E nach 3-4 Tagen mehr als 80% ihrer letalen Wirkung. Dagegen ist BoNT Typ E in Fischen auch bei hohen Salzkonzentrationen über mehrere Wochen stabil<sup>82</sup>. BoNT sind aber relativ hitzeempfindlich und können bei Temperatur/Zeit-Kombinationen von 65 °C für 90 Minuten und bei 85 °C für eine Minute inaktiviert werden<sup>67</sup>. Eine von Schneider<sup>28</sup> durchgeführte Studie ergab, dass sowohl in Kulturüberständen als auch in Lebensmitteln nach einer Hitzeeinwirkung von zehn Minuten bei 85 °C eine vollständige Denaturierung erreicht wurde. Schon ein Dauererhitzen (62 °C für 30 min) und das Kurzzeit-Hocherhitzen von Milch (72 °C für 20 Sekunden) führten zu einem starken, graduellen Absinken der Toxinkonzentrationen. Weiterhin zeigten die Hitzebehandlungsverfahren bei den festen Lebensmitteln mit unterschiedlichen Temperatur/Zeit-Verläufen eine graduelle Inaktivierung der BoNT. Bei der Lagerung der BoNT bei unterschiedlichen Temperaturen erwies sich die Toxinkonzentration bei -21 °C über 20 Tage als stabil, während bei 4 °C ab dem fünften Lagertag ein Absinken der aktiven Toxinmengen zu beobachten war. Am 20. Tag lag der Messwert unterhalb der Nachweisgrenze.

### 3.1.3.3 Mathematische Modelle zur Prognose des Wachstums und der Toxinbildung von *C. botulinum*

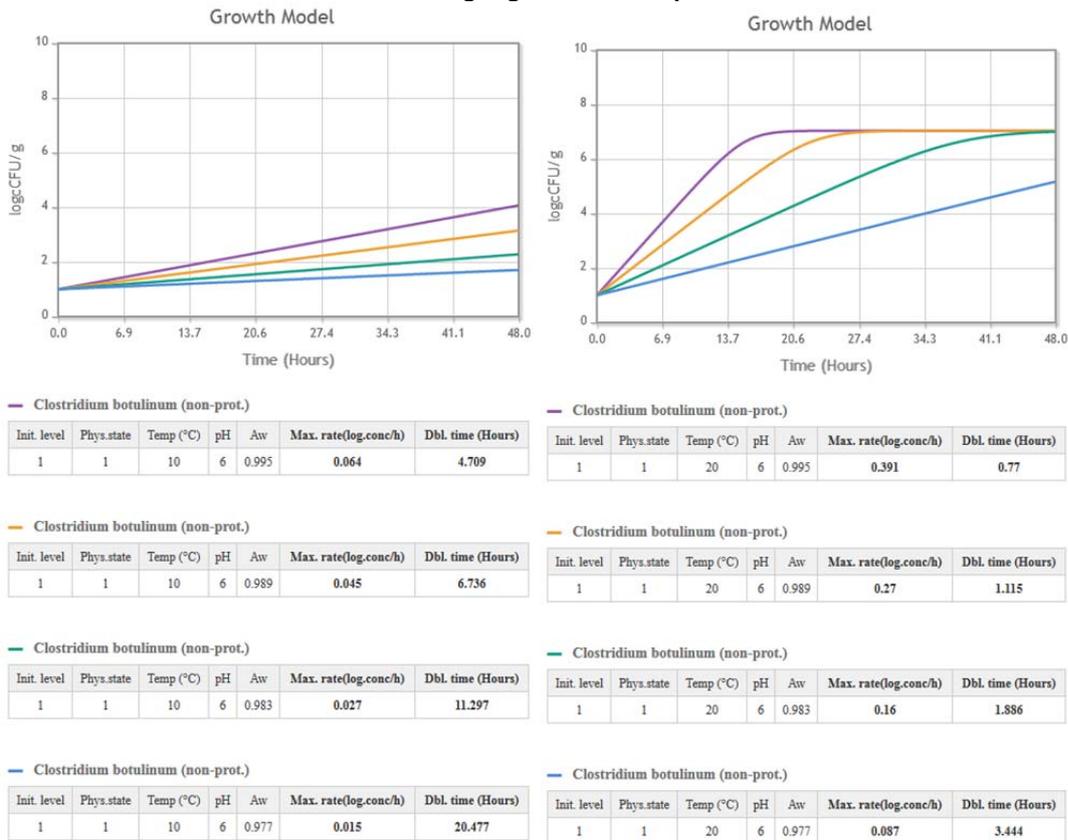
Für die Ableitung von Vorhersagen zum Grad der Vermehrung von nicht-proteolytischem *C. botulinum* unter definierten Wachstumsbedingungen (z.B. Temperatur, pH-,  $a_w$ -Wert / Salzkonzentration etc.) kann beispielsweise auf ein Prognosemodell im ComBase Predictor<sup>84, 85</sup> zurückgegriffen werden. Derartige Modelle helfen bei der Abschätzung, welchen Einfluss unterschiedliche Prozessbedingungen auf die Wahrscheinlichkeit einer Vermehrung und einer Toxinbildung haben können. Im Folgenden sind Ergebnisse einzelner Simulationsrechnungen aufgeführt, die auf der Annahme beruhen, dass der Salzgehalt im Fisch über die gewählte Zeitdauer konstant ist. Detailliertere Szenarien könnten beim Vorliegen konkreter Prozessinformationen ebenfalls modelliert werden. In Anlehnung an die Vorgehensweise in Peck et al. (2008)<sup>70</sup> wird hier angenommen, dass die Toxinbildung einsetzt, sobald sich die Keimzahl um ca. drei Zehnerpotenzen erhöht hat.

In Abbildung 1 sind die Modell-basierten Prognosen für die Vermehrung von nicht-proteolytischem *C. botulinum* in Produkten mit einem pH-Wert von ca. 6, einer Lagertemperatur von 10 °C und konstanter Salzkonzentration im Bereich von 1 % bis 4 % dargestellt. Es wird deutlich, dass bei einem Salzgehalt von über 2 % ( $a_w$ -Wert <0,989) innerhalb der ersten zwei Tage nicht mit einer Toxinbildung zu rechnen ist. Diese Ergebnisse werden durch ein vom U.S. Department of Agriculture - Agricultural Research Service (USDA ARS) bereitgestelltes unabhängiges Prognosemodell („Time-to-Turbidity“ basierend auf einer Publikation von Whiting und Oriente (1997)<sup>86</sup> in der Software „Pathogen-Modelling-Program“ (PMP))

bestätigt. Bei einer Salzkonzentration von ca. 2 % besteht auf Basis des ComBase Predictor-Modells bereits die Möglichkeit, dass sich *C. botulinum* signifikant (zwei Zehnerpotenzen) vermehrt. Das „Time-to-Turbidity“ PMP-Modell gibt allerdings eine andere Prognose, da dieses Modell kein Wachstum unter den genannten Bedingungen prognostiziert. Ein weiteres Modell in PMP („Time-to-Toxin in Fish“) sagt für ungesalzenen frischen Fisch bei 10 °C und einer Ausgangskonzentration von 10.000 Sporen pro Gramm eine minimale Dauer bis zur Toxinbildung von 2,5 Tagen vorher<sup>87</sup>. Bei Temperaturen von 20 °C muss nach der Prognose des ComBase Predictor-Modells jedoch unabhängig vom Salzgehalt (1-4 %) innerhalb von zwei Tagen mit einer Toxinbildung gerechnet werden. Ähnliche Schlüsse lassen die Prognosen des „Time-to-Turbidity“ PMP-Modells zu, allerdings unter der Annahme, dass das Lebensmittel bereits mit 10.000 Sporen pro Gramm belastet ist. Bei niedrigeren Ausgangskonzentrationen (z. B. 10 Sporen/g) prognostiziert das PMP-Modell erst ab zehn Tagen eine 30 %ige Wahrscheinlichkeit zum Wachstum bzw. zur Toxinbildung (Daten hier nicht dargestellt).

In einem Projektbericht des Instituts for Food Research (IFR) zu „*Clostridium botulinum* in vacuum packed (VP) and modified atmosphere packed (MAP) chilled foods“<sup>88</sup> wird der Einfluss der Temperatur auf den Zeitpunkt der Toxinbildung bei nicht-proteolytischem *C. botulinum* in Lebensmitteln dargestellt (siehe Abbildung 2).

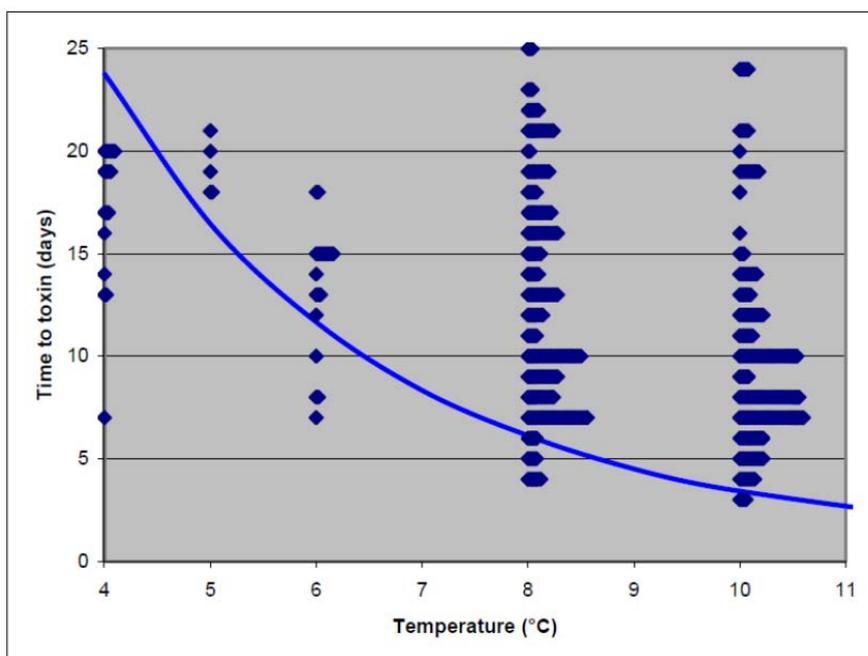
**Abbildung 1:**  
Vorhersage durch das ComBase Predictor-Modell<sup>84</sup> zur Vermehrung von nicht-proteolytischem *C. botulinum* unter konstanten Wachstumsbedingungen bei einem pH=6



Die Abbildungen zeigen die Vorhersage durch das ComBase Predictor-Modell<sup>84</sup> zur Vermehrung von nicht-proteolytischem *C. botulinum* unter konstanten Wachstumsbedingungen bei

einem pH=6 sowie den verschiedenen Salzgehalten von 1 % ( $a_w=0,995$ , oberste Linie), 2 % ( $a_w=0,989$ , zweite Linie von oben), 3 % ( $a_w=0,983$ , zweite Linie von unten) und 4 % ( $a_w=0,977$ , unterste Linie) sowie Temperaturen von 10 °C (Abb. 1a, links) bzw. 20 °C (Abb. 1b, rechts).

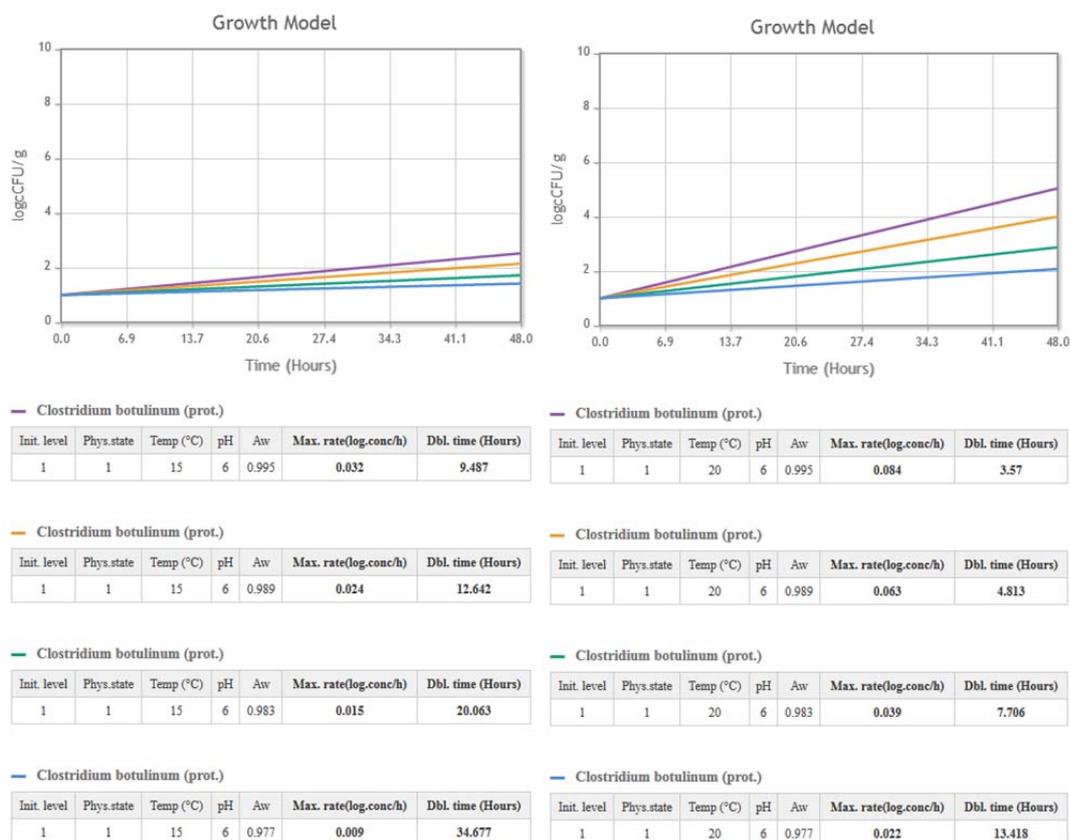
**Abbildung 2: Einfluss der Inkubationstemperatur auf den Zeitpunkt der Toxinbildung bei nicht-proteolytischem *C. botulinum* (Grafik entnommen aus Peck et al., 2006<sup>88</sup>)**



Die Kurve beschreibt die mittels „Combase Predictor“ vorhergesagte Zeit bis zur Toxinbildung. Abgebildet sind außerdem festgestellte Zeiten bis zur Toxinbildung in Lebensmitteln bei 4 °C, 5 °C, 6 °C, 8 °C und 10 °C. Mehrere Beobachtungen pro Temperatur/Zeit-Kombination wurden als Balken gruppiert. Am 25. Tag verliefen viele Tests auf Toxinbildung negativ (vor allem bei 4-7 °C, diese sind nicht abgebildet).

Die verfügbaren Prognosemodelle lassen sich auch für die Vorhersage der Vermehrung von proteolytischem *C. botulinum* nutzen. In Abbildung 3 sind die Ergebnisse des ComBase Predictor-Modells für die Vermehrung von proteolytischem *C. botulinum* bei Temperaturen von 15 °C bzw. 20 °C dargestellt. Aus diesen Prognosen wird deutlich, dass bei einer Lagertemperatur von 15 °C innerhalb der ersten zwei Tage nur ein vernachlässigbares Toxinbildungsrisiko besteht. Diese Prognose lässt sich durch das entsprechende „Time-to-Turbidity“ PMP-Modell<sup>89</sup> bestätigen. Das PMP-Modell sagt vorher, dass erst nach 13-tägiger (unteres Konfidenzlimit) Lagerung bei 15 °C ein 42 %-iges Risiko zur Vermehrung von proteolytischem *C. botulinum* besteht (bei  $a_w=1$  und einer Ausgangskeimzahl von 10.000 Kolonie bildenden Einheiten pro Gramm). Bei einer Temperatur von 20 °C besteht zumindest bei Salzgehalten von 1 % oder 2 % gemäß der Prognose des ComBase Predictor-Modells ein erhöhtes Risiko, dass proteolytische *C. botulinum*-Stämme BoNT bilden. Gemäß Prognose des PMP-Modells besteht in Lebensmitteln mit 1 % Salz nach sechs Tagen Lagerung bei 20 °C eine 50 %-ige Wachstumswahrscheinlichkeit von proteolytischem *C. botulinum* (Ausgangskeimzahl von 10.000 Kolonie bildenden Einheiten pro Gramm, Daten hier nicht dargestellt).

Abbildung 3: Vorhersage durch das ComBase Predictor-Modell<sup>84</sup> zur Vermehrung von proteolytischem *C. botulinum* unter konstanten Wachstumsbedingungen bei pH=6



Die Abbildungen zeigen die Vorhersage durch das ComBase Predictor-Modell<sup>84</sup> zur Vermehrung von proteolytischem *C. botulinum* unter konstanten Wachstumsbedingungen bei pH=6 und den verschiedenen Salzgehalten von 1 % ( $a_w=0,995$ , oberste Linie), 2 % ( $a_w=0,989$ , zweite Linie von oben), 3 % ( $a_w=0,983$ , zweite Linie von unten) und 4 % ( $a_w=0,977$ , unterste Linie) sowie Temperaturen von 15 °C (Abb. 3a, links) bzw. 20 °C (Abb. 3b, rechts).

### 3.1.3.3 Vertrieb und Verzehr von gesalzenen und getrockneten Fischerzeugnissen

Gemäß einem von der Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE) veröffentlichtem „Bericht über die Anlandungen von Fischereierzeugnissen durch deutsche Fischerfahrzeuge“<sup>90</sup> wurden Plötzen im Jahr 2015 nur in Mecklenburg-Vorpommern angelandet (472 Tonnen).

Eine vom BfR durchgeführte Abfrage in der EUROSTAT-Comext Datenbank<sup>91</sup> ergab, dass Produkte der Warengruppe „Fisch, getrocknet, auch gesalzen, nicht geräuchert (ausgenommen Kabeljau, Polardorsch, Hering, Sardelle, Atlantischer Heilbutt sowie Filets und Fischnebenerzeugnisse)“ im Jahr 2014 überwiegend aus Litauen (151 Tonnen), Norwegen (107 Tonnen), den Niederlanden (99 Tonnen), Polen (37 Tonnen) und Dänemark (18 Tonnen) nach Deutschland gelangten. Von Deutschland aus wurden Erzeugnisse dieser Lebensmittelgruppe in mindestens 13 europäische Staaten vertrieben.

Der Verzehr von gesalzenen und getrockneten Fischerzeugnissen ist in vielen Ländern üblich<sup>92</sup>. Darüber hinaus hat der Verzehr von nicht ausgenommenen, gesalzenen Fischen in einigen Ländern Tradition, beispielsweise in Israel, Ägypten und Russland, und ist starken saisonalen Schwankungen unterworfen<sup>92</sup>.

Eine im BfR durchgeführte Onlinerecherche ergab, dass gesalzene und getrocknete Plötzen auch von Privatpersonen im Internet verkauft werden (z.B. bei ebay). Hier besteht das zusätzliche Risiko, dass über diese Vertriebswege verkaufte Produkte nicht den gesetzlichen Kennzeichnungspflichten entsprechen und vom Inverkehrbringer nicht bei den vom Hersteller geforderten Lagerbedingungen gelagert und verschickt werden.

### 3.1.4 Risikocharakterisierung

Da die im BfR durchgeführten Literaturstudien ergaben, dass *C. butyricum* und *C. baratii* im Rahmen der gesundheitlichen Bewertung von Fischerzeugnissen von untergeordneter Bedeutung sind, hat sich das BfR bei der nachfolgenden Risikocharakterisierung auf das Wachstum und die Toxinbildung von *C. botulinum* in frischen und verarbeiteten Plötzen beschränkt.

Publizierte Daten lassen den Schluss zu, dass im Darm von Plötzen mit dem Vorkommen niedriger Sporenkonzentrationen von *C. botulinum* Typ E gerechnet werden muss. Die vorhandenen Sporen können unter Umständen in lebenden und in toten Plötzen auskeimen, sich vermehren und BoNT Typ E bilden. In Abhängigkeit von der gebildeten Toxinmenge können auch Plötzen an Botulismus erkranken und sterben. Die Vermehrung von *C. botulinum* Typ E führt nicht zu Verderbserscheinungen und ist daher für Verbraucherinnen und Verbraucher nicht erkennbar.

Zwar können *C. botulinum* auch auf der Oberfläche von Plötzen vorhanden sein und beim Ausnehmen der Fische können *C. botulinum* und BoNT Typ E auf die Fischmuskulatur gelangen. Durch ein zeitnahes und sorgfältiges Ausnehmen und Waschen der Plötzen nach dem Fang lassen sich die Mengen an *C. botulinum* und BoNT Typ E und damit das Botulismusrisiko für den Menschen reduzieren. Das Salzen und Trocknen der Plötzen hat keinen Effekt auf den bereits im Fisch vorhandenen BoNT- oder Sporengehalt.

Weniger wahrscheinlich ist, dass sich proteolytische *C. botulinum*-Stämme, die nach dem Fang durch Hygienemängel auf die Oberflächen der Plötzen gelangt sind, dort vermehren und BoNT bilden.

Das Risiko für den Menschen, an Botulismus zu erkranken, ist abhängig vom Gesundheitszustand der gefangenen Plötzen, von der weiteren Verarbeitung und von der Art des Verzehr. Die Schwere der Erkrankung ist abhängig vom Typ und von der Menge der aufgenommenen BoNT. Todesfälle sind möglich. Botulismus-Fälle beim Menschen sind unwahrscheinlich, wenn die gesalzenen und getrockneten Plötzen vor dem Verzehr ausreichend erhitzt werden, beispielsweise für mindestens zehn Minuten auf eine Kerntemperatur von mindestens 85 °C.

Nachfolgend wird anhand von drei verschiedenen Szenarien das Verbraucherrisiko charakterisiert, das in Deutschland von gesalzenen und getrockneten Plötzen ausgeht, die ohne ausreichende Erhitzung verzehrt werden. Unberücksichtigt bleibt dabei das Risiko, dass *C. botulinum* von gesalzenen und getrockneten Plötzen durch Kreuzkontamination in weitere Lebensmittel gelangt und sich dort bis zu deren Verzehr vermehren kann.

*Szenarium 1: Es werden gesalzene und getrocknete Plötzen verzehrt, deren Därme zum Zeitpunkt des Fangs geringe Mengen an C. botulinum Typ E-Sporen enthielten.*

Bei Temperaturen von  $>1$  °C ist es möglich, dass vorhandene Sporen von *C. botulinum* Typ E im Darm oder in der Bauchhöhle von Plötzen auskeimen. Eine Vermehrung von *C. botulinum* Typ E wäre grundsätzlich möglich, wenn die Plötzen bis zur Salzung bei Temperaturen von  $>3$  °C gelagert und transportiert werden. Das Risiko der Bildung von BoNT Typ E in den Plötzen ist abhängig von der vorhandenen Erregerkonzentration, der Lagertemperatur und der Lagerdauer.

*C. botulinum* Typ E könnte sich außerdem während der Salzung der Plötzen vermehren und BoNT Typ E bilden, wenn die Salzmenge zu gering oder ungleichmäßig verteilt ist, die Plötzen zu dick sind, oder wenn die Plötzen bei zu geringer Salzkonzentration zu lange bzw. bei zu hohen Temperaturen gesalzen werden (siehe Abbildung 1).

Die Möglichkeit des Wachstums und der Bildung von BoNT Typ E während der Trocknung hängt vom gewählten Trocknungsverfahren, der Trocknungsdauer und der Fischdicke ab. Werden die Plötzen bei Temperaturen von  $\leq 3$  °C getrocknet, ist die Bildung von BoNT Typ E unwahrscheinlich. *C. botulinum* Typ E könnte sich aber unter Umständen zu Beginn der Trocknung vermehren und BoNT Typ E bilden, wenn die Trocknungstemperatur ausreichend hoch und der Salzgehalt im Fisch zu gering ist. Dieses Risiko ist bei nicht oder unzureichend ausgenommenen Plötzen höher als bei Plötzen, deren Innereien kurz nach dem Fang sorgfältig entfernt wurden.

In den gesalzene und getrockneten Plötzen kann sich *C. botulinum* Typ E während der Lagerung nur dann weiter vermehren und BoNT Typ E bilden, wenn der Salzgehalt zu gering ist ( $a_w$ -Wert  $>0,97$ ) und die notwendigen Lagertemperaturen nicht eingehalten werden.

*Szenarium 2: Es werden gesalzene und getrocknete Plötzen verzehrt, die vor dem Fang an Botulismus erkrankt oder gestorben waren.*

Wenn für die Herstellung der Produkte an Typ E-Botulismus erkrankte oder gestorbene Plötzen verwendet werden, ist es möglich, dass Menschen nach deren Verzehr ebenfalls an Botulismus erkranken. Das Botulismusrisiko für den Menschen würde weiter ansteigen, wenn sich die in den Plötzen vorhandenen *C. botulinum*-Sporen oder vegetativen Zellen durch die gewählten Lagerungs- und Verarbeitungsbedingungen weiter vermehren können (siehe Szenarium 1). Das Botulismusrisiko des Menschen steigt, wenn die Innereien der nicht ausgenommenen Plötzen mitverzehrt werden.

*Szenarium 3: Es werden gesalzene und getrocknete Plötzen verzehrt, die nach dem Fang mit proteolytischem C. botulinum kontaminiert wurden.*

Grundsätzlich ist es möglich, dass Plötzen nach dem Fang mit Sporen von proteolytischem *C. botulinum* aus der Umwelt kontaminiert werden und diese Sporen auf den Fischoberflächen auskeimen. Eine bedeutende Vermehrung von proteolytischem *C. botulinum* bis zur Salzung ist unwahrscheinlich, wenn die Plötzen bis zur Salzung bei Temperaturen von  $<14$  °C gelagert und transportiert werden. Proteolytische *C. bo-*

*tulinum*-Stämme können sich unter anaeroben Bedingungen nur dann während der Verarbeitung oder Lagerung vermehren und BoNT bilden, wenn die Salzkonzentration zu gering bzw. die Wasseraktivität zu hoch ist ( $a_w$ -Wert  $\geq 0,93$ ), oder wenn die Prozessbedingungen zu lange zu warm sind (siehe Abbildung 3).

### 3.1.4.1 Bewertungen der Qualität der Daten

Es ist davon auszugehen, dass schwer verlaufende Botulismus-Erkrankungen, die mit Lähmungserscheinungen einhergehen, als solche erkannt und gemeldet werden. Leichte Krankheitsverläufe, die nur mit Magen-Darm-Symptomen einhergehen, werden dagegen möglicherweise nicht immer erkannt und nicht als Botulismus-Fälle gemeldet.

Die Herstellungsverfahren für gesalzene und getrocknete Plötzen können abhängig vom Hersteller sehr unterschiedlich sein und sind dem BfR im Einzelnen nicht bekannt. Auch die Vorgaben zur Lagerung und Mindesthaltbarkeit sind produkt- und herstellerspezifisch.

Erhebliche Unsicherheiten existieren ebenfalls im Bereich der mathematischen Modellierung. Die oben aufgeführten Prognosemodelle wurden auf Basis von experimentellen Untersuchungen zum Wachstum der Erreger in Nährmedien entwickelt und sollten nicht ohne Validierungsstudie auf konkrete Lebensmittel übertragen werden. Experimentelle Studien wären nötig, um das Verhalten von neurotoxinbildenden *Clostridium* spp. und das Vorkommen von BoNT entlang der Prozesskette von ausgenommenen und nicht ausgenommenen gesalzene und getrockneten Plötzen und anderen Fischerzeugnissen besser abschätzen zu können. Daten aus solchen Studien liegen dem BfR nicht vor (in der gesamten ComBase-Datenbank liegen nur sechs Datensätze zum Wachstum von nicht-proteolytischem *C. botulinum* in Fisch (Seafood) vor). Darüber hinaus besteht Bedarf an Methoden zur Erzeugung mathematischer Modelle auf Basis von Tenazitätsdaten, die unter praxisnahen, veränderlichen Prozessbedingungen gesammelt wurden.

Gleichwohl lässt sich anhand der Modelle ableiten, welche Faktoren das Wachstum und die Toxinbildung von *C. botulinum* beeinflussen.

Die aufgeführten Unsicherheiten hinsichtlich des Vorkommens und des Verhaltens von *C. botulinum* wurden bei der Bewertung entsprechend berücksichtigt.

## 3.2 Weitere Aspekte

### 3.2.1 Nachweis von Neurotoxinbildenden *Clostridium* spp. in Lebensmitteln

Das Verfahren nach DIN CEN ISO/TS 17919:2014-03 eignet sich für den molekularbiologischen Nachweis von *C. botulinum*-Stämmen der Gruppen I und II in Lebensmitteln, Futtermitteln und Umgebungsproben. Mit diesem PCR-Verfahren zum Nachweis der Toxingene lassen sich außerdem *C. butyricum* und *C. baratii* detektieren, welche die BoNT Typen E und F bilden. Im Falle eines positiven PCR-Befundes muss jedoch ein kultureller Nachweis inklusive Toxinnachweis angeschlossen werden. Hierzu eignet sich das Verfahren nach der Norm DIN 10102:1988-06 bzw. dem Untersuchungsverfahren nach §64 LFGB, L 06.00-26. Dieser sogenannte „Mäuse-Bioassay“ gilt bislang als Gold-Standard und ist sowohl für proteolytische als auch für nicht-proteolytische *C. botulinum*-Stämme geeignet.

Das Verfahren nach DIN 10103:1993-08 zur Bestimmung mesophiler sulfitreduzierender Clostridien in Fleisch und Fleischerzeugnissen ist zum Nachweis von nicht-proteolytischen *C. botulinum*-Stämmen weniger gut geeignet, da sich die Kolonien dieser Stämme auf dem

Selektivagar (Sulfit-Cycloserin-Azid-Agar) nicht immer schwarz färben<sup>93</sup>. Außerdem ist die Bebrütungstemperatur von 37 °C für nicht-proteolytische *C. botulinum*-Stämme suboptimal, so dass diese bei Anwesenheit anderer Clostridien nicht sicher nachweisbar wären.

### 3.2.2 Diätetische Aspekte

Übermäßiger Salzkonsum kann zu Bluthochdruck und anderen Herz-Kreislauf-Erkrankungen führen. Seit einigen Jahren gibt es deshalb Bestrebungen, den Salzgehalt in Lebensmitteln zu reduzieren. Um die mikrobiologische Sicherheit der Produkte nicht zu gefährden, muss die Salzreduktion durch andere Maßnahmen kompensiert werden, z.B. durch stärkere Trocknung, Senkung der Lagertemperatur und Verkürzung der Haltbarkeitsfrist. Die Senkung der Lagertemperatur auf  $\leq 3$  °C als alleinige Maßnahme ist nicht ausreichend, weil die Kühlhinweise im Handel und vor allem in Privathaushalten nicht immer eingehalten werden.

Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, dass Verbraucherinnen und Verbraucher erwarten, dass gesalzene und getrocknete Plötzen ohne Kühlung haltbar sind, insbesondere dann, wenn diese Personen aus Ländern stammen, in denen der Verzehr von getrockneten Fischerzeugnissen Tradition hat oder die deutsche Kennzeichnung für sie nicht verständlich ist.

## 4 Handlungsrahmen / Maßnahmen

Da Sporen von *C. botulinum* in Fischeingeweiden vorkommen, sollten Fische, die durch Salzen oder Trocknen haltbar gemacht werden, gemäß Empfehlung der US Food and Drug Administration (FDA)<sup>94</sup> vor der Verarbeitung vollständig und sorgfältig ausgenommen werden. Kleinste Reste von Eingeweiden in der Bauchhöhle erhöhen das Risiko der Bildung von BoNT. Von dieser Empfehlung ausgenommen sind sehr kleine Fische mit einer maximalen Länge von 12,7 cm, die 10 % Salz in der wässrigen Phase enthalten und im Kühlschrank gelagert werden oder einen  $a_w$ -Wert von  $< 0,85$  besitzen.

Um das Wachstum und die Toxinbildung von nicht-proteolytischem *C. botulinum* in Fischerzeugnissen zu kontrollieren, empfiehlt die FDA<sup>94</sup>, die Wasseraktivität in Fischerzeugnissen durch Zugabe von Salz (mindestens 5 % Salz in der wässrigen Phase) und/oder Trocknung auf einen  $a_w$ -Wert von  $\leq 0,97$  zu reduzieren. Um auch das Wachstum und ggf. die Toxinbildung anderer pathogener Bakterien (insbesondere *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, proteolytisches *C. botulinum* aber auch *C. baratii* und *C. butyricum*) zu verhindern, empfiehlt die FDA darüber hinaus, auch getrocknete Lebensmittel mit  $a_w$ -Werten über 0,85 sicherheitshalber durchgehend zu kühlen<sup>95</sup>.

Die Ergebnisse der im BfR durchgeführten Literaturstudien und Modellierungen (prädiaktive Mikrobiologie) zeigen, dass aus mikrobiologischer Sicht die nachfolgenden Maßnahmen geeignet sind, die Wahrscheinlichkeit der Bildung von BoNT und anderen bakteriellen Toxinen in und auf Plötzen zu reduzieren. Mit den nachfolgend aufgelisteten Maßnahmen lässt sich das Botulismusrisiko des Menschen und das Risiko für andere lebensmittelbedingte Intoxikationen durch gesalzene und getrocknete Plötzen minimieren:

1. Frische Plötzen bei Temperaturen von  $\leq 3$  °C lagern
2. Plötzen, die durch Salzen und Trocknen haltbar gemacht werden sollen, zeitnah nach dem Fang sorgfältig und vollständig ausnehmen; danach innen und außen gründlich waschen
3. Plötzen, die über mehrere Tage gesalzen werden, vorsichtshalber zusätzlich kühlen

4. Plötzen, die mehrere Tage bei Temperaturen oberhalb von 8 °C getrocknet werden sollen, vorher ausreichend salzen, um eine Vermehrung von *C. botulinum* Typ E während der Trocknung durch Senkung der Wasseraktivität auf einen  $a_w$ -Wert von  $\leq 0,97$  auszuschließen
5. Gesalzene und getrocknete Plötzen vor der Abgabe an Verbraucherinnen und Verbraucher ausreichend stabilisieren ( $a_w$ -Wert im Zentrum der dicksten Stelle des Fisches  $\leq 0,85$ ), um eine Vermehrung von anderen bakteriellen Toxinbildnern, insbesondere *Staphylococcus aureus*, während der ungekühlten Lagerung zu verhindern
6. Gesalzene und getrocknete Plötzen nur nach ausreichender Erhitzung verzehren (z.B. mindestens zehn Minuten auf mindestens 85 °C Kerntemperatur erhitzen)
7. Keine Innereien von nicht ausreichend erhitzten Plötzen verzehren

Spezifischere Maßnahmen kann das BfR nicht empfehlen, weil dem BfR keine Daten zur Herstellung der verdächtigen Chargen übermittelt wurden.

## 5 Referenzen

1. EFSA, ECDC. Type E botulism associated with fish product consumption – Germany and Spain – 20 December 2016. Stockholm: ECDC. EFSA Supporting Publications. 2017;13(12).
2. Blaschek HP. Clostridium. In: Batt CA, Tortorello, M.L., editor. Encyclopedia of Food Microbiology. 2. London, UK: Academic Press; 2014. p. 444-8.
3. DGE. 12. Ernährungsbericht: DGE, Deutsche Gesellschaft für Ernährung e.V.; 2012.
4. Barash JR, Arnon SS. A Novel Strain of Clostridium botulinum That Produces Type B and Type H Botulinum Toxins. Journal of Infectious Diseases. 2014;209(2):183-91.
5. Peck MW, van Vliet AH. Impact of Clostridium botulinum genomic diversity on food safety. Current opinion in food science. 2016;10:52-9.
6. Stringer SC, Webb MD, Peck MW. Lag time variability in individual spores of Clostridium botulinum. Food Microbiol. 2011;28(2):228-35.
7. Brown KL. Control of bacterial spores. Br Med Bull. 2000;56(1):158-71.
8. BfR. Kritischer als Gammelfleisch: Toxinbildende Bakterien und ihre Giftstoffe in Fleisch und Fleischerzeugnissen. 2005 21.12.2005. Report No.: Stellungnahme Nr. 004/2006 des BfR
9. Lovenklev M, Holst E, Borch E, Radstrom P. Relative neurotoxin gene expression in clostridium botulinum type B, determined using quantitative reverse transcription-PCR. Applied and environmental microbiology. 2004;70(5):2919-27.
10. Sharkey FH, Dooley JS, Haylock RW. Quantitative effects of carbohydrates and aromatic amino acids on Clostridium botulinum toxin gene expression using a rapid competitive RT/PCR assay. J Mol Microbiol Biotechnol. 2005;9(1):35-43.
11. BMELV. Beitrag zur frühzeitigen Erkennung bioterroristischer Angriffe auf die Lebensmittelkette - Ein Handbuch: Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV); 2011.
12. Hannett GE, Stone WB, Davis SW, Wroblewski D. Biodiversity of Clostridium botulinum type E associated with a large outbreak of botulism in wildlife from Lake Erie and Lake Ontario. Applied and environmental microbiology. 2011;77(3):1061-8.
13. Hielm S, Hyytia E, Andersin AB, Korkeala H. A high prevalence of Clostridium botulinum type E in Finnish freshwater and Baltic Sea sediment samples. Journal of applied microbiology. 1998;84(1):133-7.
14. Hyytia E, Hielm S, Bjorkroth J, Korkeala H. Biodiversity of Clostridium botulinum type E strains isolated from fish and fishery products. Applied and environmental microbiology. 1999;65(5):2057-64.
15. Rings DM. Clostridial disease associated with neurologic signs: tetanus, botulism, and enterotoxemia. Vet Clin North Am Food Anim Pract. 2004;20(2):379-91, vii-viii.
16. Smart JL, Jones TO, Clegg FG, McMurtry MJ. Poultry waste associated type C botulism in cattle. Epidemiol Infect. 1987;98(1):73-9.
17. Suen JC, Hatheway CL, Steigerwalt AG, Brenner DJ. Genetic confirmation of identities of neurotoxic Clostridium baratii and Clostridium butyricum implicated as agents of infant botulism. J Clin Microbiol. 1988;26(10):2191-2.
18. Ghoddusi HB, Sherburn R. Preliminary study on the isolation of Clostridium butyricum strains from natural sources in the UK and screening the isolates for presence of the type E botulin toxin gene. Int J Food Microbiol. 2010;142(1-2):202-6.
19. Morton RD, Scott VN, Bernard DT, Wiley RC. Effect of Heat and pH on Toxigenic Clostridium butyricum. Journal of Food Science. 1990;55(6):1725-7.
20. Ghoddusi HB, Sherburn RE, Aboaba OO. Growth Limiting pH, Water Activity, and Temperature for Neurotoxic Strains of Clostridium butyricum. ISRN microbiology. 2013;2013:731430.

21. Anniballi F, Fenicia L, Franciosa G, Aureli P. Influence of pH and temperature on the growth of and toxin production by neurotoxic strains of *Clostridium butyricum* type E. *J Food Prot.* 2002;65(8):1267-70.
22. Feldhusen F. [Seafood transmitted diseases]. *Dtsch Tierarztl Wochenschr.* 1999;106(8):319-25.
23. Messelhäußer U. *Clostridium botulinum*, Band I, Vorkommen, Bedeutung und Erkrankungsformen. Verlag Bs, editor: Behr's; 2015. 88 p.
24. Bell C, Kyriakides A. *Clostridium Botulinum: A practical approach to the organism and its control in foods.* Ltd. BS, editor: Blackwell Science; 2000. 316 p.
25. ACMSF. Report on Minimally Processed Infant Weaning Foods and the Risk of Infant Botulism. 2006.
26. Eleopra R, Tugnoli V, Rossetto O, De Grandis D, Montecucco C. Different time courses of recovery after poisoning with botulinum neurotoxin serotypes A and E in humans. *Neurosci Lett.* 1998;256(3):135-8.
27. Woodruff BA, Griffin PM, McCroskey LM, Smart JF, Wainwright RB, Bryant RG, et al. Clinical and laboratory comparison of botulism from toxin types A, B, and E in the United States, 1975-1988. *The Journal of infectious diseases.* 1992;166(6):1281-6.
28. Schneider D. Entwicklung und Etablierung verschiedener Nachweisverfahren für *Clostridium botulinum* und aktiver Toxinnachweis mit ELISA-Verfahren in unterschiedlichen Lebensmittelmatrizes sowie Untersuchungen zur Stabilität der Toxine.: Freie Universität Berlin; 2013.
29. CDC. Foodborne Outbreak Online Database (FOOD Tool) CDC. 2016; <https://www.cdc.gov/foodborneoutbreaks/> (10.04.2017).
30. RKI. Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2015: Robert Koch-Institut; 2016.
31. BfR. An Krankheitsausbrüchen beteiligte Lebensmittel in Deutschland im Jahr 2010 - 2014. [http://www.bfr.bund.de/de/lebensmittelbedingte\\_krankheitsausbrueche-7608.html](http://www.bfr.bund.de/de/lebensmittelbedingte_krankheitsausbrueche-7608.html). 2011-2015;(05.04.2017).
32. Rosner B, Schewe T. Gemeinsamer nationaler Bericht des BVL und RKI zu lebensmittelbedingten Krankheitsausbrüchen in Deutschland, 2015. *J Verbr Lebensm.* 2017;12(1):73-83.
33. BfR. An Krankheitsausbrüchen beteiligte Lebensmittel in Deutschland im Jahr 2010 [http://www.bfr.bund.de/de/lebensmittelbedingte\\_krankheitsausbrueche-7608.html](http://www.bfr.bund.de/de/lebensmittelbedingte_krankheitsausbrueche-7608.html). 2011;(05.04.2017).
34. BfR. An Krankheitsausbrüchen beteiligte Lebensmittel in Deutschland im Jahr 2014. [http://www.bfr.bund.de/de/lebensmittelbedingte\\_krankheitsausbrueche-7608.html](http://www.bfr.bund.de/de/lebensmittelbedingte_krankheitsausbrueche-7608.html) 2015;(05.04.2017).
35. Dressler D. [Botulism caused by consumption of smoked salmon]. *Nervenarzt.* 2005;76(6):763-6.
36. FDA. CPG Sec. 540.650 Unviscerated Fish Products that are Salt-cured, Dried, or Smoked (Revised). <https://www.fda.gov/iceci/compliancemanuals/compliancepolicyguidancemanual/ucm124048.htm>. 2005;(05.04.2017).
37. Weber JT, Hibbs RG, Darwish A, Mishu B, Corwin AL, Rakha M, et al. A Massive Outbreak of Type-E Botulism Associated with Traditional Salted Fish in Cairo. *Journal of Infectious Diseases.* 1993;167(2):451-4.
38. Walton RN, Clemens A, Chung J, Moore S, Wharton D, Haydu L, et al. Outbreak of type E foodborne botulism linked to traditionally prepared salted fish in Ontario, Canada. *Foodborne pathogens and disease.* 2014;11(10):830-4.
39. Slater PE, Addiss DG, Cohen A, Leventhal A, Chassis G, Zehavi H, et al. Foodborne botulism: an international outbreak. *Int J Epidemiol.* 1989;18(3):693-6.

40. Telzak EE, Bell EP, Kautter DA, Crowell L, Budnick LD, Morse DL, et al. An international outbreak of type E botulism due to uneviscerated fish. *The Journal of infectious diseases*. 1990;161(2):340-2.
41. Centers for Disease C. Botulism associated with commercially distributed kapchunka-New York City. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 1985;34(35):546-7.
42. Sobel J, Malavet M, John S. Outbreak of clinically mild botulism type E illness from home-salted fish in patients presenting with predominantly gastrointestinal symptoms. *Clinical Infectious Diseases*. 2007;45(2):E14-E6.
43. French G, Pavlick A, Felsen A, Gross P, Brook J, Paul S, et al. Outbreak of Type-E Botulism Associated with an Uneviscerated, Salt-Cured Fish Product - New-Jersey, 1992 (Reprinted from *Morbidity and Mortality Weekly Report*, Vol 41, Pg 521-522, 1992). *Jama-J Am Med Assoc*. 1992;268(8):963-.
44. Sobel J, Tucker N, Sulka A, McLaughlin J, Maslanka S. Foodborne botulism in the United States, 1990-2000. *Emerg Infect Dis*. 2004;10(9):1606-11.
45. Shaffer N, Wainwright RB, Middaugh JP, Tauxe RV. Botulism among Alaska Natives. The role of changing food preparation and consumption practices. *West J Med*. 1990;153(4):390-3.
46. McLaughlin JB, Sobel J, Lynn T, Funk E, Middaugh JP. Botulism type E outbreak associated with eating a beached whale, Alaska. *Emerging Infectious Diseases*. 2004;10(9):1685-7.
47. Miller LG, Clark PS, Kunkle GA. Possible origin of *Clostridium botulinum* contamination of Eskimo foods in northwestern Alaska. *Appl Microbiol*. 1972;23(2):427-8.
48. Eriksen T, Brantsaeter AB, Kiehl W, Steffens I. Botulism infection after eating fish in Norway and Germany: two outbreak reports. *Eurosurveillance*. 2004;8(3).
49. Abe Y, Negasawa T, Monma C, Oka A. Infantile botulism caused by *Clostridium butyricum* type E toxin. *Pediatric neurology*. 2008;38(1):55-7.
50. Aureli P, Fenicia L, Pasolini B, Gianfranceschi M, McCroskey LM, Hatheway CL. Two cases of type E infant botulism caused by neurotoxicogenic *Clostridium butyricum* in Italy. *The Journal of infectious diseases*. 1986;154(2):207-11.
51. Dykes JK, Luquez C, Raphael BH, McCroskey L, Maslanka SE. Laboratory Investigation of the First Case of Botulism Caused by *Clostridium butyricum* Type E Toxin in the United States. *J Clin Microbiol*. 2015;53(10):3363-5.
52. Meng X, Karasawa T, Zou K, Kuang X, Wang X, Lu C, et al. Characterization of a neurotoxicogenic *Clostridium butyricum* strain isolated from the food implicated in an outbreak of food-borne type E botulism. *J Clin Microbiol*. 1997;35(8):2160-2.
53. Hall JD, McCroskey LM, Pincomb BJ, Hatheway CL. Isolation of an organism resembling *Clostridium baratii* which produces type F botulin toxin from an infant with botulism. *J Clin Microbiol*. 1985;21(4):654-5.
54. Gupta A, Sumner CJ, Castor M, Maslanka S, Sobel J. Adult botulism type F in the United States, 1981-2002. *Neurology*. 2005;65(11):1694-700.
55. Harvey SM, Sturgeon J, Dassey DE. Botulism due to *Clostridium baratii* type F toxin. *J Clin Microbiol*. 2002;40(6):2260-2.
56. Castor C, Mazuet C, Saint-Leger M, Vygen S, Coutureau J, Durand M, et al. Cluster of two cases of botulism due to *Clostridium baratii* type F in France, November 2014. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*. 2015;20(6).
57. Trehard H, Poujol I, Mazuet C, Blanc Q, Gillet Y, Rossignol F, et al. A cluster of three cases of botulism due to *Clostridium baratii* type F, France, August 2015. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*. 2016;21(4).

58. Lafuente S, Nolla J, Valdezate S, Tortajada C, Vargas-Leguas H, Parron I, et al. Two simultaneous botulism outbreaks in Barcelona: *Clostridium baratii* and *Clostridium botulinum*. *Epidemiology and Infection*. 2013;141(9):1993-5.
59. Wikipedia. <https://de.wikipedia.org/wiki/Rotauge>. (16.03.2017);(07.04.2017).
60. Banneke S, Bartelt E, Sipos G, Karl H, Meyer C, Lagrange F, et al. Ausnahmen von Fischen - Forschungsvorhaben zum Vergleich gesundheitlich-hygienischer und technisch-handelsrelevanter Aspekte bei ausgenommenen und nicht ausgenommenen gelagerten Fischen. 2002;4:83.
61. Ken Gall SK, Charles H. Dyson, Debra DeVlieger, Steve Otwell, Victor Garrido, Lori Pivarnik, Doris Hicks, Karla Ruzicka. HACCP Training and Education Course: Chapter 4: Dried Fish and Fishery Products  
<http://seafood.oregonstate.edu/pdf%20Links/Compendium/Chapter-4-Dried-Fish.pdf>.
62. Jónsson Á, Finnbogadóttir GA, Porkelsson G, Magnússon H, Reykdal Ó, Arason S. Dried fish as health food. *Matis Food Research, Innovation & Safety*. 2007.
63. Hsu WH, Deng JC. Processing of Cured Mullet Roe. *Journal of Food Science*. 1980;45(1):97-101.
64. Lan Chun C, Kahn CI, Borchert AJ, Byappanahalli MN, Whitman RL, Peller J, et al. Prevalence of toxin-producing *Clostridium botulinum* associated with the macroalga *Cladophora* in three Great Lakes: growth and management. *The Science of the total environment*. 2015;511:523-9.
65. Kasumyan AO, Tinkova TV. Taste attractiveness of different hydrobionts for roach *Rutilus rutilus*, bitterling *Rhodeus sericeus amarus*, and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of Ichthyology*. 2013;53(7):499-508.
66. Gram L. Chapter III: Potential Hazards in Cold-Smoked Fish: *Clostridium botulinum* type E. *J Food Science*. 2001;66(7):S-1082 - S-7.
67. Hudson A, Lake R. Risk profile: *Clostridium botulinum* in Ready-to-Eat Smoked Fish and Shellfish in sealed packaging. New Zealand Government: Ministry for Primary Industries; 2012.
68. Cann DC, Taylor LY. The control of the botulism hazard in hot-smoked trout and mackerel. *J Food Technol*. 1979;14:123-9.
69. Plowman J, Peck MW. Use of a novel method to characterize the response of spores of non-proteolytic *Clostridium botulinum* types B, E and F to a wide range of germinants and conditions. *Journal of applied microbiology*. 2002;92(4):681-94.
70. Peck M, Goodburn K, Betts R, Stringer S. Assessment of the potential for growth and neurotoxin formation by non-proteolytic *Clostridium botulinum* in short shelf-life commercial foods designed to be stored chilled. *Trends in Food Science & Technology*. 2008;19(4):207-16.
71. Graham AF, Mason DR, Maxwell FJ, Peck MW. Effect of pH and NaCl on growth from spores of non-proteolytic *Clostridium botulinum* at chill temperature. *Lett Appl Microbiol*. 1997;24(2):95-100.
72. Kasai Y, Kimura B, Kawasaki S, Fukaya T, Sakuma K, Fujii T. Growth and toxin production by *Clostridium botulinum* in steamed rice aseptically packed under modified atmosphere. *J Food Prot*. 2005;68(5):1005-11.
73. Lund BM, Knox MR, Sims AP. The effect of oxygen and redox potential on growth of *Clostridium botulinum* type E from a spore inoculum. *Food Microbiol*. 1984;1(4):277-87.
74. Lalitha KV, Gopakumar K. Combined effect of sodium chloride, pH and storage temperature on growth and toxin production by *Clostridium botulinum*. *J Aquat Food Prod T*. 2007;16(2):27-39.
75. Eklund MW, Pelroy GA, Paranjpye R, Peterson ME, Teeny FM. Inhibition of *Clostridium-Botulinum* Type-a and Type-E Toxin Production by Liquid Smoke and NaCl in Hot-Process Smoke-Flavored Fish. *J Food Protect*. 1982;45(10):935-&.

76. Hyytia E, Hielm S, Mokka M, Kinnunen A, Korkeala H. Predicted and observed growth and toxigenesis by *Clostridium botulinum* type E in vacuum-packaged fishery product challenge tests. *Int J Food Microbiol.* 1999;47(3):161-9.
77. Dufresne I, Smith JP, Liu JN, Tarte I, Blanchfield B, Austin JW. Effect of films of different oxygen transmission rate on toxin production by *Clostridium botulinum* type E in vacuum packaged cold and hot smoked trout fillets. *J Food Safety.* 2000;20(4):251-68.
78. Cuppett SL, Gray JI, Pestka JJ, Booren AM, Price JF, Kutil CL. Effect of Salt Level and Nitrite on Toxin Production by *Clostridium-Botulinum* Type-E Spores in Smoked Great-Lakes Whitefish. *J Food Protect.* 1987;50(3):212-7.
79. Brand CJ, Schmitt SM, Duncan RM, Cooley TM. An outbreak of type E botulism among common loons (*Gavia immer*) in Michigan's upper peninsula. *J Wildl Dis.* 1988;24(3):471-6.
80. Yule AM, Austin JW, Barker IK, Cadieux B, Moccia RD. Persistence of *Clostridium botulinum* neurotoxin type E in tissues from selected freshwater fish species: implications to public health. *J Food Prot.* 2006;69(5):1164-7.
81. Huss HH, Shaeffer I, Petersen ER, Cann DC. Toxin production by *Clostridium botulinum* type E in fresh herring in relation to the measured oxidation potential (Eh). *Nordisk veterinærmedicin.* 1979;31(2):81-6.
82. Hus HH, Petersen ER. The stability of *Clostridium botulinum* type E toxin in salty and/or acid environment. *International Journal of Food Science & Technology.* 1980;15(6):619-27.
83. Brygoo ER. Résistance des toxines botuliques en dilution dans l'eau. *Annales de l'Institut Pasteur.* 1953;84:1039.
84. Baranyi J, Tamplin ML. ComBase: a common database on microbial responses to food environments. *J Food Prot.* 2004;67(9):1967-71.
85. ComBase. A Web Resource for Quantitative and Predictive Food Microbiology <https://www.combase.cc/index.php/en/>. 2017;(10.04.2017).
86. Whiting RC, Oriente JC. Time-to-turbidity model for non-proteolytic type B *Clostridium botulinum*. *International Journal of Food Microbiology.* 1997;36(1):49-60.
87. Baker DA, Genigeorgis C. Predicting the safe storage of fresh fish under modified atmospheres with respect to *Clostridium botulinum* toxigenesis by modeling length of the lag phase of growth. *J Food Protect.* 1990;53(2).
88. Peck MW, Goodburn KE, Betts RP, Stringer SC. *Clostridium botulinum* in vacuum packed (VP) and modified atmosphere packed (MAP) chilled foods Final Project Report July 2006 (FSA Project B13006). 2006.
89. Whiting RC, Strobaugh TP. Expansion of the time-to-turbidity model for proteolytic *Clostridium botulinum* to include spore numbers. *Food Microbiol.* 1998;15(4):449-53.
90. Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (Hrsg.). Die Hochsee- und Küstenfischerei in der Bundesrepublik Deutschland im Jahre 2015. [http://www.ble.de/SharedDocs/Downloads/DE/Fischerei/Fischwirtschaft/Anlandestatistik2015.pdf?\\_\\_blob=publicationFile&v=1](http://www.ble.de/SharedDocs/Downloads/DE/Fischerei/Fischwirtschaft/Anlandestatistik2015.pdf?__blob=publicationFile&v=1). 2015;(10.04.2017).
91. Eurostat. Database. <http://ec.europa.eu/eurostat/de/data/database>. 2017;(10.04.2017).
92. Lorentzen G, Egeness F-A, Pley IE, Ytterstad E. Shelf life of packaged loins of dried salt-cured cod (*Gadus morhua* L.) stored at elevated temperatures. *Food Control.* 2016;64:65-9.
93. International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF). *Clostridium botulinum*. *Microorganisms in Foods 5: Characteristics of Microbial Pathogens*. London: Blackie Academic & Professional; 1996. p. 69.
94. FDA. Chapter 13: *Clostridium botulinum* Toxin Formation (A Biological Hazard) Fish and Fisheries Products Hazards and Controls Guidance Third Edition. <https://www.fda.gov/downloads/food/guidanceregulation/ucm252416.pdf>. 2001;(10.04.2017).

95. FDA. Pathogenic Bacteria Growth and Toxin Formation as a Result of Inadequate Drying. FDA Chapter 14.293-308.