

# **Zoonosen und Lebensmittelsicherheit**

BfR-Symposium am 13. und 14. November 2012

## **Impressum**

Tagungsband

Zoonosen und Lebensmittelsicherheit  
BfR-Symposium am 13. und 14. November 2012

Bundesinstitut für Risikobewertung  
Pressestelle  
Max-Dohrn-Str. 8–10  
10589 Berlin

Berlin 2012  
93 Seiten

Druck: Umschlag, Inhalt und buchbinderische Verarbeitung  
BfR-Hausdruckerei

€ 5,-

**Inhalt**

<b>Vorwort</b>	<b>5</b>
<b>Programm</b>	<b>7</b>
<b>Kurzfassungen der Beiträge</b>	<b>11</b>
<b>Möglichkeiten und Grenzen der Lebensmittelketten-Verantwortung bei der Bekämpfung von Zoonosen</b>	<b>11</b>
<b>Gesundheits- und Hygienestrategien in der Geflügelhaltung als Grundlage der Lebensmittelsicherheit</b>	<b>17</b>
<b>Salmonellenbekämpfung beim Schwein</b>	<b>19</b>
<b>Hygiene in der Geflügelfleischgewinnung</b>	<b>21</b>
<b>Dekontamination bei Geflügel als Option für sichere Lebensmittel?</b>	<b>25</b>
<b><i>Campylobacter</i> – quo vadis?</b>	<b>27</b>
<b>Livestock-associated MRSA als Besiedler und Krankheitserreger des Menschen – ein Update</b>	<b>31</b>
<b>EHEC – Konsequenzen für die Lebensmittelhygiene nach dem Ausbruch 2012</b>	<b>35</b>
<b>Krankheitsausbrüche durch pflanzliche Lebensmittel</b>	<b>37</b>
<b>Fallbeispiel <i>Salmonella</i> Montevideo: Eintritt in die Lebensmittelkette und Vertrieb durch Online-Shopping – ein Ausbruch der modernen Art</b>	<b>39</b>
<b>Drei Jahre Zoonosen-Monitoring in Deutschland</b>	<b>41</b>
<b>Enteropathogene Yersinien: eine Vorliebe für Schweine?</b>	<b>47</b>
<b>Pathogene Vibrionen in Lebensmitteln und Umwelt</b>	<b>53</b>
<b>Ist die klassische <i>Salmonella</i>-Typisierung noch zeitgemäß?</b>	<b>57</b>
<b><i>Listeria monocytogenes</i> in Lebensmitteln – Aufdeckung von Kontaminationswegen mit Hilfe molekularbiologischer Tools</b>	<b>61</b>
<b>Quantitative Molecularbiological Methods in Food Analytics</b>	<b>64</b>
<b>„Community-Ressourcen“ zur effizienten Expositionsabschätzung und Warenstromanalyse in Lebensmittelkrisen</b>	<b>69</b>
<b>Einfluss der Lagertemperatur auf das Wachstumsverhalten von <i>Salmonella</i> Enteritidis in Hühnereiern</b>	<b>73</b>
<b>Wer ist schuld? Source Attribution für humane Salmonellosefälle in Deutschland</b>	<b>75</b>
<b>Kupfer- und Zinkresistenz in <i>Salmonella</i>-Isolaten vom Schwein und Schweinefleisch</b>	<b>77</b>
<b>Hoch Ciprofloxacin-resistente <i>S. Kentucky</i>-Isolate bei Tier und Mensch</b>	<b>79</b>
<b>Typisierung von <i>Salmonella enterica</i> Serovar Infantis-Stämmen aus Ausbruchsgeschehen in Deutschland (1973–2011)</b>	<b>83</b>
<b>Extended-Spektrum <math>\beta</math>-Laktamasen (ESBL) und AmpC <math>\beta</math>-Laktamasen in <i>Enterobacteriaceae</i> bei Tier, Lebensmitteln und Mensch</b>	<b>87</b>
<b>ESBLs und AmpC, nur ein Problem bei Nutztieren?</b>	<b>89</b>
<b>Drei Jahre Resistenzmonitoring in Deutschland</b>	<b>91</b>



## Vorwort

Sehr geehrte Kollegen und Kolleginnen,  
sehr geehrte Gäste,

wir heißen Sie im BfR recht herzlich zum Symposium  
„Zoonosen und Lebensmittelsicherheit“ willkommen!

Zwei große lebensmittelassoziierte Krankheitsbrüche in den letzten zwei Jahren haben die Bedeutung von Zoonoseerregern und mikrobiellen Kontaminationen von Lebensmitteln eindrucksvoll unterstrichen.

Neben vielen BfR-Fachveranstaltungen im Range von Fachgesprächen oder Workshops zu einzelnen Zoonosethemen, möchte das BfR die Gelegenheit ergreifen, wie im Jahr 2009 ein Symposium zum Stand der Zoonosenforschung und deren Bedeutung für die Lebensmittelsicherheit anzubieten.

In den nächsten zwei Tagen wird Ihnen mit 25 Vorträgen eine Übersicht über bedeutsame und aktuelle Fragestellungen und Bewertungen zu Zoonosen im Kontext der Lebensmittelsicherheit vorgestellt. Hierzu konnten wir eine Vielzahl von Experten und Expertinnen von Universitäten und anderen Forschungseinrichtungen aus dem deutschsprachigen Raum gewinnen, aber auch engagierte Mitarbeiter und Mitarbeiterinnen aus dem BfR und anderen Bundes- und Landesinstituten werden ihre aktuellen Daten präsentieren.

Während die Fallzahlen für Salmonelloseerkrankungen beim Menschen in Deutschland und Europa in den letzten Jahren deutlich gesunken sind und sich andeuten, dass Bekämpfungs- und Hygienemaßnahmen in der Primärproduktion ihre positive Wirkung zeigen haben die beiden großen lebensmittelassoziierten Krankheitsausbrüche in den Jahren 2011 (EHEC in Sprossen) und 2012 (Noroviren in Schulessen) gezeigt, dass Gefahren nicht nur von Lebensmitteln ausgehen können, die aus Tieren gewonnen wurden. Im Lichte eines zunehmend globalen Handels von Lebensmitteln, verstärkter Reisetätigkeit und damit verbunden auch illegalen Einfuhren von Lebensmitteln aus entfernten Regionen sowie legalem aber auch illegalem Import von exotischen Tieren nimmt die Bedeutung der Zoonosen zu. Ausbrüche sind daher häufig nicht nur überregional sondern sie kommen auch grenzüberschreitend vor. Auch multiresistente Erreger, wie der NDM1-bildende *Entero-bacteriaceae* werden nicht zuletzt durch Reisetätigkeit über Grenzen hinweg verbreitet.

Nicht unerwähnt bleiben soll, dass Verbraucherinnen und Verbraucher auch zukünftig durch verbesserte Aufklärung über Hygienemaßnahmen in die Verhütung von alimentär-bedingten zoonotischen Erkrankungen eingebunden werden müssen. Hierzu sollten alle zuständigen Institutionen sowie Verbände verstärkt die Grundprinzipien guter hygienischer Praxis „unter das Volk“ bringen.

Dem aufmerksamen Betrachter wird nicht entgangen sein, dass auf diesem Symposium virale Erreger in Zusammenhang mit Lebensmitteln scheinbar keine Erwähnung finden. Der Grund dafür liegt in einer Aufteilung bzw. Konzentrierung dieses Schwerpunkts in einem eigenständigen BfR-Symposium, welches unmittelbar vor dieser Tagung am 12. November im BfR stattfand.

Alle Mitarbeiter der Abteilung Biologische Sicherheit des BfR wünschen Ihnen eine erfolgreiche Tagung und angenehme Tage in Berlin.

Bernd Appel  
Leiter der Abteilung 4, BfR



## Programm

**Dienstag, 13. November 2012, 09:00-18:00 Uhr**

Begrüßung

Professor Dr. Dr. Andreas Hensel,  
Präsident des BfR, Berlin

Chair: Professor Dr. Thomas Alter,  
Freie Universität, Berlin

9:15-9:40 Uhr            Möglichkeiten und Grenzen der Lebensmittelketten-Verantwortung  
bei der Bekämpfung von Zoonosen  
PD Dr. Lüppo Ellerbroek,, BfR Berlin

9:40-10:05 Uhr        Gesundheits- und Hygienestrategien in der Geflügelhaltung als  
Grundlage der Lebensmittelsicherheit  
Professor Dr. Hafez Mohamed Hafez, Freie Universität Berlin

10:05-10:30 Uhr      Salmonellenbekämpfung beim Schwein  
Dr. Jürgen Harlizius, Landwirtschaftskammer Nordrhein-Westfalen,  
Tiergesundheitsdienste, Bonn

*10:30 – 11:00 Uhr Kaffeepause*

11:00-11:25 Uhr      Hygiene bei der Geflügelfleischgewinnung  
Professor Dr. Reinhard Fries, Freie Universität Berlin

11:25-11:50 Uhr      Dekontamination bei Geflügel als Option für sichere Lebensmittel?  
Prof. Dr. Uwe Truyen, Universität Leipzig

11:50-12:15 Uhr      Campylobacter – quo vadis?  
Dr. Kerstin Stingl, BfR, Berlin

12:15-12:40 Uhr      Livestock-associated MRSA als Besiedler und Krankheitserreger des  
Menschen-ein update  
Dr. Robin Köck, Universität Münster

*12:40 – 14:00 Mittagspause*



**Mittwoch, 14. November 2012, 09:00-17:30 Uhr**

Chair: Dr. Annemarie Käsbohrer, BfR, Berlin

- 9:00-9:30 Uhr            Ist die klassische *Salmonella* Typisierung noch zeitgemäß?  
Dr. Burkhard Malorny, BfR, Berlin
- 9:30-10:00 Uhr        *Listeria monocytogenes* in Lebensmitteln-Aufdeckung von Kontamina-  
tionswegen mit Hilfe molekularer Tools  
Dr. Sylvia Kleta, BfR, Berlin
- 10:00-10:30 Uhr        Quantifizierende molekularbiologische Methoden in der Lebensmittel-  
analytik  
Professor Dr. Martin Wagner, Veterinärmedizinische Universität Wien

*10:30 – 11:00 Uhr Kaffeepause*

- 11:00-11:25 Uhr        „Community-Ressourcen“ zur effizienten Expositionsabschätzung und  
Warenstromanalyse in Lebensmittelkrisen  
Matthias Filter, BfR, Berlin
- 11:25-11:50 Uhr        Mikrobiologische Risikobewertung der Kühlung von Eiern im Hinblick  
auf Salmonellen  
Dr. Annette Johne, BfR, Berlin
- 11:50-12:15 Uhr        Wer ist schuld? Source Attribution für humane Salmonellosefälle in  
Deutschland  
Hannah Sharp, BfR, Berlin

*12:15 – 14:00 Uhr Mittagspause*

Chair: Dr. Juliane Bräunig, BfR, Berlin

- 14:00-14:25 Uhr        Kupfer- und Zinkresistenz in *Salmonella*-Isolaten vom Schwein und  
Schweinefleisch  
Dr. Andreas Schroeter, BfR, Berlin
- 14:25-14:50 Uhr        Hoch Ciprofloxacin resistente *S. Kentucky* Isolate bei Tier und Mensch  
Dr. Janine Beutlich, BfR, Berlin
- 14:50-15:15            Typisierung von *Salmonella enterica* serovar Infantis Stämmen aus  
Ausbruchsgeschehen in Deutschland (1973-2011)  
Dr. Tatjana Miller, RKI, Wernigerode

*15:15 – 16:00 Uhr Kaffeepause*

- 16:00-16:25 Uhr      ESBL produzierende *E. coli* bei Tieren und Lebensmitteln  
Dr. Beatriz Guerra, BfR, Berlin
- 16:25-16:40 Uhr      ESBLs und AmpC, nur ein Problem bei Nutztieren?  
Dr. Sebastian Günther, FU Berlin
- 16:40-17:05 Uhr      3 Jahre Resistenz-Monitoring  
PD Dr. Bernd-Alois Tenhagen, BfR, Berlin
- 17: 05 Uhr              Schlusswort  
Prof. Dr. Bernd Appel, BfR, Berlin

## Kurzfassungen der Beiträge

### Möglichkeiten und Grenzen der Lebensmittelketten-Verantwortung bei der Bekämpfung von Zoonosen

Lüppo Ellerbroek  
Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin

#### Einleitung

Salmonellen, *Campylobacter*, EHEC und andere Mikroorganismen können beim Menschen schwere Krankheiten auslösen. Verbraucher vertrauen darauf, dass im Handel angebotene Lebensmittel frei von krankheitserregenden Keimen sind. Es werden deshalb auf allen Stufen der Herstellungs- und Vertriebskette von Fleisch Anstrengungen unternommen, um eine Infektion von Tieren und eine Kontamination der Schlachttierkörper und Lebensmittel mit krankmachenden Keimen zu vermeiden – oder die Kontamination auf ein so geringes Niveau zu reduzieren, dass Erkrankungen des Menschen nicht mehr zu erwarten sind. Dies gelingt jedoch auch bei sorgfältiger Anwendung einer guten Lebensmittelhygienepraxis niemals vollständig. Denn Zoonoseerreger sind trotz der Bemühungen in der Aufzucht und Haltung von Nutztieren weiterhin verbreitet. Wenn die Tiere geschlachtet werden, findet eine Einschleppung der Erreger in den Schlachthof statt. Ursache dafür sind die technischen und hygienischen Bedingungen des Schlachtprozesses, die zur Kontamination von erschlachtetem Fleisch führen. Auch ursprünglich nicht kontaminierte Tiere können mit Zoonoseerregern kontaminiert werden, wenn diese Keime mit den Gerätschaften und Techniken übertragen werden. Über frisches Fleisch findet dann eine Exposition des Verbrauchers mit Zoonoseerregern statt.

Diese (negativen) Erfahrungen waren der Ausgangspunkt eines Grundgedankens des Europäischen Lebensmittelsicherheitskonzeptes: So wurde die Verantwortung der gesamten Lebensmittelkette bereits im Jahr 2000 im Weißbuch zur Lebensmittelsicherheit der EU<sup>1</sup> formuliert. Der Ansatz „From-Farm-to-Fork“ hat einen Paradigmenwechsel eingeleitet. Leitgedanke dieses Weißbuchs ist der Grundsatz, dass die Politik der Lebensmittelsicherheit auf einem umfassenden und einheitlichen Konzept beruhen muss. Damit ist gemeint, dass dieses Konzept die gesamte Lebensmittelherstellungskette (vom Erzeuger zum Verbraucher) ebenso abdeckt wie sämtliche Sektoren der Ernährungswirtschaft. Dies hat auch seinen Niederschlag in der Rechtssetzung für die Fleischgewinnung gefunden. Dazu führt der Abschnitt III der Verordnung (EG) Nr. 853/2004<sup>2</sup> aus:

„Lebensmittelunternehmer, die Schlachthöfe betreiben, müssen gegebenenfalls in Bezug auf alle Tiere außer frei lebendem Wild, die in den Schlachthof verbracht worden sind oder verbracht werden sollen, die **Informationen zur Lebensmittelkette** gemäß diesem Abschnitt einholen, entgegennehmen und prüfen sowie diesen Informationen entsprechend handeln.“

Um eine Kontamination von Fleisch mit *Campylobacter*- und *Salmonella*-Bakterien vorzubeugen, sind strenge Hygienemaßnahmen und Kontrollen entlang der gesamten Lebensmittelkette, z.B. im Rahmen der Guten Hygiene-Praxis (GHP)/Guten Landwirtschaftlichen Praxis (GAP) und von HACCP-Konzepten, erforderlich.

Trotz dieser Vorgaben und dieses Anspruches zeigt es sich auch in der Praxis nach Einführung des sog. Hygienepaketes 2004 (mit den Verordnungen [EG] Nr. 852-854/2004),

<sup>1</sup> EU 2000: Weißbuch zur Lebensmittelsicherheit. [http://europa.eu/legislation\\_summaries/other/132041\\_de.htm](http://europa.eu/legislation_summaries/other/132041_de.htm)

<sup>2</sup> EU 2004: VO (EG) NR. 853/2004 des Europäischen Parlamentes und des Rates vom 29. April 2004 mit spezifischen Hygienevorschriften für Lebensmittel tierischen Ursprungs  
<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2004:139:0055:0205:DE:PDF>

dass es in der Lebensmittelgewinnung weiterhin zu Kontaminationen mit pathogenen Keimen und Zoonoseerregern kommt. Die 2004 erlassenen und seit 2006 in Kraft befindlichen rechtlichen Vorgaben waren in dieser Beziehung wenig erfolgreich. Daraus leitet sich weiterer Handlungsbedarf für die Lebensmittelhygiene ab, der von humaner Seite unterstützt wird: Dort registriert man eine zunehmende Anzahl an alimentär bedingten Infektionskrankheiten.

### **Ausgewählte Zoonosen in der Lebensmittelkette: Bedeutung und Eintrag**

Von den genannten Zoonosen spielen Salmonellen im Infektionsgeschehen des Menschen seit Jahrzehnten eine herausragende Rolle. Trotz des zahlenmäßigen Rückgangs der gemeldeten *Salmonella*-Erkrankungen des Menschen (2001: 24.516<sup>3</sup>) und trotz der Erfolge bei der Bekämpfung des Vorkommens von Salmonellen bei Nutztieren verdienen die Salmonellen auch weiterhin eine hohe Aufmerksamkeit.

Verfolgt man die Statistik der gemeldeten Zoonosenerkrankungen in Deutschland für weitere Erreger, so zeichnet sich seit Jahren ein deutlicher Anstieg der Erkrankungen mit *Campylobacter*-Bakterien ab (2011: 71 318<sup>3</sup>). Während gleichzeitig die Anzahl der Salmonellosen stetig zurückgeht, ist die gemeldete Anzahl der Campylobakteriosen in Deutschland seit 2001 um ca. 20 % gestiegen. Die EFSA schätzt aufgrund zahlreicher molekularbiologischer Studien, dass ca. 20–30 % der *Campylobacter*-Infektionen des Menschen auf den direkten Konsum bzw. die Verarbeitung von Hühnerfleisch und sogar 50–80 % auf die Übertragung des Keims aus dem Reservoir „Huhn“ zurückzuführen sind. Eine quantitative Reduktion von *Campylobacter* auf Hähnchenfleisch ist daher essentiell.

Unter den Zoonoseerregern haben in jüngster Zeit auch Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) aufgrund ihres pathogenen Potentials eine große Beachtung gefunden. Aufgrund mittlerweile umfangreicher Statuserhebungen konnten MRSA entlang verschiedener Lebensmittelketten ausgehend von der Primärproduktion bis zum Lebensmittel (Rohfleisch und -Zubereitungen) im Einzelhandel nachgewiesen werden. Überwiegend handelte es sich dabei um einen bestimmten Typ, der auch als livestock-associated (la)-MRSA bezeichnet wird. Trotz ihrer eher geringen Ausstattung mit Virulenzdeterminanten ist die humanmedizinische Bedeutung der la-MRSA aufgrund der Resistenz und Infektiosität des Erregers grundsätzlich gegeben. Auch wenn die Bedeutung des Expositionswegs über die Lebensmittelkette aus der Sicht des gesundheitlichen Verbraucherschutzes zurzeit als gering angesehen ist, bleibt das Unterbinden der Verschleppung des Erregers im Rahmen der Schlachtung und Verarbeitung (neben der konsequenten Reduktion des Vorkommens von MRSA in der Primärproduktion) ein vordringliches Ziel.

In der Gruppe der *Escherichia coli* zeichnet sich ein sehr kleiner Teil von Zoonoseerregern durch ein außerordentlich hohes pathogenes Potential aus. Diese Gruppe der Shigatoxinproduzierenden *Escherichia coli* (STEC) ist sehr heterogen. Mehr als 400 Serotypen von STEC wurden bereits aus menschlichen Patienten isoliert und noch mehr STEC-Varianten konnten aus Lebensmitteln, Tieren und der Umwelt isoliert werden. 2011 wurden 4.908 EHEC/STEC-Erkrankungsfälle des Menschen dem RKI gemeldet<sup>3</sup>.

### **Lebensmittelkettenverantwortung bei der Bekämpfung von Zoonosen**

Landwirte und Lebensmittelbetriebe tragen die Lebensmittelkettenverantwortung bei der Bekämpfung von Zoonosen. Die von der EFSA eingeforderte Verantwortung für sichere Lebensmittel auf allen Stufen der Gewinnung ist mittlerweile zum festen Bestandteil der Lebensmittelhygiene geworden: Sie beginnt bei der Mast, schließt den Transport, die Schlach-

<sup>3</sup> RKI 2012: <http://www3.rki.de/SurvStat/>

tung, die Verarbeitung, den Lebensmittel-Einzelhandel und den Verbraucher ein<sup>4</sup>. Wenn auch der Verbraucher in der eigenen Küche seinen Beitrag zur Lebensmittelsicherheit leisten muss, so steht an herausgehobener Stelle der Lebensmittelunternehmer in der Pflicht. Er bringt die Lebensmittel in den Verkehr, er bleibt der unmittelbare Ansprechpartner für den Verbraucher. Die EU-Rechtsetzung verlangt von ihm beispielsweise das (Nicht-)Vorkommen von Salmonellen in Fleisch<sup>5</sup> gegenüber dem Verbraucher – obwohl wesentliche Defizite bei der Bekämpfung von Zoonosen in den ihm vorgelagerten Bereichen der Lebensmittelkette liegen. Wie die Ergebnisse von Kontrollen zeigen, gelingt es ihm mit den bisherigen Instrumenten (GAP, GHP, HACCP etc.) bislang nur schwer, seiner Verantwortung für ein sicheres Lebensmittel nachzukommen. Daher sind zur Verbesserung der Lebensmittelsicherheit zusätzliche Kontrollmaßnahmen in der Lebensmittelkette erforderlich. Dies hat die EFSA im Jahr 2011 veranlasst, eine Liste von möglichen Reduktionsstrategien für das Vorkommen von *Campylobacter* auf Geflügelfleisch in der Primärproduktion und im Schlachtprozess aufzustellen. Eine Maßnahme ist beispielsweise das Einfrieren von Hähnchenfleisch für 3 Wochen, mit der eine *Campylobacter*-Reduktion von zwei Zehnerpotenzen erreicht werden kann. Bei der Dekontamination mit Milchsäure, NaCl/Citronensäure, Chlordioxid, Trinatriumphosphat oder Peroxysäuren kann man eine Reduktion zwischen 0,5 und 1,8 Zehnerpotenzen erreichen.

Im Hinblick auf STEC zeigt sich, dass die meisten Lebensmittel mit STEC der Erzeugertiere kontaminiert sein können. Als Ursache der Kontamination von Lebensmitteln mit STEC sind die hygienischen Bedingungen beim Schlachten (oder Melken) anzusehen. Rindfleisch ist im Vergleich zu Fleisch anderer Tierarten am häufigsten mit EHEC verunreinigt. Wegen der möglichen dramatischen Krankheitsverläufe aufgrund von Infektionen mit STEC verfolgt man in den USA die Strategie der sog. „Zero-Tolerance“ für fäkale Kontaminationen (und damit für pathogene *E. coli*) auf Schlachtkörpern – weil die Bemühungen zur Reduktion im vorgelagerten Mastbereich bislang erfolglos blieben.

### **Lebensmittelketteninformationen, Diagnostik und Dekontamination – Ausblick auf neue Möglichkeiten**

Unbestritten, und trotz aller Defizite an ihrer Umsetzung, werden die jetzigen Verfahren der Lebensmittelsicherheit durch die Lebensmittelketteninformationen aufgewertet. Die Erklärung zu den angelieferten Tieren enthält u.a. Informationen zum Besitzer der Tiere (seine Adresse, seine Betriebsnummer), zu der benutzten Tätowiernummer, zum zuständigen Hoftierarzt, zur angemeldeten Stückzahl und Ankunftszeit und zum QS-Status des Lieferbetriebes. Die Informationen müssen 24 Stunden vorab einsehbar sein. Der amtliche Tierarzt in der Schlacht tieruntersuchung erhält Zugang zu diesen Informationen und prüft sie auf Vollständigkeit und Rechtskonformität. Er entscheidet über die Zulassung der Mastpartie zur Schlachtung. Falls sich aus dieser Prüfung Anhaltspunkte ergeben, die eine weitergehende Fleischuntersuchung notwendig macht, werden die Mastpartien entsprechend logistisch früher oder später geschlachtet.

Eine Aufwertung der Lebensmittelketteninformation geschieht auch durch innovative Techniken zur Multi-Diagnostik. Sie ermöglichen eine zeitnahe Information zu relevanten Gefahren, die für die menschliche Gesundheit eine Rolle spielen und als Tierkrankheit bedeutsam sein können. Diese Verfahren sind bislang noch in der Entwicklung und basieren z.B. auf Fleischsaftproben von Schlachtkörpern. Aus den Ergebnissen der Multi-Diagnostik lassen sich (retrospektive) Information zu Schlachttieren aus einem bestimmten Herkunftsbestand ableiten. Wichtig ist dabei vor allem eine hohe Sensitivität und Spezifität solcher

<sup>4</sup> EFSA 2010: Modernisierung der Fleischschau. <http://www.efsa.europa.eu/de/topics/topic/meatinspection.htm>

<sup>5</sup> EU 2004: VO (EG) Nr. 2073/2005 des Europäischen Parlamentes und des Rates vom 15. November 2005 über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel

Verfahren. Ziel sollte es sein, die Ergebnisse dieser Diagnostik bereits zum Zeitpunkt der Schlachtung der untersuchten Tiere für die Beurteilung zu nutzen.

Als zusätzliche kontaminationsverhütende Maßnahme gegenüber unerwünschten Zoonoseerregern wird in der EU der Einsatz von Dekontaminationsmaßnahmen diskutiert. Die Anzahl der Bakterien und Krankheitserreger können durch derartige Maßnahmen verringert werden. Dazu gehören zum Beispiel antibakterielle Behandlungen von Lebensmitteln, wie z.B. mit chemischen Substanzen, ionisierenden Strahlen oder mit UV-Licht.

In den USA darf das Geflügel nach der Schlachtung zur Dekontamination unter anderem mit chlorhaltigen Substanzen oder Peroxysäuren besprüht oder in Tauchkühlbäder eingebracht werden, die ebenfalls chlorhaltige Substanzen enthalten können. Die Behandlung von Lebensmitteln mit ionisierenden Strahlen wird in einigen EU-Ländern zum Zwecke der Konservierung von Lebensmitteln und der Verringerung von lebensmittelbedingten Infektionen angewendet. Chemische Dekontaminationsverfahren sind in der EU bislang nicht zugelassen. Die Vorschläge der EU-Kommission, vier antimikrobielle Stoffe (Chlordioxid, saures Natriumchlorit, Trinatriumphosphat und Peroxysäuren) für die Dekontaminierung von Geflügelschlachtkörpern zuzulassen, wurden bislang von den Mitgliedstaaten nicht unterstützt. Diskutiert wird ebenfalls der Einsatz von Milchsäure zum Besprühen der Oberflächen von Rinderschlachtkörpern.

Wenn der Nutzen der Anwendung der Dekontamination größer ist als die damit verbundenen Risiken, dann wird den Lebensmittelherstellern in der EU derzeit möglicherweise ein potentiell geeignetes, unbedenkliches Verfahren zur Gewinnung sicherer Lebensmittel vorenthalten und damit eine Optimierung des Gesundheitsschutzes der Verbraucher verhindert. Denn die berechtigte Verbrauchererwartung nach sicheren und hygienischen Lebensmitteln ist nicht vereinbar mit der Tatsache, dass Geflügelfleisch in Europa mit Zoonoseerregern, wie Salmonellen und *Campylobacter*, kontaminiert sein kann.

## Schlussfolgerungen

Defizite bei der Bekämpfung von Zoonosen in der Lebensmittelkette zeigen sich an den nach wie vor hohen Nachweisraten z.B. von Salmonellen und *Campylobacter* in Lebensmitteln. Die Verantwortung für das Vorkommen dieser Zoonoseerreger tragen alle Beteiligten der Lebensmittelkette. Die Verantwortung beginnt in der Mast von Tieren, beim Transport, bei der Schlachtung, Verarbeitung und endet im Lebensmitteleinzelhandel.

Dabei kommt dem Lebensmittelunternehmer eine herausragende Verantwortung zu. An ihn richtet sich die EU-Rechtsetzung mit hohen hygienischen Anforderungen in der Lebensmittelkette u.a. für das (Nicht-)Vorkommen von Salmonellen in Fleisch. Diese sind mit den bisherigen Instrumenten (GAP, GHP, HACCP etc.) nur schwer einzuhalten. Zwar können Zoonoseerreger, wie z.B. Salmonellen, bereits durch eine Reihe von Maßnahmen in der landwirtschaftlichen Produktionsstufe eingedämmt, aber nicht völlig eliminiert werden. Andere Zoonoseerreger wie z.B. *Campylobacter* entziehen sich in der Praxis bislang jedoch solchen, gegen Salmonellen ausgerichteten Bekämpfungsmaßnahmen und erfordern gezielte Strategien.

Wenn es zu einer Kontamination von Fleisch mit Zoonoseerregern infolge von Fäkalkontamination im Schlachtprozess kommt, dann kann diese bislang nur in mäßigem Umfang (und evtl. nicht sicher) reduziert werden. Nach wie vor ist die Vermeidung von Fäkalkontamination im Schlachtprozess nicht nur beim Geflügel, sondern auch bei anderen Tierarten besonders wichtig. Da die Verbraucher Lebensmittel von hoher Qualität erwarten, die gesundheitlich unbedenklich sind, müssen aber auch alle zusätzlich zur Verfügung stehenden Hygienemaßnahmen entlang der gesamten Lebensmittelkette von der Primärproduktion bis zum

Haushalt des Verbrauchers auf ihre Wirkung hin überprüft werden. Diese Minimierungsstrategie schließt auch den Einsatz von Dekontaminationsmitteln ein, wenn sie im Zusammenhang mit den vorausgehenden und nachfolgenden Schritten bewertet werden.



## **Gesundheits- und Hygienestrategien in der Geflügelhaltung als Grundlage der Lebensmittelsicherheit**

Hafez Mohamed Hafez,  
Institut für Geflügelkrankheiten, Freie Universität Berlin

In Geflügelbeständen kann der Ausbruch verschiedener Krankheiten durch Optimierung der Haltungsbedingungen sowie durch ein optimal ausgewogenes, dem Leistungsstadium des Tieres angepasstes Futter vermieden werden. Neben den oben genannten Maßnahmen gehören die Schutzimpfungen gegen verschiedene Krankheiten zu den wichtigsten und erfolgreichsten Mitteln zur Gesunderhaltung des Geflügels. Kommt es trotz aller bisher erwähnten Maßnahmen zu Krankheitsausbrüchen, so muss eine Behandlung eingeleitet werden.

Die Grundsätze der Bekämpfungsstrategien von Infektionskrankheiten beim Geflügel sind:

**Fortlaufende Bestandsbetreuung zur Gesunderhaltung der Tiere** durch Routineentnahme von Proben zur Früherkennung von Krankheiten, Erstellung von Impfprogrammen, Überwachung des Impferfolges, Diagnose und Einleitung von Behandlung zur Qualitätssicherung werden zurzeit im Rahmen verschiedener qualitätsorientierter Managementkonzepte verstärkt in der Geflügelproduktion eingesetzt. Fortlaufende Betreuung und Monitoring sind sinnvolle Maßnahmen zur Erstellung von prophylaktischen Programmen für die nachfolgenden Durchgänge.

Strenge **Hygiene** (Biosecurity) und das Rein-Raus-System waren bislang gut bewährte Maßnahmen zur Reduzierung von Infektionsrisiken beim Geflügel. Der Anstieg der Produktionskosten sowie die zunehmende Diskussion über artgerechte Haltung führten zu der Entwicklung unterschiedlicher Arten von Integrationen innerhalb der Geflügelindustrie. Es entwickelten sich Betriebe, in denen Geflügel unterschiedlicher Altersstufen gehalten werden – und auch unterschiedliche Haltungsformen. In diesen Systemen ist jedoch eine gründliche Reinigung und Desinfektion der Anlagen nicht möglich. Das Management von Tieren mit unterschiedlicher Herkunft ist problematisch, Krankheiten breiten sich schneller und leichter aus. Zweifelsohne sind Haltungsbedingungen und die genetische Dispositionen der Tiere am Auftreten und Verlauf verschiedener Gesundheitsschäden und Krankheiten beteiligt. Daher ist eine Verbesserung der verschiedenen Komponenten der Geflügelproduktion und genetische Selektion, die in Richtung erhöhter Resistenz gegenüber bestimmten Infektionen führt, notwendig. Dies hat nicht nur die Verminderung der Resistenzprobleme, sondern auch die Steigerung der Produktivität und damit die Erhöhung der Profitabilität zur Folge.

**Schutzimpfungen:** Der Einsatz von Lebend- und inaktivierten Impfstoffen wird häufig und mit Erfolg zur Verhütung von Krankheiten eingesetzt. Dabei treten folgende Probleme auf: Neben dem Vorkommen von Varianten (Mutanten) bzw. Steigerung der Virulenz der Erreger (neue Pathotypen) sind leider für bestimmte Geflügelarten (Puten, Wassergeflügel) in Deutschland nur wenige Impfstoffe zugelassen. Ursachen hierfür sind die strengen Zulassungsbestimmungen. Um den Einsatz von Impfstoffen zu fördern, muss der Anwendung von bestandsspezifischen Impfstoffen in Zukunft mehr Beachtung geschenkt werden. Darüber hinaus muss die Harmonisierung in der EU im Hinblick auf die Zulassung und das Inverkehrbringen von Impfstoffen beschleunigt werden.

Der Einsatz sogenannter **normaler Darmflora** „Competitive Exclusion“ (CE) bei Küken zur Reduzierung der Kolonisation des Geflügels mit verschiedenen pathogenen Erregern führt in verschiedenen Ländern zur Reduzierung des Einsatzes von Arzneimitteln und stellt eine vielversprechende Alternative zur Einstellungsprophylaxe dar, was in einem Verzicht auf diese ungezielte prophylaktische Antibiose resultiert. Eine Zulassung der CE-Präparate ist zurzeit in Deutschland nicht möglich, da die meisten wirksamen Präparate aufgrund ihrer

nicht vollständig definierten Zusammensetzung weder als Impfstoff noch als Medizinalprodukt klassifiziert werden können.

**Therapie:** Beim Geflügel ist die Behandlung aller Tiere einer Herde unumgänglich, weil die Trennung von kranken und in der Inkubationszeit befindlichen Tieren von den gesunden Tieren nicht durchführbar ist. Bei sachgemäßem Einsatz leisten Arzneimittel gegen Infektionskrankheiten in der Veterinärmedizin einen unverzichtbaren Beitrag zur Lebensmittelqualität und damit für die menschliche Gesundheit. Daher stellt der Einsatz von antimikrobiellen Wirkstoffen zweifellos eine wichtige Säule des tierärztlichen Handelns dar und ist in der Betreuung von Geflügelbeständen unverzichtbar. Da die gesundheitlichen Probleme beim Geflügel in der Regel multifaktorielle Ursachen haben und die klinischen Erscheinungen bzw. die anatomisch-pathologischen Veränderungen nicht pathognomonisch sind, können in akuten Fällen in der Praxis die Therapiegrundsätze bei der Anwendung von Arzneimitteln, wie richtige Diagnose, strenge Indikation und Prüfung der Wirksamkeit, nicht eingehalten werden. Darüber hinaus stehen für das Geflügel nur wenige zugelassene Präparate zur Verfügung. Diese sind meist auch nicht für alle Geflügelarten und/oder Anwendungsgebiete zugelassen. Jedoch führt der unsachgemäße Einsatz von Antibiotika zwangsläufig zur Resistenzbildung. Deshalb muss der Einsatz solcher Stoffe auf das medizinische notwendige Maß reduziert werden.

Da Verarbeitungsbetriebe wenige Möglichkeiten haben, eine Kreuzkontamination mit pathogenen Keimen effektiv zu verringern, liegen die Schwerpunkte der Bekämpfung in der Verhinderung der Infektion bzw. Reduzierung der Ausbreitung in den lebenden Tierbeständen. Deshalb wird beim Mastgeflügel in den letzten Jahren vermehrt die logistische Schlachtung und Verarbeitung mit Erfolg praktiziert.

Darüber hinaus müssen bei der Gewinnung und beim Transport der Eier Maßnahmen zur Senkung des Verschmutzungsgrades der Eioberfläche getroffen werden, um eine Reduzierung der Keimbelastung zu erreichen. Auch bei Lagerung bzw. Aufbewahrung von Eiern muss neben der Einhaltung von strikter Hygiene auf die Lagerungsbedingungen (Dauer, Temperatur, Luftfeuchtigkeit) geachtet werden, um die Vermehrung von Keimen zu verhindern bzw. zu reduzieren. Darüber hinaus soll bei der Verarbeitung die Kontamination des Eiinhaltes durch die kontaminierte Schale verhindert werden. Dies kann durch die Verwendung sauberer, unbeschädigter Eier erreicht werden. Um einer Lebensmittelvergiftung durch aus kontaminierten Eiern hergestellten Eiprodukten prophylaktisch entgegenzuwirken, ist das Pasteurisieren der einzige Weg, wobei die Rekontamination pasteurisierter Eiprodukte verhindert werden muss.

## Schlussfolgerungen

Die wichtigste Aufgabe der betreuenden Tierärzte in Geflügelbetrieben ist die Verhütung von Krankheiten und Gesundheitsschäden. Zusätzlich können die zuständigen Behörden einen bedeutsamen Beitrag zur Reduzierung des Einsatzes von Arzneimitteln leisten, wenn die Harmonisierung in der EU im Hinblick auf Tierhaltung, Tierschutz sowie Zulassung und das Inverkehrbringen von Impfstoffen und Präparaten beschleunigt wird.

## Salmonellenbekämpfung beim Schwein

Jürgen Harlizius, Landwirtschaftskammer Nordrhein-Westfalen, Tiergesundheitsdienste, Bonn

Klinische Salmonellenerkrankungen beim Schwein sind in Deutschland sehr selten zu sehen. Bei der Salmonellenbekämpfung in Schweinebetrieben geht es in erster Linie um jene Infektionen, die bei den Schweinen selbst keine Krankheitssymptome auslösen. Die Schlachtung klinisch unauffälliger jedoch infizierter Tiere kann zu einem Eintrag in die Lebensmittelkette führen. Nach der EU-Verordnung 2160/2003 sind „Maßnahmen zur Bekämpfung und Überwachung von Salmonellen auf allen Stufen, insbesondere auf der Ebene der Primärproduktion“, durchzuführen.

In Deutschland ist die Untersuchung von Schlachtschweinen seit dem 24.03.2007 durch die Schweine-Salmonellen-Verordnung gesetzlich geregelt. In der Regel werden Fleischsaftproben, die bei der Schlachtung gewonnen werden, nach einem festgelegten Probenschlüssel auf Salmonellenantikörper untersucht. Aber auch die Untersuchung von Blutproben der Endmastschweine sind möglich. Alle Betriebe die mehr als 200 Mastschweine müssen 60 Proben oder mehr untersuchen. Positive Ergebnisse Hinweise auf eine erhöhte Belastung. Ein Schwein, das Antikörper gegen Salmonellen gebildet hat, muss aber nicht zwangsläufig zum Zeitpunkt der Schlachtung noch infiziert sein.

Alle Routinetests basieren derzeit auf dem Nachweis von Antikörpern gegen bestimmte Zellwandbestandteile der Salmonellen (Lipopolysaccharide; LPS) und weisen neben Antikörpern gegen die beim Schwein am häufigsten vorkommende Serovar *Salmonella (S.) typhimurium* auch solche gegen weniger oft beim Schwein isolierte Salmonellen (z.B. *S. infantis* und *S. choleraesuis*) nach. Es werden Antikörper gegen Salmonellen der Serogruppen B, C1 und D nachgewiesen.

Hinsichtlich der vergleichbaren Auswertung der Probenergebnisse aus den unterschiedlichen Tests hat sich ein prozentualer Wert optischer Dichte (OD%) bewährt, der einen zu den positiven und negativen Kontrollen ins Verhältnis gesetzten Messwert sowie einen Umrechnungsfaktor enthält. Der OD%-Wert dient als Grundlage zur Einstufung einer Probe als positiv oder negativ. Für eine Bestandsbewertung sind Proben mit OD%-Werten unterhalb von 40 als negativ, solche darüber als positiv einzustufen. Abhängig vom Fortschritt des nationalen Sanierungsverfahrens kann dieser Wert aber abgesenkt werden, um eine bessere Überwachung zu ermöglichen. Bereits Proben mit einem OD%-Wert von 20 sind Anzeichen einer Salmonelleninfektion.

Abhängig von der Häufung positiver Probenergebnisse in einer Stichprobe erfolgt eine Kategorisierung des Bestandes nach QS bzw. nach der Schweine-Salmonellen-Verordnung in die Belastungskategorien niedriger (Kat. I: 0 bis 20 % positive Proben pro Stichprobe), mittlerer (Kat. II: mehr als 20 bis 40 % positive Proben) und hoher (Kat. III: mehr als 40 % positive Proben) Status der Salmonellenverbreitung. Dabei wird das so genannte „gleitende Jahresmittel“, eine quartalsweise Auswertung des jeweils zurück liegenden Jahreszeitraumes, für die Kategorisierung heran gezogen.

Aus diesem Grunde sind Landwirte, deren Betriebe in die Kategorie II und III eingestuft sind, aufgefordert, in ihrem Betrieb Maßnahmen zu ergreifen, um den Salmonellendruck im Bestand zu reduzieren. In betroffenen Betrieben sollte im Rahmen eines Bestandsbesuches durch den Schweinegesundheitsdienst oder den Hoftierarzt eine gründliche Untersuchung und Beratung erfolgen, um mögliche Schwachstellen im Hygiene und Gesundheitsmanagement aufzudecken und zu beheben.

Betriebe mit einer hohen Antikörperprävalenz (Kategorie III) sind verpflichtet, dies dem zuständigen Veterinäramt zu melden und Maßnahmen zur Bekämpfung einzuleiten. An erster Stelle steht die Untersuchung der Eintragsquellen und gleichzeitig muss mit innerbetrieblichen Maßnahmen zur Erregerreduktion begonnen werden:

#### **Untersuchung der Eintragsquellen:**

- ✓ Frisch eingestellte Ferkel
- ✓ Erfolgskontrolle Reinigung und Desinfektion: Bucht, Treibwege, Stallumgebung
- ✓ Futter: Trog, (Flüssig)fütterung, Mahl- und Mischanlage, Lager
- ✓ Vektoren: Schadnager, Fliegen, Katzen, Hunde

#### **Maßnahmen zur Erregerreduktion**

- ✓ Vermeidung des Eintrages und Verhinderung der Querkontamination im Bestand durch jeweils spezifische Maßnahmen:
  - ✓ Striktes abteilweises Rein-Raus-System
  - ✓ Reinigung + Desinfektion (Abteile, Treibwege, Stallumgebung)
  - ✓ Schadnagerbekämpfung, „Abdichtung“ von Stallgebäuden und Futterlagern gegen Katzen, Hunde und Vögel
  - ✓ Tränkewasserhygiene
- Fütterungsmaßnahmen:
  - ✓ Hitzebehandlung beim Pelletiervorgang tötet Salmonellen ab, aber pelletiertes Futter führt zu einer schnelleren Futteraufnahme und Magenpassage.
  - ✓ Säureeinsatz im Futter
  - ✓ Es können auch gekapselte Säuren oder kristalline Produkte eingesetzt werden
  - ✓ Kraftfutterhersteller können auch flüssige Säuren auf pelletiertes Futter sprühen
  - ✓ Eine grobere Vermahlung kann die Salmonellenbelastung reduzieren
  - ✓ Bei Hofmischung ist eine Getreideration mit hohem Gerstenanteil mit gebröseltem (hitzebehandeltem) Ergänzern ideal
  - ✓ Auch der Einsatz von Probiotika ist von Vorteil

Darüberhinaus besteht insbesondere für Sauenbetriebe mit einer hohen Salmonellenprävalenz die Möglichkeit der Schutzimpfung.

Obwohl in der Diskussion um Salmonellenbelastung von Schweinebeständen sehr viel von Hygiene gesprochen wird, kann eine erhöhte Salmonellenbelastung in sehr sauber geführten Betrieben ebenso vorkommen wie in hygienisch problematischen Betrieben.

Weitere Informationen finden Sie auf der folgenden Internetseite:

<http://www.schweinegesundheitsdienste.de/arbeitsgruppen.html>

## Hygiene in der Geflügelfleischgewinnung

Reinhard Fries

Institut für Fleischhygiene und -technologie, Freie Universität Berlin

### 1 Einleitung

Auf dem Geflügelsektor werden in Deutschland jährlich ca. 350 Mio. Tiere geschlachtet, als Frischware vermarktet oder als Fleischerzeugnis weiterverarbeitet. Die großtechnische Gewinnung von Geflügelfleisch bringt technische Vorteile, birgt jedoch hygienisch auch Risiken. Der derzeitige Ansatz ist dem traditionellen Verfahren entlehnt, dies bei einer Schlacht- und Verarbeitungsfrequenz von bis zu 13.000 Tieren (Broiler)/h in den industrialisierten Ländern mit nur geringem Personaleinsatz.

Unter Hygiene wird hier die technische Sicherung des Prozessablaufes so verstanden, dass

- eine Vermehrung von Agentien im Prozessablauf ausgeschlossen,
- ein Eintrag aus dem vorangegangenen Stufen der Primärproduktion minimiert,
- ein Übertrag im Prozessablauf an möglichst zahlreichen Stellen des technischen Prozesses unterbunden wird.

### 2 Die Gegebenheiten

#### 2.1 Technisch-hygienische Daten und resultierende mikrobiologische Profile im Prozess

Mit Gefieder, Haut und dem Darmtrakt-Inhalt überträgt der Vogel eine hohe mikrobielle Last in den Schlachtbetrieb. Gelegenheit zum Übertrag und zur Kreuzkontamination bieten die an zahlreichen Stellen des Gewinnungsprozesses eingesetzten Flüssigkeiten (Brühwasser, zahlreiche Duschen, Innen-Außenwäscher) sowie die Oberflächen der Geräte, die intensiv auf die geschlachteten Tiere einwirken (Rupffinger, Bügel des Nackenbrechers, Kloakenschneider, vent-cutter, Eviszerationsbügel). Damit wird die mikrobiologische Belastung von den Karkassen im Prozess übernommen.

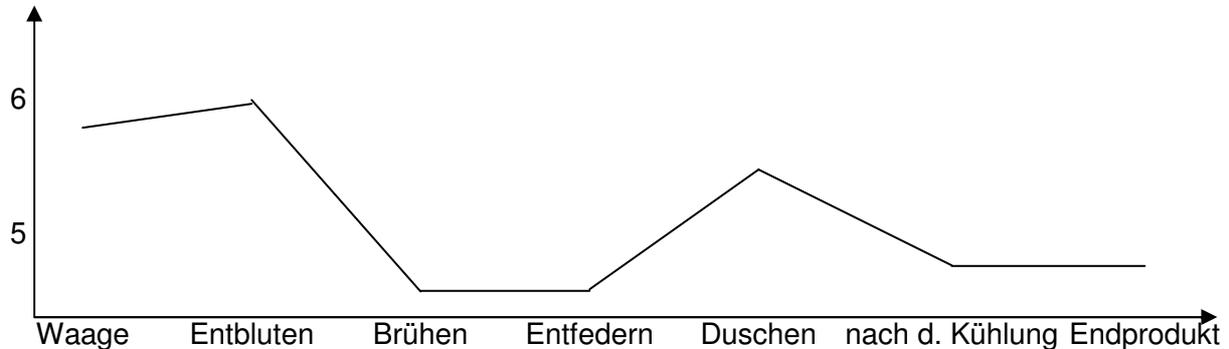
In Untersuchungen zur Belastung der Rupffingeroberflächen wurde eine Gesamtbelastung von 7,49 (lg) pro Rupffinger oder 5,19 pro ml Spülflüssigkeit festgestellt (Fries 1992 und unpubl.). Dies spricht für eine potentiell starke Belastung der Rupffinger.

##### 2.1.1 Beispiel Zoonoseerreger

In einer Institutsuntersuchung von 14 unterschiedlichen Betriebswässer-Proben in einem Geflügelschlachtbetrieb wurden vor allem (und in ansteigendem Maße) *Campylobacter*-Keime, gefolgt von Salmonellen (absinkend im Lauf des Prozesses) gefunden, fünf *L. monocytogenes*-Isolate wurden gesichert (anfangs), *Yersinia* trat nicht auf. Institutsuntersuchungen in zwei Putenschlachtbetrieben zeigten identische Klone über Zeit und Raum der Betriebe: Sind die Erreger einmal im Schlachtbetrieb, erfolgt offenbar zeitlich und räumlich ein Transfer innerhalb des Betriebes.

### 2.1.2 GKZ als Beispiel für die allgemeine Hygiene im Prozessablauf

Die Mikroflora (GKZ) auf der Haut der Tiere und der Schlachttierkörper reflektiert die technischen Abläufe reproduzierbar, wie die Gesamtkeimzahl an bestimmten Punkten der technischen Kette der Geflügelfleischgewinnung (Broiler) ausweist:



**Abb. 1: Aerobe Gesamtkeimzahl auf der Broilerhaut an Positionen der Geflügelfleischgewinnung**

### 2.1.3 Taxonomische Differenzierung als Beispiel für die Vielfalt der auftretenden Taxa

Auf der gesamten vertikalen Linie ist mit einer horizontalen (innerhalb der Herde und von außen in die Herde hinein) sowie mit einer vertikalen Übertragung zu rechnen. Auf dem Gefieder, damit auch auf der Haut vor dem Brühen oder auf dem Fell der Tiere befindet sich noch die Mikroflora der Herkunft.

Im Einzelnen treten auf: *Micrococcaceae*, *Streptococcus*, grampositive, unregelmäßige Stäbchen und Filamentbildner, *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Enterobacteriaceae*.

## 2.2 Methodik (Mikrobiologie) in der Erfassung und Bewertung von Hygiene

### 2.2.1 Die Geflügelhaut („Probenmaterial Geflügel“)

Im Gegensatz zur Muskulatur als Oberfläche (Wiederkäuer) oder der einer Schweinehälfte ist die Geflügelhaut stark gefaltet incl. der ins Gewicht fallenden Federfollikel, in die sich die Keime einbetten können. Geflügelhaut ist das Untersuchungsmaterial der Wahl (unterliegt dem äußeren Einfluss). Muskulatur als Untersuchungsmaterial ist nur bei der Frage nach einer Besiedlung nach Infektion verwendbar.

### 2.2.2 Beprobung

In der quantitativen mikrobiologischen Analyse sind Spül- und Tupfermethoden, auch die (Ganzkörper-)Schüttelung bei der Anwendung auf Geflügelhaut wenig aussagekräftig, da eine vollständige Entnahme nicht möglich ist. Somit ist bei Geflügelhaut ein Vergleich von Ergebnissen, die mittels unterschiedlicher Beprobungstechniken erarbeitet wurden, mit Vorsicht zu bewerkstelligen. Das destruktive Vorgehen bietet sich an.

### 2.2.3 Qualitative versus quantitative Analyse

Während die GKZ (auch die EB-Zahl) als rein quantitativer Parameter aussagekräftig eingesetzt werden kann, ist für Salmonellen die Ja-/Nein-Analyse nur beschränkt aussagekräftig.

Dies gilt insbesondere für Aussagen auf dem Bereich der Technologie, die unter den Gesichtspunkten der Hygiene korrigiert/verbessert werden soll: Eine Verringerung der quantitativen Belastung mit einem Zoonoseerreger (v.a. *Salmonella*) ist so kaum darstellbar.

### 3 Maßnahmen zur Sicherung/Verbesserung der Prozesshygiene

Zahlreiche Maßnahmen wurden vorgeschlagen, diese lassen sich kategorisieren in zusätzliche Geräte oder Maßnahmen im Prozess, Änderung der Technologie an speziellen Positionen, Unterlassen von Eingriffen oder eine Intensivierung der Vorsichtsmaßnahmen bzw. Einführung von SOP.

## 4 Diskussion

### 4.1 Vertikaltransfer

Einmal eingespeist, ist eine Eliminierung einkommender Agentien in der laufenden Prozessdauer nicht mehr möglich. Dies gilt für alle Mikroorganismen, auch für zoonotische Agentien. Erst schrittweise treten die technologischen Prozesse des Schlachtbetriebes in den Vordergrund, sodass sich der mikrobiologische Status der Tierkörper durch die Aufnahme weiterer Keime aus dem Umfeld der Produktion verschiebt.

Der Prozess beinhaltet keine Maßnahme oder technischen Eingriff, der eine nachhaltige Hürde für mikrobiologische Besiedlung darstellen könnte. Jede Maßnahme als solche kann keine durchschlagende Wirkung entfalten, in der Summe jedoch können die punktuellen Verbesserungen eine Verbesserung der Gesamtsituation bewirken.

Wasser ist ein direkter Carrier, die Technologie der Gewinnung bietet an keiner Position einen CCP. Für die im Brühtank (Geflügel, Jungmasthuhn) realisierten Temperaturen zeigen die Daten der Predictive Microbiology, dass eine nachhaltige Barrierefunktion nicht zu erwarten ist.

### 4.2 In-house-Flora

Es kommt offenkundig auch zu einer eigenen Betriebsflora („in house-flora“), belegt für *Salmonella* und seit längerem bereits für *Staphylococcus*.

### 4.3 Problempositionen

Brühtank: Da die Tier nicht gereinigt werden können, trägt jeder Vogel mikrobielle Last in den Brühtank ein. Die mikrobiologische Balance zwischen Abtötung und Neueintrag im Brühwasser ist schwer kalkulierbar und abhängig von der Temperatur, der einkommenden Mikroflora und der Dauer des Brühvorganges.

Entfedern: In den Rupfmaschinen kann sich in den Betriebspausen eine geräteeigene Mikroflora aufbauen, die sich am nächsten Morgen auf die einkommenden Tierkörper überträgt. Dies zwingt in der täglichen Betriebshygiene zu einer bewussten und sachgerechten Reinigung und Desinfektion.

Flüssigkeiten: Der intensive Wassereinsatz (Benetzung der Oberflächen) muss als Risikofaktor angesehen werden. Dies gilt auch und gerade für den in Wasser auftretenden *Campylobacter*.

#### 4.4 Technische Sicherungsmaßnahmen

Denkbare Präventivmaßnahmen beziehen sich auf die gesamte Kette der Produktion von Geflügelfleisch, jede Stufe bietet Möglichkeiten zur Eindämmung („Lines of Defense“). Kooperation und Austausch mit bestandsbetreuenden Tierärzten und anderem Beratungspersonal ist erforderlich.

Die **erste „Verteidigungslinie“** ist in der Haltung angesiedelt (Biosecurity). Hier gilt es, den Transfer unterschiedlicher Agentien in vertikaler und horizontaler Richtung möglichst weitgehend zu verhindern.

Die **zweite „Verteidigungslinie“** ist der Prozessablauf in der Fleischgewinnung.

Die **dritte „Verteidigungslinie“** beinhaltet die Verarbeitungsschritte im Anschluss an die Fleischgewinnung. Hier gibt es deutlich mehr Eingriffsoptionen (Lebensmittelbe- und Verarbeitungstechnologien).

Die **vierte „Verteidigungslinie“** ist der einzelne Haushalt oder die Großküche mit Zubereitung der Mahlzeit mit den eigenen zu beachtenden Intern-Gegebenheiten.

##### *Prozess im Geflügelschlachtbetrieb:*

Zu beachten sind das Design des Maschinenparks, eventuelle Hürden in der Linie (Temperaturanwendungen), auch die in der EU nicht zugelassene Behandlung des Wassers oder die Verschiebungen im pH von Flüssigkeiten, zusätzliche technische Installationen (z.B. Gegenstrom-Tauchbrühen, internes und externes Abflammen) oder die korrekte Planung der Reinigung und Desinfektion und eine stärkere Beachtung der Nebenlinien.

An keiner Stelle findet sich ein technischer Eingriff, der als Barriere im Sinne einer Eliminierung von Erregern verstanden werden könnte. Auch die üblichen Temperaturen im Brühprozess sind ohne hygienisierenden Effekt (die anzulegenden D-Werte lassen hier keinen Zweifel). Die beim Geflügel üblicherweise gefahrenen Temperaturen zwischen 52 °C und 58 °C haben keine Barrierewirkung zur Folge.

## Dekontamination bei Geflügel als Option für sichere Lebensmittel?

Uwe Truyen

Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen, Universität Leipzig

Die Dekontamination von Schlachtkörpern kann dazu dienen, die Keimbelastung an der Oberfläche zu reduzieren, und somit zu der Herstellung keimärmeren und dadurch risikoärmeren Lebensmitteln beitragen.

Die Kontamination von Schlachtkörpern während des Schlachtprozesses ist technologisch nicht vollkommen auszuschließen und wird durch zahlreiche Faktoren beeinflusst, nicht zuletzt durch den Gesundheitsstatus und mikrobiologischen Status des Schlachtieres vor der Schlachtung.

Der Einsatz von chemischen Substanzen zur Dekontamination von Schlachtkörpern wurde im Rahmen eines vom BfR organisierten Forums von verschiedenen Seiten beleuchtet.<sup>6</sup>

Folgende Punkte für die Einstufung dieser Verfahren konnten dabei herausgearbeitet werden:

Die Dekontamination von Schlachtkörpern kann einen wertvollen (zusätzlichen) Beitrag zur Lebensmittelsicherheit leisten, wenn sichergestellt ist, dass

- die Mittel wirksam sind, und Mikroorganismen tatsächlich abtöten
- die Mittel den Zustand des Schlachtkörpers (gesundheitliche, sensorische, ernährungsphysiologische Eigenschaften) nicht nachteilig beeinflussen
- keine Rückstände auf dem Schlachtkörper verbleiben
- eine Akzeptanz durch den Verbraucher gegeben ist.

Wesentliche technische Voraussetzungen sind eine ausreichende Kenntlichmachung der behandelten Schlachtkörper, eine stringente Wirksamkeitsprüfung der Mittel sowie eine verbindliche detaillierte Anwendungsanweisung.

Verschiedene Substanzen (Peroxysäure, Milchsäure, SAN-PEL, ClO<sub>2</sub>, NaOCl<sub>2</sub>, Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, Mischung von Peroxysäuren, Listex P100 und Cecure) sind durch die EFSA in der Vergangenheit geprüft worden. Keine der Substanzen konnte dabei uneingeschränkt empfohlen werden.

Das mögliche Auftreten von Resistenzen gegen Desinfektionsmittel beziehungsweise das Auftreten von Kreuzresistenzen gegen bestimmte Antibiotika muss besonders aufmerksam beobachtet werden, obwohl bisher solche Resistenzen bei Desinfektionsmitteln für den Einsatz im Lebensmittelbereich nicht nachgewiesen werden konnten.

Die Etablierung eindeutiger Kriterien zur Wirksamkeitsprüfung der chemischen Mittel sowie die Entwicklung alternativer nichtchemischer Verfahren werden als wichtig angesehen.

<sup>6</sup> 12. BfR-Forum Verbraucherschutz: Verbesserung der Lebensmittelhygiene durch Dekontamination? – Standortbestimmung und Perspektiven, 4.-5. Juni 2012, Berlin



### ***Campylobacter* – quo vadis?**

Kerstin Stingl, Marie-Theres Knüver, Petra Vogt, Christiane Buhler, Nora-Johanna Krüger, Katja Alt, Bernd-Alois Tenhagen, Matthias Hartung, Andreas Schroeter, Lüppo Ellerbroek, Bernd Appel und Annemarie Käsbohrer  
Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin

Das pathogene Bakterium *Campylobacter* ist seit einigen Jahren die häufigste Ursache von lebensmittelbedingten Durchfallerkrankungen in Deutschland und Europa. *Campylobacter* Bakterien verursachen beim Menschen wässrige und blutige Durchfälle, die meist 4–7 Tage anhalten. In ca. 1 von 1.000 Fällen werden Komplikationen, wie reaktive Arthritis und periphere Neuropathien wie z.B. das Guillain-Barré Syndrom berichtet, welches zu Lähmungen der Gliedmaßen führt. Im letzten Jahr in Deutschland wurden über 70.000 *Campylobacter*-Fälle berichtet. Die Dunkelziffer wird auf ein Vierfaches geschätzt.

*Campylobacter* gehört zu den  $\epsilon$ -Proteobakterien, die relativ anspruchsvolle Wachstumsbedingungen im Labor verlangen. Sie wachsen unter mikroaeroben Bedingungen und nur bei Temperaturen zwischen 30 und 42 °C. Natürlicherweise kommen sie im Darm von Warmblütern vor, insbesondere bei Geflügel, aber auch bei Säugetieren. Die Kolonisierung von *Campylobacter* in Tieren ist symptomlos, sodass sich der Keim ohne äußere Anzeichen einer Infektion verbreiten kann. Daten aus den Jahren 2004 bis 2010 lassen erkennen, dass Geflügel (Masthähnchen, Pute und Ente) in Deutschland im Mittel zu 30–40 % mit *Campylobacter* belastet sind. Allerdings werden *Campylobacter* mit ähnlicher Häufigkeit bei Schweinen nachgewiesen. Rinder und Mastkälber sind zu ca. 15 % mit *Campylobacter* besiedelt, während Milchkühe das Bakterium nur sehr selten aufweisen. Haustiere, wie Katze und Hund, tragen den Keim zu ca. 5 %.

Bei Lebensmitteln kommen *Campylobacter* als Fäkalverunreinigung vor allem auf Geflügelfleisch vor. Detektionsraten variieren zwischen knapp 20 % bei Putenfleisch in den Jahren 2009 und 2010, über ca. 45 % bei Masthähnchenfleisch im Jahr 2009 bis über 60 % bei Entenfleisch im Jahr 2009. Auffälligerweise ist die Kontaminationskette bei der Produktion von Schweinefleisch aus ähnlich häufig mit *Campylobacter* kolonisierten Schweinen unterbrochen, sodass Schweinefleisch nur sehr selten mit *Campylobacter* belastet ist. Im Einklang mit dieser Beobachtung wird vorrangig *C. jejuni* als Hauptvertreter der *Campylobacter* spp. beim Geflügel auch als Hauptauslöser der *Campylobacter*-Infektion beim Menschen beschrieben. *C. coli* hingegen, die hauptsächlich bei Schweinen vorkommende Spezies, trägt nur mit ca. 8 % zu den menschlichen *Campylobacter*-Infektionen bei. Eine signifikante Reduktion der *Campylobacter*-Fälle beim Menschen könnte daher vor allem durch Reduktion der Kontamination von Schlachtkörpern während der Geflügelfleischgewinnung erfolgen.

Das NRL für *Campylobacter* hat eine differenzierte Auswertung qualitativer und quantitativer Daten von Geflügelkarkassen (Schlachthof) bzw. Geflügelfleisch (Supermarkt) in Deutschland angefertigt (Stingl et al. 2012). Während 55 % der Hühnerkarkassen auf dem Schlachthof *Campylobacter*-positiv waren (ISO 10272-1), wurden 43 % auch mit der quantitativen Methode detektiert (ISO 10272-2). Beide Methoden zusammen detektierten 62 % der Karkassen als positiv. Die qualitative Methode ist der quantitativen hinsichtlich Sensitivität überlegen. Wenn allerdings Begleitflora die *Campylobacter*-Bakterien in den Anreicherungsmedien überwächst, ist die quantitative Methode überlegen, die eine sofortige räumliche Trennung der Bakterien auf der Agarplatte garantiert. Dies könnte als Erklärung dienen, warum 12 % der positiv befundeten Karkassen lediglich mittels der quantitativen Methode detektiert wurden. Interessanterweise variiert dieser Anteil an Karkassen, die nur durch die quantitative Methode als positiv detektiert wurden, deutlich innerhalb der EU-Mitgliedsstaaten. In Belgien beträgt er 68 %, gefolgt von den Niederlanden mit 32 % und Portugal mit 16 %. Eine unterschiedlich stark vorkommende resistente Hintergrundflora, wie z.B. ESBL- (extended  $\beta$ -

lactamases) produzierende *Escherichia coli*, in den verschiedenen Ländern könnte diese Daten erklären. ESBL *E. coli* wachsen in den in der ISO 10272-1 vorgeschlagenen Anreicherungsmedien und erschweren die Detektion von *Campylobacter*. Daher wird derzeit die ISO 10272 überarbeitet und die Verwendung alternativer Medien (z.B. Preston broth mit Polymycin B als wirksames Antibiotikum gegenüber ESBL *E. coli*) für Proben mit erwarteter resistenter Hintergrundflora empfohlen.

Außerhalb des Darms, z.B. auf Lebensmitteln, können *Campylobacter* nicht wachsen und sind insbesondere oxidativem Stress ausgesetzt. Stresssituationen verändern das Bakterium so, dass es im Labor auf Agarplatten nur noch eingeschränkt detektierbar ist. Das infektiöse Potential kann aber im Gegensatz dazu für eine Infektion durchaus noch ausreichen. Daraus resultiert wahrscheinlich die Diskrepanz zwischen der Anzahl kulturell detektierbarer Bakterien auf Geflügelfleisch aus dem Supermarkt in Deutschland und der EFSA-Einschätzung, dass 20–30 % der *Campylobacter*-Fälle auf den direkten Konsum bzw. die Verarbeitung von Hähnchenfleisch bzw. sogar 50–80 % der Fälle auf das „Reservoir Huhn“ zurückgehen (EFSA 2011). Entlang der Lebensmittelkette ist aufgrund der Datenlage deutlich geworden, dass quantitative mikrobiologische Untersuchungen auf *Campylobacter* mit frischen Proben (aus dem Schlachthof) aussagekräftig sind. Ein mikrobiologisches Kriterium von z.B. 500 bis 1.000 CFU/g Hühnerhaut könnte sinnvollerweise auf dem Schlachthof Anwendung finden und mittels der derzeit verfügbaren ISO 10272:2006-2 überprüft werden. Für Proben aus dem Supermarkt sollte derzeit die qualitative ISO 10272:2006-1 verwendet werden. Trotzdem besteht der Bedarf an kultivierungsunabhängigen Verfahren zur Detektion von *Campylobacter*.

Es existieren diverse Real-time-PCR-Methoden zum Nachweis von thermophilen *Campylobacter*. 2003 wurden von Lübeck et al. (Lübeck et al. 2003) geeignete Primer zum spezifischen Nachweis des 16S rRNA Gens von *Campylobacter* spp. (*C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*) entwickelt, die 2004 von Josefsen et al. (Josefsen et al. 2004) im Real-time-PCR-Ansatz verwendet wurden. Mittlerweile wurde diese PCR von NordVal (National Veterinary Institute, Norwegen; NMKL 017: 2011 nach Anreicherung mittels ISO 10272-1:2006) validiert. In Deutschland wird eine Veröffentlichung dieser Methode im Rahmen der §64-Methoden des LFGB Ende des Jahres erwartet, die Validierung ist bereits abgeschlossen. Diese Methode ist derzeit nur qualitativ validiert und Bedarf eines Voranreicherungsschritt nach ISO 10272-1.

Das 16S-rRNA Gen liegt bei *Campylobacter* in drei Kopien pro Chromosom vor und ermöglicht damit eine sehr sensitive Detektion. Für eine quantitative Detektion des pathogenen Bakteriums müssen verschiedene Bedingungen erfüllt werden. Zunächst muss eine quantitative DNA-Isolation, z.B. über das Mitführen einer internen DNA-Kontrolle, sichergestellt werden. Darüber hinaus muss die Detektion relativ sensitiv sein, da ein mikrobiologisches Kriterium von 1.000 CFU/g Geflügelhaut zur Diskussion steht. Schließlich darf nur DNA von intakten und potentiell infektiösen *Campylobacter*, nicht aber von toten Zellen nachgewiesen werden.

Das Prinzip der Unterscheidung von lebenden und toten *Campylobacter* basiert grundsätzlich darauf, dass DNA-Farbstoffe in tote Zellen, nicht aber in lebende Zellen eindringen können. Nach Bindung der Farbstoffe an die DNA toter Zellen, reagieren diese mit der DNA nach Lichtanregung und verhindern den Nachweis mittels PCR. Damit soll sichergestellt werden, dass nur DNA von lebenden Zellen mit der Real-time PCR detektiert wird. In verschiedenen Studien wurden zwei Farbstoffe, Ethidium-Monoazid (EMA) und Propidium-Monoazid (PMA), für die Detektion von *Campylobacter* eingesetzt (Josefsen et al. 2010; Rudi et al. 2005). Um festzustellen, inwieweit die Farbstoffe, PMA und EMA, lebende von toten *Campylobacter* unterscheiden können, haben wir zunächst die Membranpermeabilitäten der Analoga Ethidiumbromid (EtBr) und Propidiumiodid (PI) im Fluorimeterexperiment getestet. Die Ergebnisse weisen eindeutig darauf hin, dass EtBr je nach metabolischem Zustand der

Zelle bzw. zusätzlich auch abhängig von der Membranfluidität zeit- und konzentrationsabhängig in lebende Zellen penetriert. PI hingegen konnte sehr gut zwischen intakten und membrangeschädigten *Campylobacter* unterscheiden. Mikroskopisch wurden die Ergebnisse auch mit EMA und PMA bestätigt. Für eine Standardisierung der Methode ist es wichtig, geeignete Kontrollen für die Funktionalität von PMA im Kontext der Lebensmittelmatrix zu besitzen. Normalerweise werden Bakterien hitzeinaktiviert, um als Kontrolle für tote Zellen zu dienen. Unsere Ergebnisse weisen darauf hin, dass durch Hitzeinaktivierung relativ viel DNA aus den Zellen austritt. Da der „physiologische Tod“ von *Campylobacter* vorrangig durch oxidativen Stress ausgelöst wird, verwenden wir Zellen nach Behandlung von Wasserstoffperoxid als Kontrolle toter Zellen, die sich im Experiment als geeignet erwiesen haben.

Die quantitative Real-time-PCR-Methode ist noch nicht abschließend standardisiert. Weitere Experimente bzgl. der Stabilität bzw. des Detektionslimits sind erforderlich, bevor diese Methode als Standard zur kultivierungsunabhängigen Detektion von *Campylobacter* routinemäßig eingesetzt werden kann. Zudem müssen Abweichungen zwischen den quantitativen Daten aus der PMA/Real-time PCR relativ zum derzeitigen „Goldstandard“ ISO 10272-2 akzeptiert werden. Diese spiegeln die derzeitige Diskrepanz zwischen den quantitativen (mikrobiologischen) Daten von Proben aus dem Supermarkt und ihrem realen Infektionsrisiko für den Verbraucher wider.

## Referenzen

- EFSA (2011). Scientific Opinion on *Campylobacter* in broiler meat production: control options and performance objectives and/or targets at different stages of the food chain. EFSA Journal 9: 2105.
- Josefsen, M.H., Jacobsen, N.R., Hoorfar, J. (2004). Enrichment followed by quantitative PCR both for rapid detection and as a tool for quantitative risk assessment of food-borne thermotolerant campylobacters. Appl Environ Microbiol 70: 3588–3592.
- Josefsen, M.H., Lofstrom, C., Hansen, T.B., Christensen, L.S., Olsen, J.E., Hoorfar, J. (2010). Rapid quantification of viable *Campylobacter* bacteria on chicken carcasses, using real-time PCR and propidium monoazide treatment, as a tool for quantitative risk assessment. Appl Environ Microbiol 76: 5097–5104.
- Lübeck, P.S., Wolffs, P., On, S.L., Ahrens, P., Radstrom, P., Hoorfar, J. (2003). Toward an international standard for PCR-based detection of food-borne thermotolerant *Campylobacter*: assay development and analytical validation. Appl Environ Microbiol 69: 5664–5669.
- Rudi, K., Moen, B., Dromtorp, S.M., Holck, A.L. (2005). Use of ethidium monoazide and PCR in combination for quantification of viable and dead cells in complex samples. Appl Environ Microbiol 71: 1018–1024.
- Stingl, K., Knüver, M.-T., Vogt, P., Buhler, C., Krüger, N.-J., Alt, K. et al. (2012). Quo vadis? – Monitoring *Campylobacter* in Germany. Eur J Microbiol Immunol 2: 88–96.



## Livestock-associated MRSA als Besiedler und Krankheitserreger des Menschen – ein Update

Robin Köck  
Institut für Hygiene, Universität Münster

Die Verbreitung von MRSA bei landwirtschaftlichen Nutztieren wurde in den vergangenen Jahren umfangreich dokumentiert. In Deutschland dominieren bei Nutztier-assoziierten („livestock-associated“, LA) MRSA vor allem (>90 %) Isolate die zur klonalen Linie CC398 (MLST Sequenztypen ST398, ST752, ST753) gehören. MRSA CC398 sind vor allem mit den *S. aureus*-Protein-A- (spa-)Typen t011, t034, t108 assoziiert. Allerdings wurden auch andere klonale Linien bei LA-MRSA beschrieben. Hierbei wurden in Deutschland MRSA CC9/ST9 (t1430), CC97/ST97 (t3992, t5487) und CC30/ST39 (t007) in 3,9 % der Isolate aus Schweinebeständen gefunden; CC9 (t1430) und CC5 (t002) wurden bei Geflügel und bei Rindern nachgewiesen (van Loo et al. 2007; European Food Safety Authority 2009; Fessler et al. 2011; BfR 2012; Richter et al. 2012).

Es wurde gezeigt, dass Personen mit direktem Kontakt zu Nutztieren sich häufig mit LA-MRSA besiedeln. So sind in Deutschland 77–86 % der Landwirte im Bereich Schweinehaltung durch MRSA CC398 kolonisiert (Cuny et al. 2009; Köck et al. 2012). Eine Übertragung von Mensch zu Mensch wird bei engem (Haushalts-)Kontakt beobachtet. So wurden bei Familienangehörigen von Landwirten, die selbst keine direkte Exposition gegenüber den Tieren haben, MRSA-Besiedlungsraten gefunden, die zwar deutlich geringer sind als die der Personen mit Tierkontakt (4–5 %) allerdings auch deutlich höher als in der Allgemeinbevölkerung (Cuny et al. 2009). In der Allgemeinbevölkerung im ländlichen Raum (Niedersachsen und Münsterland) wurde eine Prävalenz von LA-MRSA CC398 von ca. 1 % bei Personen gefunden, die keinen direkten Kontakt zu Nutztieren hatten. Dabei wurde gezeigt, dass für Menschen, die nicht selbst tierexponiert waren, die folgenden Risikofaktoren signifikant mit Besiedlung durch LA-MRSA assoziiert waren: Personen mit Nutztierkontakt im selben Haushalt (OR 3,8) und private Besuche auf nutztierhaltenden Höfen (OR 3,2) (Bisdorff et al. 2011). Derzeit deutet wenig darauf hin, dass sich LA-MRSA effektiv durch Abluft aus Tierställen (aerogen oder durch Sedimentation auf stallnahe Flächen) (Schulz et al. 2012) oder durch Lebensmittelkontaminationen in der Allgemeinbevölkerung ausbreiten, eine abschließende Risikobewertung hierzu liegt aber noch nicht vor. Ungeklärt ist zudem, warum LA-MRSA CC398 im Hospitalbereich in den Niederlanden zunehmend bei Personen gefunden werden, die keinen Kontakt zu landwirtschaftlichen Nutztieren haben (Lekkerkerk et al. 2011; Wulf et al. 2012).

LA-MRSA CC398 sind humanpathogen. Das epidemiologische Ausmaß von ambulanten Infektionen (z.B. kutane Abszesse) durch LA-MRSA, besonders in exponierten Gruppen (berufsbedingte Infektionen bei Landwirten, Veterinären) ist bislang nicht abzuschätzen. Konkrete Zahlen zu LA-MRSA-Infektionen in Deutschland liegen derzeit vor allem für Krankenhaus-assoziierte Infektionen vor: Daten des Nationalen Referenzlabors für Staphylokokken am Robert Koch-Institut zeigen, dass MRSA ST398 einen Anteil von ca. 2 % an allen im Jahr 2010 typisierten MRSA-Isolaten (überwiegend aus dem Krankenhausbereich) ausmacht (Witte et al. 2011). In 39 münsterländischen Krankenhäusern des Netzwerks EUREGIO MRSA-net repräsentierten 2011 MRSA ST398 ca. 31 % der MRSA-Isolate, die bei Patienten aus Screeningmaterialien (n = 1.077) nachgewiesen wurden (www.eursafety.eu). Dort wurden MRSA CC398 auch zunehmend aus klinischen Untersuchungsmaterialien (Wundabstriche, respiratorische Sekrete, Blutkulturen) isoliert (Anteil ca. 10–15 % aller MRSA aus diesen Materialien). Zur Häufigkeit des Vorkommens von LA-MRSA CC9, CC97 oder CC5 beim Menschen ist nichts veröffentlicht.

Aus Sicht der Krankenhaushygiene bedeutet dies, dass Personen mit direktem Nutztierkontakt (Schweine, Geflügel, Rinder) als Risikopatienten für MRSA-Kolonisationen und –Infektionen gelten sollten. Im Krankenhaus sollten für Patienten, die mit LA-MRSA besiedelt sind, dieselben erweiterten Hygienemaßnahmen etabliert werden wie für andere MRSA-Patienten. Dies gilt, obwohl mathematische Modelle auf eine geringere Transmissibilität von LA-MRSA im Vergleich zu klassischen humanen MRSA hindeuten (Wassenberg et al. 2010), da andere Daten eine nosokomiale Verbreitung nicht ausschließen (Köck et al. 2011; Lekkerkerk et al. 2011; Wulf et al. 2012).

Aktuelle Informationen zum Thema LA-MRSA finden sich auf der Homepage des Forschungsverbundes MedVet-Staph ([www.medvetstaph.net](http://www.medvetstaph.net)).

## Referenzen

- Bisdorff, B., Scholholter, J.L., Claussen, K., Pulz, M., Nowak, D., et al. (2011). MRSA-ST398 in livestock farmers and neighbouring residents in a rural area in Germany. *Epidemiol Infect* 140: 1800–1808.
- Bundesinstitut für Risikobewertung (2012). Deutsche Antibiotika-Resistenzsituation in der Lebensmittelkette – DARLink 2009. Accessed at the internet, July 24th 2012: <http://www.bfr.bund.de/cm/350/deutsche-antibiotika-resistenzsituation-in-der-lebensmittelkette-darlink-2009.pdf>.
- Cuny, C., Nathaus, R., Layer, F., Strommenger, B., Altmann, D., et al. (2009). Nasal colonization of humans with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) CC398 with and without exposure to pigs. *PLoS One* 4: e6800.
- European Food Safety Authority (2009). Analysis of the baseline survey on the prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in holdings with breeding pigs, in the EU, 2008, Part A: MRSA prevalence estimates; on request from the European Commission. *EFSA Journal* 7: 1376.
- Fessler, A.T., Kadlec, K., Hassel, M., Hauschild, T., Eidam, C., et al. (2011). Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from food and food products of poultry origin in Germany. *Appl Environ Microbiol* 77: 7151–7157.
- Köck, R., Loth, B., Koksall, M., Schulte-Wulver, J., Harlizius, J., et al. (2012). Persistence of nasal colonization with livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pig farmers after holidays from pig exposure. *Appl Environ Microbiol* 78: 4046–4047.
- Köck, R., Siam, K., Al-Malat, S., Christmann, J., Schaumburg, F., Becker, K., et al. (2011). Characteristics of hospital patients colonized with livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) CC398 versus other MRSA clones. *J Hosp Infect* 79: 292–296.
- Lekkerkerk, W.S.N., Van de Sande-Bruinsma, N., Van der Sande, M.A.B., Tjon-A-Tsien, A., Groenheide, A., Haenen, A., et al. (2011). Emergence of MRSA of unknown origin in the Netherlands. *Clin Microbiol Infect* 18:656–661.
- Richter, A., Sting, R., Popp, C., Rau, J., Tenhagen, B.A., et al. (2012). Prevalence of types of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in turkey flocks and personnel attending the animals. *Epidemiol Infect* 10: 1–10.
- Schulz, J., Friese, A., Klees, S., Tenhagen, B.A., Fetsch, A., et al. (2012). LA-MRSA contamination of air and soil surfaces in the vicinity of pig barns: A longitudinal study. *Appl Environ Microbiol* 78: 5666–5671.
- van Loo, I., Huijsdens, X., Tiemersma, E., de Neeling, A., van de Sande-Bruinsma, N., et al. (2007). Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* of animal origin in humans. *Emerg Infect Dis* 13: 1834–1839.
- Wassenberg, M.W., Bootsma, M.C., Troelstra, A., Kluytmans, J.A., Bonten, M.J. (2010). Transmissibility of livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (ST398) in Dutch hospitals. *Clin Microbiol Infect* 17: 316–319.

- Witte, W., Cuny, C., Chaberny, I.F. (2011). GERMAP 2010 Antibiotikaresistenz- und -verbrauch; *Staphylococcus* spp., <http://www.p-e-g.org/econtext/germap>.
- Wulf, M.W., Verduin, C.M., van Nes, A., Huijsdens, X., Voss, A. (2012). Infection and colonization with methicillin resistant *Staphylococcus aureus* ST398 versus other MRSA in an area with a high density of pig farms. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 31: 61–65.



## EHEC – Konsequenzen für die Lebensmittelhygiene nach dem Ausbruch 2012

Juliane Bräunig  
Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin

Von Mai bis Juli 2011 kam es in Deutschland zu einem Ausbruch mit *Escherichia (E.) coli* O104:H4, einem bis zu diesem Zeitpunkt beim Menschen extrem selten beschriebenen und noch nicht mit kontaminierten Lebensmitteln in Verbindung gebrachten Stamm. Von einer Erkrankung betroffen waren über 3.400 Personen sowie über 850 Personen, die ein hämolytisch urämisches Syndrom (HUS) entwickelt hatten. Damit war dieser Ausbruch der größte bekannt gewordene bakterielle Ausbruch mit *E. coli* in Deutschland und weltweit der größte Ausbruch hinsichtlich des Auftretens von HUS. Epidemiologische Studien aus dem humanen Krankheitsgeschehen sowie der Rück- und Vorwärtsverfolgung der Sprossen und Samen hatten Sprossen aus Bockshornkleesamen als wahrscheinliche Ursache identifiziert. In den mikrobiologisch untersuchten Sprossen- und Samenproben konnte der Erreger nicht nachgewiesen werden. Letztendlich ließen sich die Ursachen und Zusammenhänge des Ausbruchs nicht vollständig aufklären.

Auf Seiten der Europäischen Union hat die Dimension dieses Ausbruchs dazu geführt, über ergänzende rechtliche Maßnahmen hinsichtlich der Produktion von Sprossen nachzudenken. Eine Verabschiedung der Rechtsvorschriften steht unmittelbar bevor. Zukünftig soll eine Zulassung von Betrieben, die Sprossen herstellen, die Rückverfolgung der Produkte sowie das Ausstellen eines Zertifikats bei Importen geregelt werden. Der Anhang I der Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel wird um ein Lebensmittelsicherheitskriterium für fünf Serovare Shigatoxin-bildender *Escherichia coli* (STEC) ergänzt.

Lfd. Nummer	Kriterium	n	c	m/M	Nachweismethode	Stelle in der Lebensmittelkette
1.29 Sprossen	Shigatoxin-bildende <i>E. coli</i> (STEC) O157, O26, O111, O103, O145 and O104:H4	5	0	Abwesenheit in 25 g	CEN ISO 13136	Produkte auf dem Markt während der Haltbarkeit

Mit diesem zusätzlichen Kriterium wurden auch Vorschriften zur Probenahme verbunden. Demnach müssen von allen eingehenden Chargen an Samen in Sprossenproduktionsbetrieben 0,5 % des Gewichts mikrobiologisch untersucht werden. Diese Untersuchung erfolgt 48 Stunden nach dem Beginn des Prozesses der Sprossung oder alternativ durch die Analyse des verwendeten Beregnungswassers. Die mikrobiologischen Tests müssen monatlich wiederholt werden. Bei einwandfreier Beschaffenheit der Sprossen kann die Frequenz für die Untersuchungen reduziert werden.



## Krankheitsausbrüche durch pflanzliche Lebensmittel

Petra Hiller

Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin

Seit dem Jahr 2005 führt das Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) ein Erfassungssystem für Lebensmittel, die an Krankheitsausbrüchen beteiligt sind. Die zuständigen Behörden der Länder übermitteln hierfür jährlich Informationen zu den an Ausbrüchen beteiligten Lebensmitteln. Für die meisten dieser Ausbrüche liegt die Ursache im Verzehr von Lebensmitteln tierischer Herkunft. Bis zum Jahr 2011 wurden hierin 21 Meldungen erfasst, bei denen ein pflanzliches Lebensmittel aus Ursache für den Krankheitsausbruch ermittelt werden konnte. Am häufigsten konnten *Bacillus cereus* und Noroviren (je sechs Ausbrüche) dabei als ursächliches Agens festgestellt werden. Als Lebensmittelvehikel wurden hauptsächlich zubereitete Speisen, einschließlich gekochter Reis, identifiziert.

Obst und Gemüse wurde bis zum Jahr 2011 nur sehr selten als Auslöser von Erkrankungen erkannt. Dies änderte sich im Jahr 2011, als auch Obst und Gemüse als Ursache für Krankheitsausbrüche weltweit große Aufmerksamkeit erlangte. Im Frühsommer 2011 kam es vor allem in Norddeutschland zu einem gehäuften Auftreten von Erkrankungsfällen mit dem hämolytisch-urämischem Syndrom (HUS) und blutigen Durchfällen im Zusammenhang mit einer Infektion durch EHEC O104:H4. Nach Angaben des RKI handelte es sich um den bisher größten Krankheitsausbruch durch EHEC-Infektionen in Deutschland und bezogen auf die Anzahl der HUS-Fälle um den größten weltweit beschriebenen derartigen Ausbruch. Durch den Verzehr roher Sprossen wurde der Ausbruchserreger übertragen. Als Ursache des Ausbruchs werden aus Ägypten importierte Bockhornklee Samen angesehen, die in einem niedersächsischen Gartenbaubetrieb und von Privatpersonen zur Sprossenproduktion verwendet wurden. Wo und wie die Samen mit dem Ausbruchserreger in Kontakt kamen, ließ sich nicht ermitteln.

Im Herbst 2011 kam es zu einem weiteren Sprossen-assoziierten überregionalen Ausbruch durch *Salmonella* Newport mit über 100 Fällen in Deutschland. Erkrankungsfälle traten auch in einem anderen EU-Mitgliedsstaat auf. Die Befragungen durch die Gesundheitsbehörden ergaben, dass mehrere erkrankte Personen im Inkubationszeitraum in Asia-Restaurants in verschiedenen Bundesländern gegessen hatten. Außerdem konnte ein Cluster von Erkrankungen in einer Reha-Klinik ermittelt werden. Die umfassende Ausbruchsuntersuchung einschließlich der Rückverfolgungen von Lieferketten führte zu dem Schluss, dass der Verzehr von Mungobohnensprossen, die in einem anderen Mitgliedsstaat produziert worden waren, diesen Ausbruch ausgelöst hatte. Nach den im BfR vorliegenden Informationen wurden die Mungobohnensprossen nur in der Reha-Klinik zum Rohverzehr angeboten. Die involvierten Asia-Restaurants haben die Sprossen als Zutat bei erhitzten Gerichten verwendet. Offensichtlich reichte diese kurze Erhitzungszeit jedoch nicht aus, die Salmonellen abzutöten.

Ende 2011 löste der Verzehr von Wassermelonen, die aus Südamerika in die EU importiert und in mehreren Mitgliedsstaaten vertrieben wurden, einen zweiten überregionalen Ausbruch von *Salmonella* Newport mit 17 gemeldeten Fällen in Deutschland aus. Die Ermittlungen in Deutschland haben ergeben, dass alle Erkrankten Wassermelonen erworben hatten, die vor Abgabe an den Verbraucher aufgeschnitten wurden (halbe Melonen, Melonenscheiben oder Melonenstückchen, die in Plastikboxen verkauft wurden). Erkrankungsfälle traten im Rahmen dieses Ausbruchs auch in anderen Mitgliedsstaaten auf. Die Ergebnisse zeigen, dass auch der Verzehr pflanzlicher Lebensmittel zu lebensmittelbedingten Infektionen führen kann. Um die Bedeutung von pflanzlichen Lebensmitteln als Überträger von Krankheitserregern zukünftig besser abschätzen zu können, ist es notwendig, dass insbesondere Obst und Gemüse zum Rohverzehr häufiger auch auf das Vorkommen von Zoonoseerregern untersucht werden.



**Fallbeispiel *Salmonella* Montevideo: Eintritt in die Lebensmittelkette und Vertrieb durch Online-Shopping – ein Ausbruch der modernen Art**

Annette Reinecke  
Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin

Im Frühjahr 2010 kam es zu steigenden Erkrankungszahlen mit dem seltenen Serovar *Salmonella* Montevideo (*S. Montevideo*). Die epidemiologische Spurensuche erfolgte in mehreren Etappen und konnte schließlich ein lückenloses Abbild vom Herstellungsprozess über Handelsbeziehungen bis zum Endverkauf des kontaminierten Produktes reproduzieren.

Zunächst wurde eine auffällige Bevölkerungsgruppe identifiziert. Es erkrankten insgesamt 37 Personen, hauptsächlich weiblich und mit einem durchschnittlichen Alter von 56 Jahren. Die Fälle wurden aus sechs Bundesländern gemeldet. Erste Hinweise auf ein gemeinsames Vehikel gelangen durch eine erkrankte ältere Dame, die ein bestimmtes Nahrungsergänzungsmittel in Form von Kapseln eingenommen hatte. Sie hatte von diesen Kapseln noch Vorräte und konnte sie zur mikrobiologischen Untersuchung abgeben. In diesen Kapseln wurde dann *S. Montevideo* festgestellt. Bei der folgenden Ermittlung konnte ein Zusammenhang von Kapseln einer bestimmten Charge zu weiteren Erkrankten gesichert werden. Es erfolgte schließlich eine mikrobiologische Bestätigung beim Hersteller aus vorrätigen Kapseln sowie einer Zutat für die Herstellung. Bei der sich anschließenden Vorwärts- und Rückverfolgung der Kapseln sowie der kontaminierten Zutat kam eine Verbindung zu weiteren Mitgliedsstaaten sowie eines weiteren Kontinentes hinzu.

Der Verkauf der Kapseln erfolgte fast ausschließlich via Online- bzw. Tele-Shopping.

Den Vertriebsfirmen gelang es daher, eine punktuelle, personenorientierte Rückrufaktion beim Endverbraucher durchzuführen. Jeder „Klick“ konnte zurückverfolgt und damit eine weitere Ausdehnung des Ausbruches akkurat verhindert werden. Flankierend wurden mittels RASFF und der Presse vor dem Produkt gewarnt.

Die Aufklärung dieses überregionalen Ausbruches war durch interdisziplinäre und behördenübergreifende Kooperation geprägt und zeigt eindrucksvoll, welche Kaskaden nötig waren, um den Ursprung einer Kontamination sowie die Verteilung in der Bevölkerung zu stoppen.



## **Drei Jahre Zoonosen-Monitoring in Deutschland**

Annemarie Käsbohrer, Bernd-Alois Tenhagen, Katja Alt, Istvan Szabo, Reiner Helmuth, Kerstin Stingl, Lothar Beutin, Angelika Miko, Sylvia Kleta, Alexandra Fetsch, Andreas Schroeter, Bernd Appel  
Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin

### **Zielstellung**

Mit der AVV Zoonosen Lebensmittelkette wurde 2008 die rechtliche Basis geschaffen, um in Deutschland durch aktive Monitoringprogramme (Zoonosen-Monitoring) repräsentative Daten zu generieren. Die Monitoringprogramme dienen der Schätzung der Prävalenz eines Erregers in der untersuchten Population sowie der Gewinnung von Isolaten für die weitergehende Charakterisierung einschließlich Resistenztestung in den am BfR angesiedelten Nationalen Referenzlaboren.

Damit soll die Datenbasis für die umfassende Bewertung der Entwicklungstendenzen von Zoonosen und Zoonoseerregern einschließlich deren Antibiotikaresistenzen sowie der möglichen Quellen menschlicher Erkrankungen gemäß Richtlinie 2003/99/EG geschaffen werden.

### **Organisation des Zoonosen-Monitorings**

Vom BfR wird jährlich der Zoonosen-Stichprobenplan (ZSP) erarbeitet und im Ausschuss Zoonosen beraten und abgestimmt. Dieser Plan legt das bundesweit einheitliche Vorgehen im Monitoring fest. Dementsprechend nehmen die zuständigen Stellen der Länder die Verteilung der Probenahme auf die Vor-Ort-Behörden vor. Diese veranlassen die Probenahme, die dann von den Untersuchungseinrichtungen der Länder mit den vorgegebenen, standardisierten Verfahren untersucht werden. Vorschläge für weitere Probenentnahmeverfahren werden ggf. in den technischen Programmbeschreibungen angeführt. Soweit verfügbar, werden international standardisierte mikrobiologische Nachweisverfahren verwendet. Es können aber auch andere, die mit den vorab genannten Verfahren vergleichbar sind, eingesetzt werden. Die zu den Proben erhobenen Daten sowie die Ergebnisse der Untersuchung werden von der regionalen Behörde an das BVL übermittelt, die diese in einem Ergebnisbericht zusammenstellen. Die Nationalen Referenzlabore am BfR führen die Typisierung der Erreger sowie die Resistenzbestimmung der Isolate durch. Diese Ergebnisse nebst denen vom BVL übermittelten Daten werden vom BfR bewertet und daraus ein gemeinsamer Bericht von BfR und BVL veröffentlicht.

### **Konzeption des Zoonosen-Stichprobenplans**

Insgesamt soll die gesamte Lebensmittelkette betrachtet werden. Innerhalb der Produktionsketten wird das Vorkommen der Erreger ggf. auf verschiedenen Stufen der Lebensmittelkette geschätzt. Betrachtet werden hierbei die Primärproduktion, der Eintrag in den Schlachthof sowie die Verschleppung der Erreger während des Schlachtprozesses und der Eintrag in die Lebensmittelverarbeitung. Auf der Stufe des Einzelhandels wird abgeschätzt, mit welchem Kontaminationsstatus das Lebensmittel in den Haushalt des Endverbrauchers gelangt. Im ZSP wird jährlich der Schwerpunkt auf ausgewählte Lebensmittelketten gelegt. Es werden dann die relevanten Stufen der jeweiligen Kette für die Probenahme ausgewählt. In einem Zeitraum von drei Jahren sollen die wichtigsten Lebensmittel liefernden Tierarten und die von ihnen stammenden Lebensmittel zumindest einmal betrachtet werden.

Der Probenumfang ist so berechnet, dass mit einer akzeptablen Genauigkeit und einer Vertrauenswahrscheinlichkeit von 95 % die Prävalenz des Erregers geschätzt werden kann. Hierbei wird bei den meisten Programmen von einer unendlich großen Population ausgegangen.

## Ergebnisse

Im Zeitraum 2009 bis 2011 wurde die Verbreitung von *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Listeria monocytogenes*, verotoxinbildenden *Escherichia (E.) coli* (VTEC) sowie Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) betrachtet. Die Auswahl der Erreger erfolgte anhand ihrer Bedeutung (Häufigkeit und/oder Schwere von Erkrankungsfällen beim Menschen). MRSA wurde mit aufgenommen, um Daten zum Vorkommen des Erregers entlang der verschiedenen Lebensmittelketten erstmalig zu generieren sowie um Veränderungen entlang der Kette einschließlich des Neuauftretens oder des Ausbreitens von Klonen mit neu erworbenen Virulenzfaktoren und/oder Resistenzdeterminanten frühzeitig zu erkennen.

### • Prävalenzen entlang der Lebensmittelketten

Bei **Legehennen** wurden in der Primärproduktion *Campylobacter* spp. recht häufig, dagegen kaum MRSA nachgewiesen. In **Konsumeiern** wurde bei 0,7 % der Poolproben von Hühner-eierschalen *Salmonella* spp., insbesondere *S. Enteritidis*, nachgewiesen.

In der **Hähnchenfleischkette** wurde das Vorkommen von *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. und MRSA beobachtet. Während der Nachweis von *Campylobacter* spp. bei ca. 10 % der Sockentupferproben aus Mastbetrieben gelang, war MRSA nur in 0,7 % der Staubproben nachweisbar. Dagegen waren die Erreger (*Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. und MRSA) im Schlachthof mit einer deutlich höheren Kontaminationsrate bei den Schlachtkörpern nachweisbar. Mehr als 40 % der Schlachtkörper waren mit *Campylobacter* spp. und/oder MRSA kontaminiert. Für *Salmonella* spp. war die Nachweisrate deutlich geringer, aber ebenfalls über der Nachweisrate im lebenden Tier. In frischem **Hähnchenfleisch** lagen die Nachweisraten für alle drei Erreger unter den Nachweisraten auf den Schlachtkörpern, am häufigsten wurden *Campylobacter* spp. auf Hähnchenfleisch nachgewiesen.

Bei der **Putenfleischkette** lag der Nachweis von *Campylobacter* spp. in Blinddarmproben im Schlachthof und das Ausmaß der Kontamination der Schlachtkörper für *Campylobacter* und MRSA über den Nachweisraten in der Hähnchenfleischkette. Auf frischem **Putenfleisch** aus dem Einzelhandel wurden im Vergleich zum Schlachtkörper deutlich geringere Raten der betrachteten Erreger nachgewiesen. Dieser Abfall war bei Putenfleisch deutlicher im Vergleich zum Hähnchenfleisch. Während bei frischem Hähnchenfleisch und Zubereitungen am häufigsten *Campylobacter* spp. nachgewiesen wurden, war bei Putenfleisch MRSA am häufigsten.

In der **Schweinefleischkette** wurde vorrangig das Lebensmittel betrachtet. **Schweinefleisch** wurde auf *Salmonella* spp. und *Campylobacter* spp. in 2009 und 2011, auf VTEC und MRSA nur in 2009 untersucht. 2011 wurden zusätzlich das Vorkommen von Salmonellen bei Mastschweinen im Bestand und auf Schlachtkörpern betrachtet. Hierbei konnte bei 9,4 % der Proben im Tierbestand und 4 % der Schlachtkörperproben *Salmonella* spp. nachgewiesen werden. Im Unterschied zur Geflügelschlachtung gelingt es im Rahmen der Schweineschlachtung, die Verschleppung von eingetragenen Keimen auf den Schlachtkörper zu begrenzen. Während *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. und VTEC im Bereich von 0,3–5,0 % in Schweinefleisch, Hackfleisch und Fleischzubereitungen nachweisbar waren, lagen die Nachweisraten für MRSA mit 11,7–24,3 % deutlich darüber. Vergleicht man die Ergebnisse der Untersuchungen 2009 und 2011, so lag die ermittelte Prävalenz für *Salmonella*

spp. in frischem **Schweinefleisch** und **Hackfleisch** vom Schwein 2011 mit 0,4 % bzw. 1,3 % deutlich unter den 2009 ermittelten Werten (1,4 % bzw. 5,0 %).

Beim **Mastrind** wurden VTEC bei 18,5 % der Kotproben im Bestand und MRSA bei 8,7 % der Nasentupfer am Schlachthof nachgewiesen. Bei 2,3 % der untersuchten Schlachtkörper wurde eine Kontamination mit VTEC ermittelt. In frischem **Rindfleisch** und Rinderhackfleisch konnten *Salmonella* spp., VTEC und MRSA in geringem Umfang nachgewiesen werden, die höchsten Nachweisraten betrafen VTEC (1,8 bzw. 3,8 %) sowie MRSA (8,1 %).

Beim **Mastkalb** im Betrieb lagen die Nachweisraten von VTEC im Kot deutlich über den am Schlachthof (Dickdarminhalt) ermittelten Raten (26,5 % vs. 13,5 %). Hier scheinen Altersunterschiede eine Rolle zu spielen. Für VTEC und MRSA konnte gezeigt werden, dass die Erreger während des Schlachtprozesses auf die Schlachtkörper übertragen werden. Im **Kalb-fleisch** wurden im Vergleich zum Rindfleisch deutlich höhere Nachweisraten für *Salmonella* spp., VTEC und MRSA ermittelt. Die höchsten Nachweisraten bei Kalbfleisch betreffen VTEC (5,8 bzw. 3,1 %) sowie MRSA (12,4–19,4 %).

Beim **Milchrind** wurde anhand von Tankmilch das Vorkommen von *Salmonella* spp. (kein Nachweis), *Campylobacter* spp. (0,9–1,9 %), VTEC (1,4 bzw. 1,5 %), MRSA und *Listeria monocytogenes* (je 4,1–4,7 %) untersucht. In **Weichkäse und halbfestem Schnittkäse** wurden *Listeria monocytogenes*, VTEC und MRSA nachgewiesen. Im Fokus der Untersuchung standen dabei Käse aus Rohmilch.

#### • Ergebnisse der Typisierung

**Salmonella.** Die Ergebnisse der Serotypisierung von **Salmonellen** zeigen, dass über mehrere Jahre hinweg bestimmte Serovare relativ häufig entlang der einzelnen Produktionsketten nachgewiesen werden und sich diese zwischen den Produktionsketten z. T. deutlich unterscheiden. Spezifische Serovare im **Hähnchenfleisch** waren *S. Paratyphi B dT+* und das monophasische Serovar *S. 4,12:d:-*. Auch *S. Infantis* war häufig. Im **Putenfleisch** dominierten dagegen *S. Saintpaul*, *S. 4, [5],12:i:-* und *S. Newport*. Der gehäufte Nachweis von *S. Kentucky* aus Putenfleisch in 2010 war insofern bemerkenswert, als dieses Serovar in den letzten Jahren nur selten nachgewiesen worden war und eine internationale Verbreitung eines hochresistenten Klons von *S. Kentucky* beschrieben wurde.

Aus Schweinefleisch wurden 2009 und 2011 vor allem *S. Typhimurium* und seine monophasische Variante *S. 4,[5],12:i:-* isoliert. Auch *S. Derby*, das nächsthäufigste Serovar bei den Mastschweinen, wurde im Rahmen früherer Untersuchungen häufig bei Schweinen nachgewiesen. Bei dem Isolat vom Kalbfleisch handelte es sich um *S. Dublin*.

**Campylobacter.** *C. jejuni* und *C. coli* sind beim **Masthähnchen** und **Legehennen** weit verbreitet. Insgesamt überwogen in den Geflügelfleischketten und beim Rind *C. jejuni*, während beim Schwein *C. coli* klar dominierte.

**VTEC.** Insgesamt wurde bei verotoxinbildenden *E. coli* bei allen betrachteten Tiergruppen (Mastkalb, Mastrind, Milchrind, Schwein) eine große Variabilität bzgl. des Serotyps beobachtet. Diese Ergebnisse zeigen, dass eine Fülle unterschiedlicher Stämme von *E. coli* über entsprechende Gene verfügt. Von den in 2011 typisierten 245 Isolaten gehörten 7,3 % auch zu den beim Menschen in der EU am häufigsten mit einer EHEC-Infektion in Verbindung gebrachten O-Gruppen (z.B. O103, O111, O113). Von diesen wiesen einige, aber nicht alle das *eae*-Gen auf. Weitergehende Analysen haben gezeigt, dass bei Rindern und ihren Produkten signifikant häufiger humanpathogene EHEC isoliert wurden als aus Erzeugnissen anderer Tierarten.

**MRSA.** Die MRSA-Isolate von **Mastrindern, Milchviehbeständen** und **Mastkälberbeständen** waren alle dem Clonalen Complex (CC) 398 zuzuordnen. Es ist davon auszugehen, dass eine Übertragung der Stämme nicht nur zwischen Tieren derselben Tierart, sondern auch zwischen verschiedenen Tierarten möglich ist.

Die Isolate von der **Pute** und vom **Hähnchen** gehörten auch überwiegend dem CC398 an. Es wurden aber auch non-CC398-Isolate nachgewiesen (CC9 beim Hähnchen, CC5 bei der Pute). Die Verteilung der eingesandten Isolate vom Fleisch auf die *spa*-Typen ähnelte sehr der von den Schlachtkörpern, die Heterogenität war jedoch größer.

### **Abschließende Bewertung und Ausblick**

Die Ergebnisse aus den ersten drei Jahren des nationalen Zoonosen-Monitoring zeigen den Eintrag der betrachteten Erreger über verschiedene Tierarten aus der Primärproduktion in Deutschland in die Lebensmittelkette. Sie zeigen auch die Exposition der Verbraucher gegenüber den untersuchten Zoonoseerregern über die verschiedenen Arten tierischer Lebensmittel. Die Ergebnisse liefern eine wichtige Basis für die Risikobewertung. Zudem können Hypothesen bzgl. der ursächlichen Zusammenhänge und Einflussfaktoren auf die ermittelte Prävalenz der einzelnen Erreger auf den verschiedenen Stufen der Lebensmittelkette abgeleitet und ggf. in weiterführenden Studien geprüft werden.

Die Ergebnisse zeigen, dass die betrachteten Zoonoseerreger auf den verschiedenen Stufen der unterschiedlichen Lebensmittelketten mit deutlich unterschiedlicher Prävalenz nachgewiesen werden können. Die Ergebnisse der Typisierung der Erreger zeigen, dass die Keime entlang der Produktionsketten verschleppt werden, dass aber auch neue Erreger im Rahmen der Verarbeitung eingetragen werden.

Während bisher vorrangig Konsumierer für Infektionen des Menschen mit Salmonellen verantwortlich gemacht wurden, zeigen sich kontinuierlich die Erfolge der Bekämpfungsmaßnahmen in einer Reduktion der *Salmonella*-Prävalenz bei den jeweiligen Tierarten. Vorläufige Analysen am BfR bestätigen die Berichte der EFSA, dass Schweinefleisch zunehmend eine Rolle als Infektionsquelle der insgesamt rückläufigen menschlichen Salmonellosefälle darstellt.

Geflügelfleisch ist häufig mit *Campylobacter* spp. belastet und kann somit eine Infektionsquelle für den Menschen sein. Aber auch Schweinefleisch kann zu einer Infektion beitragen, da es im Gegensatz zum Hähnchenfleisch auch roh verzehrt wird. Es kommt damit als Quelle menschlicher *Campylobacter*-Infektionen, v.a. durch *C. coli*, durchaus in Betracht. Nach Schätzung der EFSA können ca. 20–30 % der Erkrankungen des Menschen mit *Campylobacter* der Handhabung, Zubereitung und dem Verzehr von Hähnchenfleisch zugeordnet werden.

Die Ergebnisse beim Mastrind und Kalb belegen, dass VTEC regelmäßig im Darm nachgewiesen werden kann. Der Nachweis des *eae*-Gens bei diesen und anderen Isolaten unterstreicht die Rolle von Rind- und Kalbfleisch, aber auch Schweinefleisch und Milch als potentielle Quelle virulenter VTEC Stämme.

Der bei allen Nutztiergruppen festgestellte Typ von MRSA (CC398) wird bei beruflich exponierten Personen häufig als Besiedler nachgewiesen, es werden aber zunehmend auch schwerwiegende Infektionen mit diesem als livestock-associated (la) MRSA bezeichneten Typ beschrieben, insbesondere in viehdichten Regionen. In der Gesamtbevölkerung sind CC398 MRSA bisher eher selten zu finden. Da es derzeit keine Hinweise auf eine Übertragung der laMRSA auf den Menschen über kontaminiertes Fleischs gibt, wird dieser Expositionsweg für die Humangesundheit aktuell als gering eingeschätzt.

Die Ergebnisse des Zoonosen-Monitoring bei **Milchrindern** belegen, dass Rohmilch eine potentielle Quelle für verschiedene Zoonoseerreger sein kann. Dies betont die Wichtigkeit der Hitzebehandlung von Milch vor Abgabe an den Verbraucher bzw. dem direkten Verzehr.



## Enteropathogene Yersinien: eine Vorliebe für Schweine?

Petra Dersch

Institut für Mikrobiologie, Technische Universität Braunschweig

Eine Infektion mit enteropathogenen Yersinien und die daraus resultierende Erkrankung, die Yersiniose, ist die dritthäufigste Ursache lebensmittelbedingter bakterieller Erkrankungen in Europa. Verursacht werden sie durch die beiden enteropathogenen Spezies *Yersinia enterocolitica* und *Yersinia pseudotuberculosis*, die meistens über kontaminierte Lebensmittel aufgenommen werden.

### Entdeckung und taxonomische Einteilung

*Y. pseudotuberculosis* wurde im Jahr 1883 erstmals isoliert und als *Bacillus pseudotuberculosis rodentium* beschrieben, was sich auf die häufige Assoziation mit Meerschweinchen begründet. Später wurde das Bakterium auch *Pasteurella pseudotuberculosis* genannt und galt viele Jahre als rein tierpathogen. Dies änderte sich erst in den 1950er-Jahren als sich Fälle erkrankter Kinder häuften, denen fälschlicherweise der Blinddarm entfernt wurde, obwohl sie in Wahrheit aber an einer mesenterialen Lymphadenitis litten. *Y. enterocolitica* wurde 1934 in den USA aus einem fazialen Abszess eines Farmers und wenig später auch aus Patienten isoliert, die an einer Enterocolitis erkrankten. Diese Spezies wurde zunächst *Bacillus enterocoliticum* genannt, 1964 erhielt diese Erregergruppe zusammen mit der als *Pasteurella* bekannten Gruppe den Gattungsnamen *Yersinia* (Bottone 1999; Putzker et al. 2001). Die Gattung *Yersinia* gehört aufgrund ihrer 16S rRNA Homologien, eines G+C-Gehalts von 46–50 % und ihrer metabolischen Eigenschaften zu den Enterobacteriaceae in der Klasse der  $\gamma$ -Proteobakterien. Zurzeit umfasst die Gattung nur drei human- und tierpathogene Spezies: *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* (enterale Yersiniosen) und *Y. pestis*, der Erreger der Beulen- und Lungenpest. Multilocus Sequenzanalysen und DNA-DNA-Hybridisierungsanalysen weisen darauf hin, dass die enteropathogenen *Yersinia*-Spezies sich vor etwa 200 Millionen Jahren auseinanderevolviert haben. *Y. pestis* ist ein eng verwandter Klon von *Y. pseudotuberculosis* (97 % DNA-Sequenzhomologie), der sich in den letzten 1.500–20.000 Jahren entwickelt hat (Achtmann et al. 1999). Im Gegensatz hierzu ist die DNA-Sequenz von *Y. enterocolitica* nur 50 % homolog zu *Y. pseudotuberculosis* und *Y. pestis* und unterteilt sich in zwei Subspezies: *Y. enterocolitica* subsp. *enterocolitica* und *Y. enterocolitica* subsp. *polarctica* (Neubauer et al. 2000).

### Eigenschaften und Epidemiologie von enteropathogenen Yersinien

Yersinien sind gramnegative, pleomorphe Stäbchenbakterien (1–3  $\mu\text{m}$ ), die bei Temperaturen von 0–44 °C unter aeroben und anaeroben Bedingungen wachsen. Bei Temperaturen unter 30 °C bilden sie Flagellen und sind beweglich. *Y. enterocolitica* susp. *enterocolitica* umfasst alle hochpathogenen Stämme des Biotyps 1B, wohingegen die *Y. enterocolitica* subsp. *polarctica* die apathogenen Stämme des Biotyps 1A und die schwächer pathogenen Stämme der Biotypen 2–5 einschließt. Pathogene Stämme des Biotyps 1B werden hauptsächlich in USA, Japan und seltener in Europa gefunden, wo vorwiegend Stämme des Biotyps 2, 3 und 4 vorliegen. Von diesen Stämmen lösen nur bestimmte Serotypen beim Menschen und Tieren eine Erkrankung aus. Weltweit ist vor allem der Serotyp O:3, zu einem geringeren Anteil auch O:5,27 und O:9 vorherrschend. In den USA wurden über viele Jahre hinweg vor allem Stämme des Serotyps O:8 isoliert, die jedoch in den letzten Jahren mehr und mehr vom Serotyp O:3 verdrängt wurden (Bissett 1990; Bottone 1999; Fredriksson-Ahomaa und Wacheck 2011). In Deutschland sind mehr als 89 % der gemeldeten *Yersinia*-Infektionen auf Serotyp O:3 Stämme zurückzuführen (Rosner et al. 2010). Ein geringer Anteil wird durch O:9

(6 %), O:5,27 (0.7 %) und O:8 (0.6 %) hervorgerufen. Diese pathogenen Serotypen werden neben dem Menschen aus Schweinen/Wildschweinen, Nagern, Rind, Hund, Katze und Wildtieren isoliert (Fredriksson-Ahomaa und Wacheck 2011). Allein tierpathogen sind nur wenige Spezies. Zu diesen zählen die Serotypen O:1,2,3 (Chinchilla – Europa, USA) und O:2,3 (Hase, Ziege, Schaf, Kaninchen – Europa, Australien). Bei *Y. pseudotuberculosis* werden derzeit vier verschiedene Biotypen (1B, 2, 3 und 4) unterschieden. Bei den Serotypen sind vor allem O:1, und O:3 in Europa weit verbreitet. Sie werden hauptsächlich aus Menschen, Schweinen/Wildschweinen, Vögeln, Katzen, Wild, Hasen und Schafen isoliert (Aleksic et al. 1995; Fredriksson-Ahomaa et al. 2006, 2011; Fredriksson-Ahomaa und Wacheck 2011).

### Pathogenität von enteropathogenen Yersinien

Alle humanpathogenen *Yersinia* Spezies besitzen ein 70 Kb großes Plasmid, das *Yersinia* Virulenzplasmid pYV, auf dem wichtige Virulenzgene kodiert sind. Sie sind für die Abwehr der angeborenen Immunantwort – Angriff von Neutrophilen, Makrophagen und dendritischen Zellen auf eindringende Yersinien – absolut essentiell. Zu den kodierten Virulenzfaktoren zählen das Oberflächenadhäsion YadA, das Typ-III-Sekretionssystem (Ysc) und die durch dieses sezernierten *Yersinia*-Oberflächenproteine (Yops) (Cornelis 1998; El Tahir und Skurnik 2001). Zu den Letzteren zählen die Translokatorproteine YopB, YopD und LcrV, die die Translokationspore in der Wirtszellmembran ausbilden und den Transfer der Yop-Effektorproteine durch den Typ-III-Sekretionsapparat ermöglichen. Die Yop-Proteine YopE, YopH, YopO/YpkA und YopT blockieren nach Übertragung auf phagozytierende Wirtszellen die Induktion der Phagozytose durch professionelle Phagozyten. YopP/YopJ löst zudem die Apoptose der Phagozyten aus und YopM führt zur Suppression natürlicher Killerzellen (Cornelis 2002). Des Weiteren bewirken verschiedene Yops immunomodulatorische Effekte, indem sie die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine unterdrücken. Das pYV-kodierte trimere Oberflächenprotein YadA vermittelt die Adhäsion und Invasion von enteropathogenen Yersinien in Wirtszellen durch die Bindung an extrazelluläre Matrixproteine wie Fibronectin, Kollagen und Laminin. Zudem führt YadA zur Autoaggregation der Bakterien, wodurch die Ausbildung von Mikrokolonien im infizierten Gewebe induziert wird, und blockiert die Aktivierung des Komplementsystems, was zur Serumresistenz führt (El Tahir und Skurnik 2001).

Auch verschiedene chromosomal kodierte Virulenzgene sind für die Pathogenese von Bedeutung. Das Genom beider enteropathogener *Yersinia* Spezies ist nahezu gleich groß (4,6–4,7 Mb) und kodiert für etwa 4.000–5.000 Gene (Fredriksson-Ahomaa und Wacheck 2011). Darunter sind verschiedene Gene, die Oberflächen-exponierte Proteine kodieren, wie das afimbrilläre Adhäsion PsaA und die Myf-Fimbrien, die die Adhäsion an Wirtszellen vermitteln, sowie das Invasin und das Ail Protein, die beide, neben YadA, die Internalisation in eukaryotische Zellen induzieren. Das Invasin ist der effizienteste und bisher bestcharakterisierte Invasionsfaktor von enteropathogenen Yersinien. Es bindet mit hoher Affinität an  $\beta_1$ -Integrinrezeptoren die auf der apikalen Oberfläche von M-Zellen in der Darmepithelschicht der Peyer-Platten im Ileum zu finden sind. Dies ermöglicht die effiziente Aufnahme und die Überquerung der Darmepithelschicht in das darunter liegende lymphatische Gewebe, wo sie sich ausschließlich extrazellulär vermehren. Zudem vermittelt das Invasin die Adhäsion und Aufnahme in Makrophagen, bevorzugt zu Beginn der Infektion, da die Expression des *inv*-Gens bei moderaten Temperaturen (bei Aufnahme und Infektionsbeginn) maximal induziert ist, wogegen die Invasin-Synthese bei 37 °C reprimiert ist (Ellison et al. 2004). Das Ail-Protein wird vor allem bei 37 °C produziert und vermittelt Zelladhärenz und -invasion, wobei die Effizienz gegenüber dem Invasin deutlich geringer ist. Zudem vermittelt es eine Resistenz gegenüber dem Komplementsystem (Miller et al. 2001). Neben diesen Virulenzfaktoren werden von verschiedenen Vertretern des Spezies auch Toxine produziert, u.a. das *Yersinia*-Enterotoxin Yst (in *Y. enterocolitica*) und das zytotoxisch-nekrotisierende Toxin CNFy (einige *Y. pseudotuberculosis*-Isolate), deren Funktion bei der Pathogenese im Detail aber noch nicht bekannt ist (Delor und Cornelis 1992). Zudem werden Eisenaufnahme- und Speicher-

systeme (Yersiniabactin, Bfr, Bfd) produziert, mit welchen sich die Bakterien die  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ -Zufuhr sichern, um in dem sonst  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ -armen Wirtsgewebe überleben zu können. Die Lipopolysaccharide (LPS) der enteropathogenen Yersinien variieren stark in Abhängigkeit von der Temperatur, was bei der Pathogenität eine große Rolle spielt (Bengoechea 2003).

### Pathogenese beim Mensch und Tier

*Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica* können ähnliche Darm-assoziierte Erkrankungen auslösen. Zu den akuten und wenig komplizierten Symptomen zählen Enterocolitis (Entzündung des Ileums und Kolons), Enteritis (mesenteriale Lymphadenitis) mit Bauchschmerzen, wässrige Diarrhö mit Erbrechen und mäßigem Fieber, Pseudoappendizitis und Lymphadenopathie. Die Symptome einer Enterocolitis bzw. Enteritis dauern meist 5–14 Tage (selten mehrere Monate) (Koornhof et al. 1999; Neubauer et al. 2001). Neben den akuten Erkrankungsformen können Yersinien auch zu immunpathologischen und chronischen Komplikationen führen, z.B. in 1–3 % der Fälle zu reaktiver Arthritis. Folgeerkrankungen treten mit einer Latenz von einigen Tagen bis zu mehreren Wochen nach der Akutsymptomatik der Yersiniose auf. Als Folgeerkrankungen werden insbesondere bei HLA-B27-positiven Patienten das Erythema nodosum, Ileitis „Pseudo Crohn“, Myocarditis und andere Symptome des rheumatischen Formenkreises beobachtet. Die reaktive Arthritis tritt akut oder subakut auf, bevorzugt an den Gelenken der unteren Extremitäten (Knie- und Sprunggelenke) (Koornhof et al. 1999; Neubauer et al. 2001).

Die Diagnose erfolgt bei der akuten Erkrankung durch den Nachweis der Erreger im Stuhl der Patienten (2–12 Wochen nach Infektion). Zudem kann die Serologie – Nachweis von spezifischen IgG, IgA und IgM Antikörpern gegenüber *Yersinia*-spezifischen Antigenen wie den Yops mittels ELISA – zur Aufklärung von Folgeerkrankungen herangezogen werden. Insbesondere IgA Antikörper persistieren bei Folgeerscheinungen wie der reaktiven Arthritis oft länger als bei unkomplizierten Verlaufsformen.

Klinische Erkrankungen wurden auch bei verschiedenen Tieren beschrieben. Bei Nagern und Hasen tritt eine Enterocolitis auf, die oft mit der Formation von Granulomen in der Darmmukosa, Milz und Leber begleitet wird. Bei akut erkrankten Tieren kann es zu septischen Verläufen kommen, die zum Tod der Tiere führt (Neubauer et al. 2001). Bei anderen Tieren, z.B. bei Hunden, wurde blutiger Durchfall und eine mesenteriale Adenitis nachgewiesen. Große und kleine Wiederkäuer sind wenig häufig von einer *Yersinia*-induzierten Erkrankung betroffen; sie können mesenteriale Lymphadenitis, und Enterocolitis mit Mikroabszessen ausbilden (Neubauer et al. 2001).

### Reservoir und Übertragung durch Lebensmittel

Beide enteropathogene Yersinien sind Zoonose-Erreger. Das Hauptreservoir für die in Deutschland am häufigsten vorkommenden *Y. enterocolitica*, vor allem der O:3-Serotypen, ist das Schwein. Dort besiedeln die Bakterien insbesondere die Mundhöhle, Tonsillen und den Darmtrakt, wo sie in der Regel keine Symptome hervorrufen (Fredriksson-Ahomaa 2012; Funk et al. 2000). Die Bakterien bleiben so meist unentdeckt und die Schweine sind über lange Zeit Träger und Ausscheider, wodurch sie ein ständiges krankheitsauslösendes Potential für den Menschen darstellen. In der Tat haben Untersuchungen von Schweineherden auf die Anwesenheit von *Y. enterocolitica* verdeutlicht, dass in fast allen untersuchten Herden *Y. enterocolitica* in unterschiedlicher Häufigkeit zu finden war (Virtanen et al. 2012). Um die Besiedelung von Schweinen durch *Y. enterocolitica* näher zu untersuchen und für die Kolonisierung essentielle Virulenzfaktoren zu identifizieren, haben wir in enger Zusammenarbeit mit der Tiermedizinischen Hochschule Hannover ein „Minipig“-Modell etabliert. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Kolonisation durch bestimmte *Y. enterocolitica*-Serotypen deutlich

unterschiedlich ist und von einem Adhäsionsfaktor abhängig ist, der auch für die Besiedelung im Menschen von Bedeutung ist.

Schweine können im Betrieb, aber auch beim Transport zum Schlachtbetrieb bzw. auf der Warteaufstellung des Schlachtbetriebs andere Schlachtschweine mit dem Erreger über den Kot infizieren. Von den Tonsillen können Yersinien in der Schlachtroutine (Entborstung, Ausweidung, Eviszeration, Zerteilung/Verkleinerung des Tierkörpers) über den Tierkörper verteilt werden (Fredriksson-Ahomaa et al. 2009). Die Übertragung auf den Menschen erfolgt dann meist über kontaminierte Nahrungsmittel, vor allem durch rohes oder unvollständig gebratenes Schweinefleisch und Milchprodukte. Da die Yersinien sich bei 4 °C im Kühlschrank noch weiter vermehren können und in gefrorenen Lebensmitteln mehrere Wochen überleben und infektiös bleiben, ist eine vollständige Durcherhitzung der Fleischspeisen von Bedeutung. Bei Untersuchungen zum Vorkommen von Yersinien im Schweinefleisch wurden besonders in Hackfleischproben, aber auch in Kopffleisch und Speck die Erreger nachgewiesen (Fredriksson-Ahomaa et al. 2006, 2012). Längere Lagerung, Fleischreifung sowie der weitreichende Handel mit den damit verbundenen langen Transportwegen in gekühltem Zustand begünstigen das Überleben und die Vermehrung von Yersinien. Die psychrotoleranten Yersinien können sich gegenüber einer etwaigen Begleitflora, die weniger gut an solche extremen Bedingungen angepasst ist, behaupten. Als Beispiel sei hier das erste Vorkommen von *Y. enterocolitica* O:8 in Japan genannt, das eindeutig auf importiertes Schweinefleisch zurückgeführt werden konnte (Ichinohe et al. 1991).

*Y. enterocolitica* war früher auch in Fisch, Geflügel, Milch, Eiprodukten und Gemüse nachgewiesen worden, doch in neueren Studien war der Nachweis in Fisch und Geflügel negativ und im Falle anderer kontaminierter Lebensmittel (z.B. Milch) war eine Kontamination als Sekundärkontamination erfolgt (Fredriksson-Ahomaa 2012).

Apathogene *Y. enterocolitica* des Bioserovars 1A vermehren sich auch in der Umwelt und auch pathogene Biovare können in der Umwelt längere Zeit überleben, wodurch kontaminierte Oberflächengewässer, Vegetation und Boden zu Infektionsquellen für Mensch und Tier werden können. *Y. pseudotuberculosis* konnte aus Grundwasser, Boden, Pflanzen (Kartoffeln, Salat) und aus Fäkalien von Tieren isoliert werden (Fredriksson-Ahomaa 2009; Fredriksson-Ahomaa und Wachek 2011). Die Annotation der beiden enteropathogenen *Yersinia*-Spezies-Genome hat gezeigt, dass beide Erreger eine hohe Anzahl an Stoffwechselwegen aufweisen, die es ihnen erlaubt, diverse C- und N-Quellen aufzunehmen und als Energiequelle zu nutzen. Zudem sind sie in der Lage diverse Umweltstresse und Nährstofflimitationen zu überstehen, was ihnen ein Überleben in der Umwelt über eine längere Zeit ermöglichen kann. Welche Stoffwechselwege zum Überleben in Schweinefleisch bei moderaten Temperaturen und 4 °C beitragen, wird gerade in unserem Labor untersucht.

## Referenzen

- Achtman, M., et al. (1999). *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis*. Proc Natl Acad Sci USA 96 (24): 14043–14048.
- Aleksic, S., Bockemuhl, J., Wuthe, H.H. (1995). Epidemiology of *Y. pseudotuberculosis* in Germany, 1983–1993. Contrib Microbiol Immunol 13: 55–58.
- Bengoechea, J.A. (2003). Regulation of O-antigen biosynthesis in *Yersinia enterocolitica*. Adv Exp Med Biol 529: 267–274.
- Bissett, M.L., et al. (1990). Epidemiologic investigations of *Yersinia enterocolitica* and related species: sources, frequency, and serogroup distribution. J Clin Microbiol 28 (5): 910–912.
- Bottone, E.J. (1999). *Yersinia enterocolitica*: overview and epidemiologic correlates. Microbes Infect 1 (4): 323–333.
- Cornelis, G.R. (1998). The *Yersinia* Yop virulon, a bacterial system to subvert cells of the primary host defense. Folia Microbiol (Praha) 43 (3): 253–261.

- Cornelis, G.R. (2002). The *Yersinia* Ysc-Yop 'type III' weaponry. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3 (10): 742–752.
- Delor, I., Cornelis, G.R. (1992). Role of *Yersinia enterocolitica* Yst toxin in experimental infection of young rabbits. *Infect Immun* 60 (10): 4269–4277.
- Ellison, D.W., Lawrenz, M.B., Miller, V.L. (2004). Invasin and beyond: regulation of *Yersinia* virulence by RovA. *Trends Microbiol* 12 (6): 296–300.
- El Tahir, Y., Skurnik, M. (2001). YadA, the multifaceted *Yersinia* adhesin. *Int J Med Microbiol* 291 (3): 209–218.
- Fredriksson-Ahomaa, M., Stolle, A., Korkeala, H. (2006). Molecular epidemiology of *Yersinia enterocolitica* infections. *FEMS Immunol Med Microbiol* 47 (3): 315–329.
- Fredriksson-Ahomaa, M., Gerhardt, M., Stolle, A. (2009). High bacterial contamination of pig tonsils at slaughter. *Meat Sci* 83 (2): 334–336.
- Fredriksson-Ahomaa, M. (2009). Epidemiology of human *Yersinia pseudotuberculosis* infection. *Arch. Lebensmittelhyg* 60: 82–87.
- Fredriksson-Ahomaa, M., et al. (2011). Different enteropathogenic *Yersinia* strains found in wild boars and domestic pigs. *Foodborne Pathog Dis* 8 (6): 733–737.
- Fredriksson-Ahomaa, M., Wacheck, S. (2011). Enteropathogene Yersinien – Pathogenität, Erkrankung, Diagnostik und Präventionsmaßnahmen. Behr's Verlag.
- Fredriksson-Ahomaa, M., et al. (2012). High number of *Yersinia enterocolitica* 4/O:3 in cold-stored modified atmosphere-packed pig cheek meat. *Int J Food Microbiol* 155 (1–2): 69–72.
- Fredriksson-Ahomaa, M. (2012). Isolation of enteropathogenic *Yersinia* from non-human sources. *Adv Exp Med Biol* 954: 97–105.
- Funk, J.A., et al. (2000). In vitro susceptibility of *Yersinia enterocolitica* isolated from the oral cavity of swine. *J Food Prot* 63 (3): 395–399.
- Ichinohe, H., et al. (1991). First isolation of *Yersinia enterocolitica* serotype O:8 in Japan. *J Clin Microbiol* 29 (4): 846–847.
- Koornhof, H.J., Smego, R.A. Jr., Nicol, M. (1999). Yersiniosis. II: The pathogenesis of *Yersinia* infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 18 (2): 87–112.
- Miller, V.L., et al. (2001). Identification of regions of Ail required for the invasion and serum resistance phenotypes. *Mol Microbiol* 41 (5): 1053–1062.
- Neubauer, H., et al. (2000). Identification of *Yersinia enterocolitica* within the genus *Yersinia*. *Syst Appl Microbiol* 23 (1): 58–62.
- Neubauer, H., et al. (2001). *Yersinia enterocolitica* infections: 1. Impact on animal health. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 114 (1–2): 8–12.
- Neubauer, H., et al. (2001). *Yersinia enterocolitica* infections: 2. Impact on human health. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 114 (3–4): 81–87.
- Putzker, M., Sauer, H., Sobe, D. (2001). Plague and other human infections caused by *Yersinia* species. *Clin Lab* 47 (9–10): 453–466.
- Rosner, B.M., Stark, K., Werber, D. (2010). Epidemiology of reported *Yersinia enterocolitica* infections in Germany, 2001–2008. *BMC Public Health* 10: 337.
- Virtanen, S., et al. (2012). Piglets are a source of pathogenic *Yersinia enterocolitica* on fattening-pig farms. *Appl Environ Microbiol* 78 (8): 3000–3003.



## Pathogene Vibrionen in Lebensmitteln und Umwelt

Eckhard Strauch, Ralf Dieckmann  
Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin

### Einführung

Vibrionen sind aquatische Bakterien, die vorwiegend in Küstengewässern und Ästuargebieten weltweit verbreitet sind. Weltweit können Vibrionen als Krankheitserreger für den Menschen in Lebensmitteln und in der marinen Umwelt vorkommen und Durchfallerkrankungen und extraintestinale Erkrankungen wie Wund- und Weichteil- Infektionen hervorrufen. Die humanmedizinisch bedeutendsten *Vibrio*-Erreger sind die *Vibrio cholerae* Stämme der Serogruppen O1 und O139, die als Erreger der Cholera aufgrund ihres pandemischen Potenzials eine große gesundheitspolitische Bedeutung haben. Cholera-Erkrankungen kommen heute in der Regel nur noch in Endemie-Gebieten (Südamerika, Zentralafrika, Indien, Südostasien u.a.) vor. Große Cholera-Ausbrüche erfolgten in den letzten Jahren in Ländern, in denen aufgrund von Naturkatastrophen oder politischen Unruhen sanitäre Einrichtungen und Versorgung mit sauberem Trinkwasser nicht den erforderlichen hygienischen Standards entsprachen (z.B. Simbabwe, 2008, Haiti, 2010).

### Infektionen durch Nicht-Cholera-Vibrionen (NCV)

Aufgrund des Klimawandels und der damit verbundenen Erwärmung der Oberflächengewässer wird befürchtet, dass NCV-Infektionen, die auch unter dem Begriff Vibriosen zusammengefasst werden, auch in gemäßigten Klimazonen zunehmen werden. Insgesamt sind 12 Spezies der Familie *Vibrionaceae* als potentiell humanpathogen beschrieben worden, von denen in nordeuropäischen Küstengewässern und Ästuaren die Spezies *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, *V. alginolyticus* und *V. cholerae* (non-O1, non-O139) am häufigsten vorkommen. In ihrem natürlichen Habitat kommen Vibrionen frei in der Wassersäule, im Sediment sowie in Verbindung mit Plankton, Fischen, Krusten- und Schalentieren vor.

*Vibrio parahaemolyticus* ruft in der Regel einen milden, selbstlimitierenden Durchfall hervor und wurde erstmals 1950 als Krankheitserreger in Japan identifiziert. *V. parahaemolyticus* ist der häufigste Kontaminant von Meeresfrüchten und Fischprodukten weltweit. In Deutschland kommen *V. parahaemolyticus* Bakterien in Muscheln und Austern vor, die in Küstengewässern erzeugt werden. Dies gilt auch für importierte Meeresfrüchte und Fisch und Fischereiprodukte aus allen Regionen der Welt. Nach dem gegenwärtigen Wissensstand sind nur solche Isolate als humanpathogen einzuschätzen, die bestimmte Toxine (Hämolytine TDH und TRH) bilden können. Diese toxinbildenden Isolate sind in Muscheln aus nordeuropäischen Gewässern sehr selten zu finden (ca. 1- 3 %), sie können aber auch in der Handelsware vorhanden sein.

*Vibrio vulnificus* ist ein weiterer gefährlicher Krankheitserreger, der in den USA für die meisten Todesfälle durch Verzehr von „Seafood“, insbesondere kontaminierten roh verzehrten Austern, verantwortlich ist. Dieser Erreger kommt auch in der Ostsee im Brackwasser häufig vor und kann sich nach Hitzeperioden im Sommer stark vermehren. In Deutschland erfolgen Erkrankungen im Wesentlichen durch den direkten Kontakt mit Seewasser. Die von *V. vulnificus*-Infektionen betroffenen Patienten sind in der Regel ältere, abwehrgeschwächte Menschen. Zur Zeit ist die Erforschung, ob sich klinische Isolate von den vielen, möglicherweise apathogenen Umwelt-Isolaten unterscheiden lassen, Gegenstand intensiver Forschung weltweit.

*V. cholerae* (non-O1, non-O139) Isolate sind ebenfalls häufige Verursacher von Diarrhöen und gelegentlich auch bei Wundinfektionen beschrieben worden. Auch diese Isolate sind in den Badegewässern der Ostsee nachweisbar und können häufig in Meeresfrüchten und Fischprodukten des Handels nachgewiesen werden.

*V. alginolyticus* ist sehr häufig in der Nordsee nachzuweisen und ebenfalls regelmäßig in „Seafood“ aufzufinden. Es sind allerdings nur selten Durchfallerkrankungen mit diesem Erreger beschrieben worden, *V. alginolyticus* ist gelegentlich bei Weichteilentzündungen (z. B. Ohrentzündungen) nach Baden im Meer aufgetreten.

### **Aktivitäten des Nationalen Referenzlabors (NRL) für die Überwachung bakteriologischer Kontamination von zweischaligen Weichtieren zur *Vibrio* Diagnostik**

Auf Grundlage der Entscheidung 1999/313/EG ist festgelegt, dass in jedem EU-Mitgliedsland ein Referenzlaboratorium für die Kontrolle bakterieller und viraler Muschelkontaminationen benannt wird. Dieses NRL wurde im Jahr 2000 am BfR eingerichtet. Hintergrund der Rats-Entscheidung war, dass Muscheln und Austern in vielen EU-Ländern für den Handel produziert werden und von den Konsumenten häufig roh verzehrt werden. Da zweischalige Weichtiere aufgrund ihrer Lebensweise große Mengen Meerwasser filtrieren, sind die Möglichkeiten, dass in ihnen pathogene Bakterien vorhanden sind, insbesondere dann gegeben, wenn die Muschelerzeugungsgebiete in der Nähe von Abwassereinleitungen, Flussmündungen etc. liegen. Aus diesem Grund wird das Vorhandensein von Fäkal-Bakterien, wie *Escherichia coli* und *Salmonella* spp., schon seit vielen Jahren überwacht.

In den letzten Jahren hat sich gezeigt, dass auch die autochthone Mikroorganismenflora in den Küstengewässern und zwar insbesondere die Vibrionenflora bei der bakteriologischen Überwachung von Weichtieren zu beachten ist. Insgesamt ist die Belastung mit Vibrionen hoch einzuschätzen, da Untersuchungen z.B. aus dem Jahre 2011 zeigten, dass 82 % der Miesmuscheln aus den Anbaugebieten im deutschen Wattenmeer Vibrionen enthielten (LAVES, Cuxhaven). Alle vier oben erwähnten NCV waren nachweisbar, wobei am häufigsten *V. alginolyticus* und an zweiter Stelle *V. parahaemolyticus* stand. Da alle deutschen Anbaugebiete nur geringe Konzentrationen an Fäkalbakterien aufweisen, sind diese Muscheln zum Rohverzehr freigegeben. Es ist daher für das NRL notwendig, diagnostische Verfahren zu entwickeln und bereitzustellen, um eine Diskriminierung von pathogenen Isolaten und Umweltisolaten der in den Muscheln gefundenen *Vibrio*-Bakterien zu ermöglichen. Im Moment werden z.B. in Multiplex-PCR Ansätzen mittels geeigneter Primer und Sonden das Vorhandensein von Toxingenen in Isolaten von *V. parahaemolyticus* und *V. cholerae* untersucht, um pathogene Isolate zu identifizieren.

Neben den *Vibrio*-Isolaten aus der Überwachung von Muschelerzeugungsgebieten, die z.B. vom LAVES (Niedersachsen) und dem Landeslabor Neumünster (Schleswig-Holstein) eingesandt werden, erhält das NRL regelmäßig von verschiedenen Lebensmittel-Untersuchungsämtern *Vibrio*-Isolate aus Seafood (z.B. Weichtiere, Fische, Fischprodukte, etc) zur diagnostischen Bestätigung und zur Toxincharakterisierung. .

### **Aufbau eines Kompetenznetzwerkes VibrioNet**

Um die Vibrionenforschung national und international zu stärken und zu vernetzen, hat das BFR das interdisziplinäre Forschungsnetzwerk VibrioNet initiiert, das sich seit Ende 2010 mit finanzieller Förderung durch das BMBF mit den möglichen Risiken durch Vibrionen in Lebensmitteln und der Umwelt in Deutschland beschäftigt. Dabei begründet sich der Forschungsansatz auf folgende Annahmen:

- Infektionen mit Vibrionen (insbesondere *V. parahaemolyticus* und *V. vulnificus*) nehmen durch die globale Erwärmung zu. Insbesondere regionale klimatische Perioden mit sehr warmen Wassertemperaturen erhöhen die Gefahr von *Vibrio*-Infektionen.
- Der globale Handel mit Meeresprodukten und Fischereiwaren wächst. Dies bedeutet, dass durch eine Belastung von Handelsware mit Vibrionen eine gesundheitliche Gefährdung für den Verbraucher vorhanden ist. Herkunft (Risikoländer) und Handhabung der Handelsware (Lagerung, Zubereitung) haben entscheidenden Einfluss auf die Vibrionenbelastung im Lebensmittel.
- Eine Reihe von epidemiologischen Faktoren, wie die Zunahme des Verzehrs von Fischen und Meeresprodukten und die Veränderung der gesundheitlichen Situation der Bevölkerung durch den demographischen Wandel steigert die Exposition und Anfälligkeit für *Vibrio*-Infektionen.

Vor diesem Hintergrund hat sich das Forschungsnetzwerk VibrioNet aus verschiedenen wissenschaftlichen Disziplinen mit Experten aus der marinen Mikrobiologie, Human- und Veterinärmedizin, Molekularbiologie und Epidemiologie gebildet. Das BfR koordiniert den Verbund und beteiligt sich - neben zentralen Aufgaben wie Stammsammlung und dem Aufbau einer Datenbank-Plattform - an Forschungen zur Pathogenität und Virulenz von Vibrionen und ihrer Diagnostik (qualitativ und quantitativ) in Lebensmitteln und Umwelt. Das Alfred-Wegener-Institut untersucht am Standort Helgoland die Ökologie und Saisonalität von *Vibrio*-Populationen in Nord- und Ostsee. Das LAVES, Cuxhaven, widmet sich der *Vibrio*-Belastung in der deutschen Muschel- und Austernproduktion. Das Institut für Lebensmittelhygiene der FU Berlin analysiert einerseits die *Vibrio*-Belastung von Handelsware, andererseits aber auch inwieweit Vibrionen in Abhängigkeit von Faktoren in der Lebensmittelkette (Transport, Lagerung etc.) *in sog. Ruhezustände eingehen können (VBNC, viable but non-culturable)*, die die Detektion im Lebensmittel erschweren. Das Robert Koch Institut untersucht zusammen mit der Medizinischen Mikrobiologie der TU Dresden und zukünftig mit der Universitätsmedizin Greifswald in epidemiologischen Studien die Häufigkeit von NCV-Durchfallerkrankungen und Wundinfektionen in Deutschland.

Gestärkt wird der Verbund durch internationale Partner aus Ländern mit hoher Inzidenz von *Vibrio*-Infektionen (Südostasien, Afrika, Südamerika). Aufgaben des Verbund bestehen in der Erfassung der Vibrionen in Umwelt, Handelsware und bei humanen Erkrankungen in Deutschland, der Erforschung der Pathogenese und Ätiologie sowie der Etablierung und Verbesserung diagnostischer Verfahren [1,2].

[1] T. Alter, B. Appel, E. Bartelt, R. Dieckmann, C. Eichhorn, R. Erler, C. Frank, G. Gerds, F. Gunzer, S. Hühn, J. Neifer, B. Oberheitmann, E. Strauch (2011). *Vibrio*-Infektionen durch Lebensmittel und Meerwasser: Das Netzwerk „VibrioNet“ stellt sich vor. Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz 54 (11), 1235-1240.

[2] Informationsbroschüre zu Nicht-Cholera-Vibrionen in Deutschland, Janina Neifer, Christina Frank; Robert Koch Institut (RKI), Mai 2012.



## Ist die klassische *Salmonella*-Typisierung noch zeitgemäß?

Burkhard Malorny  
Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin

Die Nomenklatur und Differenzierung von Salmonellen ist sehr komplex und wurde in den letzten Jahrzehnten immer wieder angepasst. Zurzeit wird das Genus *Salmonella* in zwei Spezies, *Salmonella enterica* und *Salmonella bongori*, unterteilt (Grimont und Weill 2007). *Salmonella enterica* wird weiter in sechs weitere Subspezies, *S. enterica* subsp. *enterica* (bezeichnet Subspezies I), *S. enterica* subsp. *salamae* (Subspezies II), *S. enterica* subsp. *arizonae* (Subspezies IIIa), *S. enterica* subsp. *diarizonae* (Subspezies IIIb), *S. enterica* subsp. *houtenae* (Subspezies IV) und *S. enterica* subsp. *indica* (Subspezies VI), unterteilt. Spezies und Subspezies werden aufgrund ihrer biochemischen Eigenschaften klassifiziert (Farmer III 2003).

## Klassisch serologische Differenzierungsmethode

Im Jahr 1934 hat das International *Salmonella* Subcommittee ein serologisches Typisierungsschema für Salmonellen eingeführt, das Isolate durch Reaktion mit monovalenten Antisera unterscheidet (International *Salmonella* Subcommittee 2012). Das System wurde von Kauffmann und später von Le Minor weiterentwickelt und ist aktuell als White-Kauffmann-Le-Minor-Schema veröffentlicht (Grimont und Weill 2007). Danach werden Salmonellen aufgrund von 46 verschiedenen Lipopolysaccharid-Zusammensetzungen (Oberflächen [O]-Antigene) und 114 verschiedenen filamenten Strukturseinheiten der Geißelantigene (H-Antigene) eingeteilt. Aus der Kombination der positiven Seren für das O-Antigen, H1-Antigen und H2-Antigen wird eine Seroformel nach dem Schema O:H1:H2 (z.B. 4,12:i:1,2) definiert, die das Serovar (oder den Serotyp) eines Isolats beschreibt. Soweit vorhanden, wird auch ein Kapsel-Polysaccharid (Vi-Antigen) bestimmt. Derzeit sind in dem Schema über 2.600 verschiedene Serovare beschrieben.

Salmonellen kodieren in ihrem Genom zwei unterschiedliche Orte, die jeweils die Strukturseinheiten des Geißel H1- (*fliC*-Gen) bzw. H2-Antigens (*fljB*-Gen) kodieren. Durch einen Phasenwechsel-Mechanismus kann es jedoch nur zur Expression eines der zwei H-Antigene kommen. Die phänotypischen Eigenschaften des O-Antigens werden hauptsächlich durch Gene kodiert, die im *rfb*-Kluster zusammengefasst sind. Alle drei Gene/Kluster (*rfb*, *fliC*, *fljB*) sind für ihre Mosaikstruktur der DNA-Sequenz bekannt. Mosaikstrukturen entstehen durch horizontalen Gentransfer homologer Sequenzabschnitte, insbesondere wenn die Oberflächenproteine einem Selektionsdruck unterliegen. Die Folge ist ein Austausch von Aminosäuren bzw. Polysaccharideinheiten in den drei Antigenen, die zu Veränderungen in der Reaktivität mit den Seren und damit zur Änderung des Serovars führen. Genetisch verwandte Isolate können dadurch zu verschiedenen Serovaren zugeordnet sein bzw. genetisch unverwandte Isolate dasselbe Serovar teilen. Die Phylogenie der Salmonellen wird somit durch die Serotypie möglicherweise nicht mehr richtig abgebildet. Trotzdem hat sich das Kauffmann-White-Schema zur Beschreibung der Epidemiologie von Salmonellen aufgrund der historischen Bedeutung und langjährigen Entwicklung als die Referenzdifferenzierungsmethodik weltweit durchgesetzt. Von Vorteil ist dabei der geringe apparative Aufwand bei der Durchführung der Methode. Monitoring- und Bekämpfungsprogramme zur Reduzierung von Salmonellen in Tierbeständen in Europa haben z.B. die Serotypie als Referenzmethode zur Charakterisierung der *Salmonella*-Isolate festgelegt.

## DNA-sequenzbasierte Differenzierungsmethode

Mit Einführung der DNA-Sequenzierung Mitte der 1980er eröffnete sich eine neue Ära in der Taxonomie und Populationsgenetik von Bakterien. Die Sequenzierung von sog. Housekeeping-Genen erlaubte die Einschätzung von genetischer Verwandtschaft von Isolaten zueinander. Housekeeping-Gene gelten als geeignet, die Phylogenie von Bakterien widerzuspiegeln, da man davon ausgeht, dass sie keinem Selektionsdruck unterliegen, wie etwa an der Oberfläche von Bakterien befindliche Antigene. Die genetische Verwandtschaft der *Salmonella*-Spezies und -Subspezies abgeleitet aus einer Kombination von fünf Nukleotidsequenzen der Gene *putP* (Prolin-Permease), *gapA* (Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase), *mdh* (Malat-Dehydrogenase), *gnd* (Phosphoglukonat-Dehydrogenase) und *aceK* (Isocitrat-Dehydrogenase-Kinase/Phosphatase) erwies sich als komplett übereinstimmend mit DNA-DNA-Hybridisierungen (Le Minor et al. 1982).

Die systematische Anwendung von DNA-Sequenzen zur Bestimmung der genetischen Verwandtschaft führte schließlich zur Entwicklung der Multilocus-Sequenztypisierung (MLST) (Maiden et al. 1998). Das Prinzip der MLST beruht auf der DNA-Sequenzierung von Fragmenten einer begrenzten Anzahl von Housekeeping-Genen des zu untersuchenden Organismus und deren Vergleich hinsichtlich ihrer Sequenzunterschiede. Jeder unterschiedlichen Sequenz eines Gens wird eine Allelnummer zugeordnet. Aus der Zusammensetzung aller Allele der verschiedenen untersuchten Housekeeping-Gene lässt sich schließlich der Sequenztyp ableiten. Da die MLST nur Sequenzen von hochkonservierten Genen analysiert, bietet sie nur limitierte genetische Information und begrenzte Diskriminierfähigkeit bei nah verwandten Stämmen, ist jedoch geeignet, bakterielle Phylogenie und die Evolution von Populationslinien zu untersuchen. MLST-Daten erlauben außerdem einen einfachen elektronischen Austausch und sind eindeutig. Dies ist ein großer Vorteil, da Daten zwischen den Laboren schnell und zuverlässig zu interpretieren sind.

Für Salmonellen wurden verschiedene MLST-Schemata beschrieben (Fakhr et al. 2005; Kotetishvili et al. 2002; Sukhnanand et al. 2005). Die größte Kollektion von *Salmonella*-MLST-Daten wird durch die Universität Kolleg Cork, Irland (<http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Senterica>) zur Verfügung gestellt. Die Datenbank hat aktuell mehr als 4.000 Einträge. Das Schema beruht auf einer Publikation von Kidgell et al. 2002 (Kidgell et al. 2002). Danach werden interne DNA-Sequenzfragmente der sieben Housekeeping-Gene *thrA*, *purE*, *sucA*, *hisD*, *aroC*, *hemD* und *dnaN* verglichen. Eine kürzlich erschienene Publikation (Achtman et al. 2012) fasst die vorliegenden MLST-Daten, die nach dem Schema von 4.257 untersuchten *Salmonella*-Isolaten erhoben wurden, zusammen und vergleicht sie mit Daten der Serotypie. Danach korrespondieren viele sog. eBurst-Gruppen (eBGs) mit einem Serovar. Eine eBurst-Gruppe wird definiert als eine Gruppe von zwei oder mehr Sequenztypen, deren Sequenz in mindestens sechs der sieben Genfragmente übereinstimmt. Viele eBGs bestehen jedoch aus mehr als einem Serovar. Außerdem finden sich viele Serovare in mehreren unverwandten eBGs wieder. Ein Beispiel ist das Serovar Paratyphi B (4,[5],12:b:1,2), das in drei verschiedene eBGs aufgeteilt ist. Bestimmte eBGs können mit der Herkunft der Stämme assoziiert werden (Toboldt et al. 2012). Das epidemiologisch wichtige Serovar Typhimurium (4,[5],12:i:1,2) korrespondiert hauptsächlich zu eBG1, enthält aber auch die epidemiologisch an Bedeutung zunehmende monophasische Variante (4,[5],12:i:-) und die Serovare Hato (4,[5],12:g,m,s:[1,2]) und Farsta (4,12:i:e,n,x), die unterschiedliche H1- und H2-Antigene aufweisen. Umgekehrt sind nicht alle Serovar-Typhimurium-Isolate in eBG1 präsent. Es gibt eine unverwandte eBG (eBG138), die nur drei identische Allele mit eBG1 teilt.

## Weitere Subtypisierungsmethoden

Zur Subtypisierung von *Salmonella*-Isolaten, die zum selben Serovar gehören, gibt es traditionell weiterhin die Lysotypie. Hier wird ein Phagentyp (Lysotyp) bestimmt, bei der die Reaktion eines Isolates bei Anwendung eines definierten Phagensatzes bestimmt wird (Rabsch 2007). Die Methode hat für die Serovare Typhimurium und Enteritidis eine epidemiologische Bedeutung erlangt. Ähnlich wie bei der Serotypie ist der apparative Aufwand zur Durchführung des Systems gering. Große Nachteile erkennt man aber bei der Standardisierung der Methode zwischen den Laboren. Hier kann eine Reihe von Interpretationsschwierigkeiten entstehen, sodass die Vergleichbarkeit der Ergebnisse nicht mehr gewährleistet ist. Die Qualität und Konzentration der eingesetzten Phagensuspensionen spielen dabei eine wichtige Rolle.

Alternativ wurde in den letzten Jahren die „Multiple-locus variable-number tandem-repeats“-Analyse (MLVA) zur Subtypisierung von *Salmonella*-Isolaten, insbesondere für die Aufklärung von Ausbrüchen, weiterentwickelt. Bei dieser Technologie wird die Anzahl von kurzen aufeinanderfolgenden Sequenzwiederholungs-Motiven (VNTRs) bestimmt, die innerhalb des bakteriellen Genoms vorliegen. Die Auftrennung der VNTRs erfolgt idealerweise mittels Kapillarelektrophorese (Lindstedt et al. 2004; Malorny et al. 2008), sodass der apparative Aufwand als hoch bezeichnet werden kann. Eine internationale Standardisierung der MLVA für die Durchführung bei dem Serovar Typhimurium ist abgeschlossen und erfolgt nun für das Serovar Enteritidis. Die Methodik hat den Vorteil, dass Daten eindeutig interpretierbar und elektronisch austauschbar sind. Damit hat sie das Potential, sich bei Länder übergreifenden Ausbruchuntersuchungen als Referenzmethode durchzusetzen.

Als eine universelle molekulare Typisierungsmethode (z.B. bei Ausbruchsuntersuchungen) hat sich bereits die Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) weltweit durchgesetzt (Ribot et al. 2006). Trotz standardisiertem Protokoll ist jedoch der Austausch der Daten schwierig, da es sich um ein bildgebendes Verfahren handelt (PFGE-Muster), das zu Interpretationsfehlern und Schwierigkeiten bei der Vergleichbarkeit von PFGE-Mustern führen kann.

## Fazit

Die Serotypie nach de White-Kauffmann-Le-Minor-Schema wird weltweit praktiziert und gilt als universelle Sprache. Sie gibt durch den geringen apparativen Aufwand zur Durchführung Entwicklungsländern Zugang zur Epidemiologie von Salmonellen. Alternative, DNA-sequenzbasierte Methoden sind aufwendiger in der Durchführung, aber wesentlich informativer in ihren Ergebnissen. Sie können besser die Phylogenie bzw. genetische Verwandtschaft einer Population reflektieren.

Dem wissenschaftlichen Stand nach sollten daher in Zukunft bei der Typisierung von Salmonellen standardisierte, in ihrer Interpretierbarkeit eindeutige, DNA-sequenzbasierte Methoden wie MLST den Vorrang haben. Die Serotypie sollte aber weiterhin in der Routinediagnostik Berücksichtigung finden, um weltweit die Epidemiologie der Salmonellen vergleichbar zu halten. Der Austausch einer universellen Sprache (hier Serotypie) braucht Zeit und kann nicht kurzfristig erwartet werden. Dies sollte aber nicht dazu ausgelegt werden, keine Anstrengungen in Richtung DNA-sequenzbasierter *Salmonella*-Typisierung zu unternehmen und damit die Vorteile zu nutzen. Mit Entwicklung der Genomsequenzierung und vertretbaren Analysekosten eröffnen sich in Zukunft weitere Möglichkeiten, die Differenzierung und Diskriminierbarkeit der Salmonellen zu verbessern.

## Referenzen

- Achtman, M., Wain, J., Weill, F.X., Nair, S., Sangal, V., Krauland, M., Hale, J., Uesbeck, A., Harbottle, H., Cormican, M., Brisse, S., Dougan, G., Harrison, L., *S. enterica* MLST study group (2012). Multilocus sequence typing as a replacement for serotyping in *Salmonella enterica*. PLoS Pathog 8: e1002776.
- Fakhr, M.K., Nolan, L.K., Logue, C.M. (2005). Multilocus sequence typing lacks the discriminatory ability of pulsed-field gel electrophoresis for typing *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. J Clin Microbiol 43: 2215–2219.
- Farmer III, J.J. (2003). *Enterobacteriaceae*: Introduction and identification. In: Manual of Clinical Microbiology. Murray, P.R., Baron, E.J., Jorgensen, J.H., Tenover, M.A., Tenover, R.H. (eds.). ASM Press, Washington D.C.: 636–653.
- Grimont, P.A.D., Weill, F.-X. (2007). Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*, Institut Pasteur, Paris, France.
- International Salmonella Subcommittee (2012). The genus *Salmonella* Lignières 1900. J Hyg 138: 333–350.
- Kidgell, C., Reichard, U., Wain, J., Linz, B., Torpdahl, M., Dougan, G., Achtman, M. (2002). *Salmonella typhi*, the causative agent of typhoid fever, is approximately 50,000 years old. Infect. Genet Evol 2: 39–45.
- Kotetishvili, M., Stine, O.C., Kreger, A., Morris, J.J., Jr., Sulakvelidze, A. (2002). Multilocus sequence typing for characterization of clinical and environmental *Salmonella* strains. J Clin Microbiol 40: 1626–1635.
- Le Minor, L., Veron, M., Popoff, M. (1982). The taxonomy of *Salmonella*. Ann Microbiol (Paris) 133: 223–243.
- Lindstedt, B.A., Vardund, T., Aas, L., Kapperud, G. (2004). Multiple-locus variable-number tandem-repeats analysis of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium using PCR multiplexing and multicolor capillary electrophoresis. J Microbiol Methods 59: 163–172.
- Maiden, M.C., Bygraves, J.A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J.E., Urwin, R., Zhang, Q., Zhou, J., Zurth, K., Caugant, D.A., Feavers, I.M., Achtman, M., Spratt, B.G. (1998). Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. Proc Natl Acad Sci USA 95: 3140–3145.
- Malorny, B., Junker, E., Helmuth, R. (2008). Multi-locus variable-number tandem repeat analysis for outbreak studies of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis. BMC Microbiol 8: 84.
- Rabsch, W. (2007). *Salmonella* Typhimurium phage typing for pathogens. Methods Mol Biol 394: 177–211.
- Ribot, E.M., Fair, M.A., Gautom, R., Cameron, D.N., Hunter, S.B., Swaminathan, B., Barrett, T.J. (2006). Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. Foodborne Pathog Dis 3: 59–67.
- Sukhnanand, S., Alcaine, S., Warnick, L.D., Su, W.L., Hof, J., Craver, M.P., McDonough, P., Boor, K.J., Wiedmann, M. (2005). DNA sequence-based subtyping and evolutionary analysis of selected *Salmonella enterica* serotypes. J Clin Microbiol 43: 3688–3698.
- Toboldt, A., Tietze, E., Helmuth, R., Fruth, A., Junker, E., Malorny, B. (2012). Human infections attributable to the D-Tartrate-fermenting variant of *Salmonella enterica* serovar Paratyphi B in Germany originate in reptiles and, on rare occasions, poultry. Appl Environ Microbiol 78: 7347–7357.

## ***Listeria monocytogenes* in Lebensmitteln – Aufdeckung von Kontaminationswegen mit Hilfe molekularbiologischer Tools**

Sylvia Kleta,  
Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin

Das Bakterium *Listeria monocytogenes* kann bei Mensch und Tier die lebensbedrohende Infektionskrankheit Listeriose auslösen. Mit einigen hundert Erkrankten pro Jahr gehört die Listeriose zu den selteneren Infektionen, zeigt aber unter den meldepflichtigen Erkrankungen neben der invasiven MRSA-Infektion und der Meningokokken-Meningitis die höchste Letalität. Im Jahr 2011 wurden in Deutschland 337 humane Listeriosefälle an das RKI gemeldet, dies entspricht einer durchschnittlichen Inzidenz von 0,4 Erkrankungen/100.000 Einwohner, darunter 23 Fälle mit fatalem Ausgang (9%). Insbesondere alte Menschen sind häufiger betroffen, bei den über 69-jährigen betrug die Inzidenz 1,4 (RKI, 2012).

Die Listeriose ist eine lebensmittelassoziierte Infektionskrankheit, bei der die Übertragung des Erregers auf den Menschen in den meisten Fällen durch den Verzehr von kontaminierten Lebensmitteln tierischer und pflanzlicher Herkunft stattfindet.

Die höchsten Nachweisraten von *L. monocytogenes* sind bei Hackfleisch, rohen Fleischzubereitungen, geräuchertem und getrocknetem Fisch, Weichkäse (sowohl aus Rohmilch als auch aus pasteurisierter Milch) und Feinkostsalaten zu verzeichnen. Das weit in der Umwelt verbreitete Pathogen gelangt mitunter direkt über das tierische oder pflanzliche Rohmaterial ins Lebensmittel, z. B. durch bodennahen Anbau von Gemüse und Salaten, beim Melken in Rohmilch oder beim Schlachten auf rohes Fleisch. Sehr viel häufiger jedoch wird der Erreger durch unzureichende Hygiene während der Lebensmittelherstellung und -verarbeitung übertragen. Deshalb geht ein erheblich größeres Risiko von Rohprodukten und verzehrfertigen Lebensmitteln aus, die nach der Verarbeitung in der Regel keiner keimabtötenden Behandlung mehr unterzogen werden. Häufig persistiert das Pathogen in der Produktionsumgebung und führt kontinuierlich zu Kontaminationen von Lebensmitteln. Hygieneschwachstellen sowohl bei der Prozesskontrolle als auch Reinigung und Desinfektion sind z. B. Siele, Gitter, Schnittkanten und sogenannte Totpunkte technischer Anlagen. Spezifische, auf die Produktionsanlage abgestimmte Kontrollstrategien für *L. monocytogenes* können dem entsprechend die Prävalenz des Pathogens im Lebensmittel und damit das Infektionsrisiko für den Menschen erheblich reduzieren.

Für die Aufdeckung von Kontaminations- und Infektionswegen insbesondere in Ausbruchssituationen und für die Identifizierung der Persistenz von *L. monocytogenes* in Lebensmittel verarbeitenden Betrieben ist der stammspezifische Nachweis des Erregers entscheidend. Hierzu werden genetische Subtypisierungsmethoden in Kombination mit epidemiologischen Daten herangezogen.

Die Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) stellt momentan den Goldstandard zur Subtypisierung von *L. monocytogenes* dar. Sie ist eine gut zu reproduzierende, hoch diskriminierende und effektive genetische Typisierungsmethode, in der das bakterielle Genom mit Hilfe von Restriktionsenzymen geschnitten wird. Nach Größenauftrennung der Fragmente über die Gelelektrophorese stehen individuelle Bandenmuster (Fingerprints) zur Verfügung, die einen Stammvergleich über Pulsotypen zulassen.

Für *L. monocytogenes* steht dabei ein auf PulseNet International basierendes Protokoll zur Verfügung (CDC; Graves & Swaminathan, 2001), deren Anwendung in den vergangenen 3 Jahren durch die Arbeit des Europäischen Referenzlabors (EU-RL) für *Listeria monocytogenes* auf Lebensmittelseite weitestgehend harmonisiert wurde (Félix et al., 2012a). Darüber hinaus wurden vom EU-RL Standard Operating Procedures (SOP) für die softwaregestützte

PFGE-Profilanalyse in Bionumerics (Applied Math) erarbeitet, welche die Vergleichbarkeit der PFGE-Ergebnisse zwischen verschiedenen Laboren und Datenbanken gewährleistet (Félix et al., 2012b). Die in Kürze zur Verfügung stehende EU-RL Datenbank für *L. monocytogenes*-Isolate aus Lebensmitteln wird neben Typisierungsdaten auch entsprechende epidemiologische Informationen zur Verfügung stellen, die sowohl von Experten der Lebensmittelseite als auch der Humanseite in Europa abgerufen werden können.

Weitere häufig angewendete Genotypisierungsmethoden zeigen im Vergleich zur PFGE derzeit meist eine geringere Differenzierbarkeit von *L. monocytogenes*-Stämmen. Sie bieten jedoch den Vorteil, dass sie im Gegensatz zur PFGE einfacher zu standardisieren und wesentlich schneller und kostengünstiger durchzuführen sind. Sie sind damit gut als Screening-Verfahren geeignet, an die sich gegebenenfalls dann gezielt die PFGE-Analyse anschließen kann.

Zu nennen sind hier z. B. PCR-basierte Typisierungsmethoden wie die MLVA, REP-PCR oder HRM-Analyse. Die Multiple-Locus Variable-Number Tandem-Repeat (VNTR)-Analyse (MLVA) unterscheidet Stämme hierzu anhand der Kombination von Variationen in der Anzahl von Tandem Repeats in verschiedenen Loci im Genom. Je nach Anzahl der Sequenzwiederholung variiert die Größe des entsprechenden PCR-Produktes, welche z.B. über die Kapillar-Elektrophorese sehr akkurat bestimmt werden kann. Derzeit zur Verfügung stehende MLVA-Protokolle für *L. monocytogenes* nutzen oft unterschiedliche Loci, so dass die Typisierungsergebnisse nur in Abhängigkeit der verwendeten Loci vergleichbar sind. Das EU-RL strebt auch hier in Zusammenarbeit mit den Nationalen Referenzlaboren und dem Pasteur-Institut (MLVA-Datenbank: <http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlva/>; Lindsted et al., 2008) eine Harmonisierung des MLVA-Protokolls an.

Eine ebenfalls sehr verlässliche PCR-basierte Typisierungsmethode wurde von Pietzka et al. 2011 publiziert. Dabei wird ein spezifischer Locus des Internalin B-Genes (*inlB*) amplifiziert und im Anschluß einer hochauflösenden Schmelzkurven-Analyse zugeführt (High-Resolution Melting (HRM) curve analysis).

Darüber hinaus geben sequenzbasierte Verfahren die Möglichkeit, Typisierungsergebnisse sehr standardisiert zu erzeugen und diese schnell und verlässlich miteinander zu vergleichen. Die Multilocus-Sequenztypisierung (MLST) beispielsweise weist Stämmen anhand von Sequenzunterschieden in mehreren hochkonservierten Housekeeping-Genen für jedes dieser Gene ein Allel zu, die in Kombination den Sequenztyp eines Stammes bestimmen. Für *L. monocytogenes* steht hierfür auf der Grundlage der Gene *abcZ*, *blgA*, *cat*, *dapE*, *dat*, *ldh*, *lhcA* (Parisi et al., 2010) die MLST-Datenbank des Pasteur-Institutes zur Verfügung (<http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/Lmono.html>).

Da Housekeeping-Gene aufgrund ihrer Bedeutung für grundlegende Stoffwechselprozesse in der Zelle nur geringen genetischen Änderungen unterliegen, kann die MLST zwar genutzt werden, um Stämme phylogenetisch zu vergleichen und zu klassifizieren. Sie ist aber nicht geeignet, sehr nah verwandte Stämme voneinander zu unterscheiden, wie bei der Aufdeckung von Kontaminations- und Infektionswegen notwendig.

Eine sehr vielversprechende Methode hingegen stellt die Sequenzierung des gesamten Genoms eines Stammes dar. Die Genomsequenzierung stellt schon heute ein Hochdurchsatzverfahren dar, welches bei Reduzierung der Kosten die bisher gebräuchlichen Genotypisierungsmethoden weitestgehend ersetzen könnte.

Molekularbiologische Methoden zur Subtypisierung von *L. monocytogenes*-Stämmen geben uns ein wichtiges Werkzeug für Bekämpfungsstrategien in den Lebensmittel verarbeitenden Betrieben in die Hand und helfen in Kombination mit epidemiologischen Daten Kontaminationen vom rohen Lebensmittel bis hin zur Infektion des Menschen aufzudecken und zu ver-

hindern. Eine Schlüsselfunktion nimmt dabei die Harmonisierung der Methoden auf Lebensmittelseite und Humanseite ein. Nur wenn Isolate aus Lebensmitteln, Umgebung und Mensch mit gleichen und standardisierten Verfahren typisiert werden, sind sie miteinander vergleichbar und liefern brauchbare Kenntnisse zur Aufdeckung der Kontaminations- und Infektionswege.

Grundlegende Voraussetzung ist jedoch auch, dass die Stämme nach ihrer Isolation aus dem Lebensmittel oder Umgebung auch tatsächlich der Typisierung zugeführt werden. Das Nationale Referenzlabor für *Listeria monocytogenes* am Bundesinstitut für Risikobewertung stellt hierfür eine nationale Stammdatenbank bereit. Bisher geht jedoch nur ein Bruchteil der in Deutschland im Rahmen der Lebensmittelüberwachung isolierten *L. monocytogenes*-Stämme ein. Gerade im Hinblick auf die Erkennung und Vermeidung von Krankheitsgeschehen und Ausbrüchen reichen diese Daten nicht aus. Es ist deshalb zwingend anzustreben, ähnlich wie in benachbarten Europäischen Staaten alle Isolate einer Stammtypisierung zuzuführen.

## Referenzen

Félix B, Dao TT, Grout J, Lombard B, Asséré A, Brisabois A and Roussel S (2012a): Pulsed-field gel electrophoresis, conventional, and molecular serotyping of *Listeria monocytogenes* from food proficiency testing trials toward an harmonization of subtyping at European level. *Foodborne Pathog Dis* 9 (8), 719-726.

Félix B, Dao TT, Lombard B, Asséré A, Brisabois A and Roussel S (2012b): The Use of Pulsed Field Gel Electrophoresis in *Listeria monocytogenes* Sub-Typing - Harmonization at the European Union Level. In: *Gel Electrophoresis - Principles and Basics*, Sameh Magdeldin (Ed.), ISBN: 978-953-51-0458-2, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/gel-electrophoresis-principles-and-basics/harmonization-of-listeria-monocytogenes-pfge-sub-typing-at-european-union-level>

Graves LM, Swaminathan B (2001): PulseNet standardized protocol for subtyping *Listeria monocytogenes* by macrorestriction and pulsed-field gel electrophoresis. *Int J Food Microbiol* 65 (1-2), 55-62.

Lindstedt BA, Tham W, Danielsson-Tham ML, Vardund T, Helmersson S, Kappernd G (2008): Multiple-locus variable-number tandem-repeats analysis of *Listeria monocytogenes* using multicolour capillary electrophoresis and comparison with pulsed-field gel electrophoresis typing. *J Microbiol Methods* 72 (2), 141-148.

Parisi A, Latorre L, Normanno G, Miccolupo A, Fracalvieri R, Lorusso V, Santagada G (2010): Amplified Fragment Length Polymorphism and Multi-Locus Sequence Typing for high-resolution genotyping of *Listeria monocytogenes* from foods and the environment. *Food Microbiol* 27(1), 101-108.

Pietzka AT, Stöger A, Huhulescu S, Allerberger F, Ruppitsch W (2011): Gene Scanning of an Internalin B Gene Fragment Using High-Resolution Melting Curve Analysis as a Tool for Rapid Typing of *Listeria monocytogenes*. *J Mol Diagn* 13 (1), 57-63.

RKI: Infektionsepidemiologisches Jahrbuch für 2011, Berlin, 2012

## Quantitative Molecularbiological Methods in Food Analytics

Martin Wagner<sup>1,2</sup> and Peter Rossmann<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Institute for Milk Hygiene, -technology and Food Science

<sup>2</sup> Christian-Doppler Laboratory for Molecularbiological Food Analytics, University for Veterinary Medicine, Vienna

Rapid detection and subsequent identification of contaminants in food production has become a major topic since both health risks and financial loss are connected with such events. Risk assessments, however, require quantities of microbial contaminations to obtain the necessary data for sufficient evidence. Moreover time to result plays a key role in analyzing complex matrices. Therefore the prerequisites for state of the art detection methods for microbial contaminants are (1) quantitative detection, (2) sensitive detection limit, (3) non complex and time-saving approaches, (4) cost effectiveness.

### Why should culture-based technology get advanced?

Microbiological testing has been a major subject since the discovery of microbes in the second half of the nineteenth century. Although improvements have been made over the last century, the principles of target cell enrichment, target cell isolation and target cell identification have remained unchanged.

Traditional microbiological methods are limited to cells capable of growing on nutrient-rich media. Many pathogens such as *Campylobacter* or *Mycobacteria* are fastidious in growth. Other pathogens such as foodborne viruses do not grow at all. Although culture-based methods are reliable and widely standardised, they are time consuming and expensive to perform, especially in presumed positive cases where species identification by biochemical profiling is warranted. Enrichments, aside from saving time, share the disadvantage of being inappropriate for microorganisms locked in a non-cultivable state. Some rapid methods have been developed to shorten detection time by the use of chromogenic media, DNA hybridization or enzyme immunoassay. However, these methods still require bacterial target enrichment and are not quantitative.

DNA amplification via the polymerase chain reaction (PCR) amplifies a nucleic acid sequence instead of proliferating a cell and thus leads to specific detection of the target on the basis of species-specific genetic signatures. Further development of DNA based methods has been made and quantitative PCR (qPCR; or real-time PCR) microarrays, on-chip PCR and parallel sequencing in particular have established their applicability as scientific tools. Nevertheless, the advantages of these methods have stipulated new prerequisites. The theoretical or "in vitro" performance of these methods is challenged when environmental (matrix based) influences or sample-dependent interferences come into play.

PCR in particular and molecular biological methods in general are essentially derived from basic research efforts, where these methods have had a long history of applicability. Unfortunately the scientific questions addressed in that field do not extend to the requirements of bio monitoring (e.g. food pathogen detection). For example, in basic research bacteria target numbers are invariably controllable by the researcher, which are simply dependent on the size of his overnight culture. In food pathogen detection the actual contamination of the foodstuff is not predictable. Most of the molecular biological methods used are in *vitro* methods, which work perfectly in a standardised environment, which is practically under perfect laboratory conditions. In food testing, the heterogeneous micro-environment of the sample has to be matched to the requirements of highly sophisticated enzymatic assays. We and others concluded that sample preparation is the crucial link between the sample matrix and the

necessary stable laboratory conditions required by molecular biological methods if those methods should be used directly on food commodities without any enrichment step in between.

Therefore qPCR must be preceded by efficient sample preparation steps and DNA isolation and purification, in order to establish a standard of purity suitable for reliable measurement. The entirety of these processes comprises a detection chain, which is defined by numerous elements connected in a logical sequence.

There are three major aspects to be considered for optimal performance and unique determination of such a system: (i) best possible sample preparation (meaning almost entire access to the microbial cell), (ii) process controls for the crucial steps of the analytical chain and (iii) thorough validation and specification of every step of the protocol, especially of the core detection method *per se*.

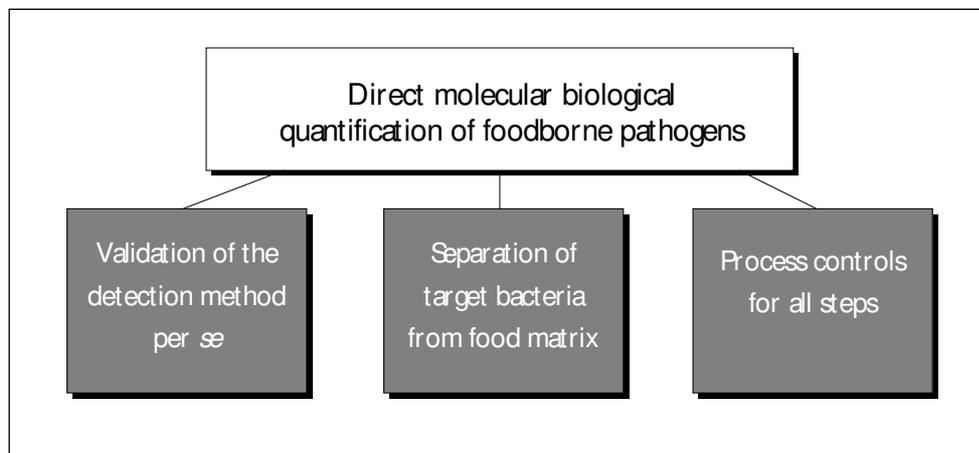


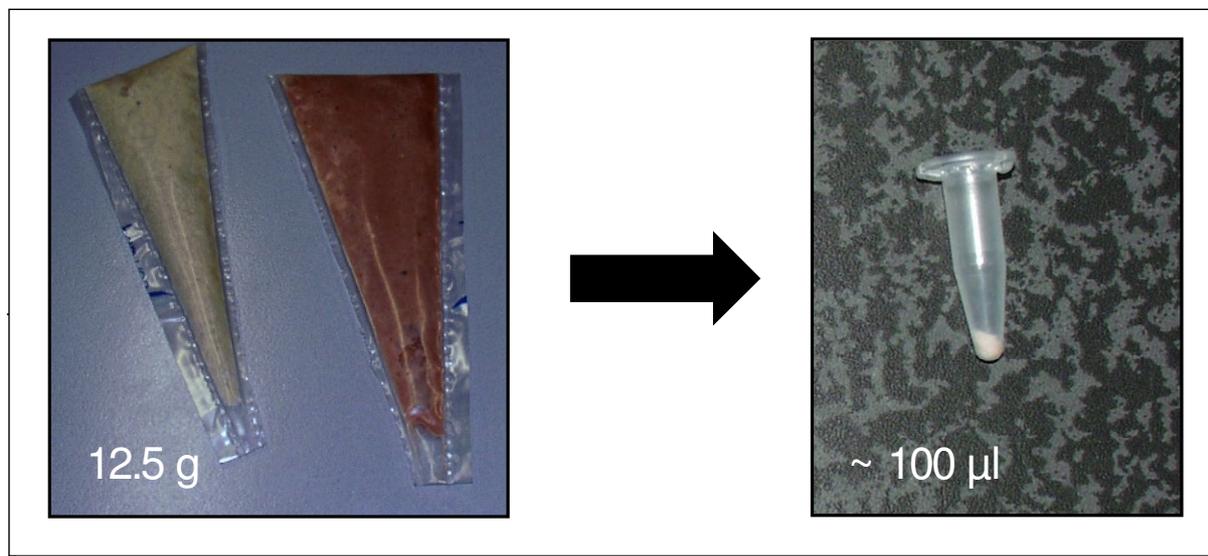
Fig. 1: The analytical triad in culture independent quantification of pathogens

### Sample preparation decides!

As outlined the topic of sample preparation is very crucial in culture-independent quantification and has received increased attention from both academia as well as industry, mirrored by an increase in publications as well as applications of such methods. However, so far the topic remains a challenge as there are manifold prerequisites for a sufficient sample preparation method. Most methods have drawbacks, such as the insufficient size of the processed sample volume, missing calibration standards, lack in reference material etc. (Brehm-Stecher et al. 2009; Rossmannith & Wagner 2010; Rossmannith & Wagner 2011; Stevens & Jaykus 2004).

Based on the requirements for direct qPCR quantification of bacteria in food, a rapid (<5 hours) and inexpensive sample preparation protocol for the separation of Gram-positive organisms from various food matrices and blood was recently developed. This protocol, called "Matrix-Lysis" involves solubilisation of the food matrix followed by concentration of intact bacteria through centrifugation to detect as few as <10 CFU/g target, while free target DNA was eliminated by the protocol by 5 log units (Mayrl et al. 2009; Rossmannith et al. 2007; Aprodu et al. 2011). So far four different buffer systems have been successfully introduced, two of them exclusively for qPCR quantification while the latest two buffer systems, based on a novel chemical substance class called "Ionic liquids" or on  $MgCl_2$ , also allowed for the ap-

plication of microbiological methods after Matrix-Lysis (Mayrl et al. 2009; Mester et al. 2010; Mester et al. 2012; Rossmannith et al. 2007).



**Fig. 2:** The total bacterial community in a vial after matrix lysis of 6.26 g of Mozzarella

Matrix lysis is a concept that can be used on almost all animal food commodities and fulfills the criteria as mentioned in the introduction section: it allows to (1) directly quantify the pathogen without enrichment down to the (2) single cell contamination level, it is (3) rapid (<8 hours of analytical time) and (4) costs a fortune.

## References

- Aprodu, I., Walcher, G., Schelin, J., Hein, I., Norling, B., Radstrom, P., Nicolau, A., Wagner, M. (2011). Advanced sample preparation for the molecular quantification of *Staphylococcus aureus* in artificially and naturally contaminated milk. *Int J Food Microbiol* 145 Suppl 1: S61–65.
- Brehm-Stecher, B., Young, C., Jaykus, L.A., Tortorello, M.L. (2009). Sample Preparation: The Forgotten Beginning. *J Food Prot* 72:1774–1789.
- Mayrl, E., Roeder, B., Mester, P., Wagner, M., Rossmannith, P. (2009). Broad range evaluation of the matrix solubilization (matrix lysis) strategy for direct enumeration of foodborne pathogens by nucleic acids technologies. *J Food Prot* 72 (6): 1225–1233.
- Mester, P., Wagner, M., Rossmannith P. (2010). Use of ionic liquid-based extraction for recovery of *Salmonella* Typhimurium and *Listeria monocytogenes* from food matrices. *J Food Prot* 73: 680–687.
- Mester, P., Wagner, M., Rossmannith, P. (2012). Ionic liquids designed as chaotrope and surfactant for use in protein chemistry. *Sep Pur Technol*, in press.
- Rossmannith, P., Wagner, M. (2010). Sample preparation for the detection of foodborne pathogens by molecular biological methods. In: *Tracing pathogens in the food chain*. Brul, S., Fratamico, P.M., McMeekin, A. (eds.). Woodhead, Cambridge: 237–262.
- Rossmannith, P., Wagner, M. (2011). Aspects of systems theory in the analysis and validation of innovative molecular-biological based food pathogen detection methods. *Trends Food Sci Technol* 22: 61–71.

- Rossmannith, P., Süss, B., Wagner, M., Hein, I. (2007). Development of matrix lysis for concentration of gram positive bacteria from food and blood. *J Microbiol Meth* 69: 504–511.
- Stevens, K.A., Jaykus, L.A. (2004). Bacterial separation and concentration from complex sample matrices: a review. *Crit Rev Microbiol* 30: 7–24.



## **„Community-Ressourcen“ zur effizienten Expositionsabschätzung und Warenstromanalyse in Lebensmittelkrisen**

M. Filter, A.A. Weiser, C. Thöns, A. Falenski, J. Brandt, A. Käsbohrer, B. Appel  
Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin

### **Zusammenfassung**

In Lebensmittelkrisen sind zeitnahe und wissenschaftlich fundierte Risikobewertungen von höchster Relevanz für alle von der Krise betroffenen Parteien. Sie dienen sowohl dem behördlichen als auch dem privatwirtschaftlichen Sektor als Orientierung und können sogar internationale Handelsbeziehungen beeinflussen. Insbesondere die immer stärker globalisierten Warenströme der Lebensmittelindustrie schaffen die Notwendigkeit, neue effiziente Datenerfassungs-, Modellierungs- und Analysesysteme für Krisensituationen zu entwickeln.

In diesem Vortrag werden Softwarelösungen vorgestellt, die vom BfR im Rahmen mehrerer nationaler und internationaler F&E-Projekte aus dem Sicherheitsforschungsbereich entwickelt bzw. weiterentwickelt wurden. Zudem wird am Beispiel von realen Lebensmittelverkaufszahlen aus Deutschland demonstriert, wie derartige Open-Source-Modellierungs- und Datenanalysesoftware die Warenstromanalysen und Expositionsabschätzungen im Krisenfall unterstützen kann. Im Rahmen des Ausblicks werden Überlegungen vorgestellt, wie eine Verstetigung und kontinuierliche Erweiterung derartiger „Community-Ressourcen“ zum Nutzen aller Krisenbeteiligten ermöglicht werden können.

### **1 Einleitung**

Innerhalb der letzten Dekaden haben sich weltweit die ökonomischen Strukturen einschließlich des deutschen Lebensmittelsektors durch die Globalisierung des Handels dramatisch verändert (Wilkinson 2008). Als Konsequenz dieser Entwicklung ist festzustellen, dass die Risiken (gesundheitlich und ökonomisch), die mit natürlichen oder absichtlichen Lebensmittelkontaminationen verbunden sind, erheblich gestiegen sind (Krause und Hendrick 2010). Durch die zunehmend überregionalen Ausbruchsgeschehen, wie z.B. beim EHEC O104:H4-Ausbruch in Deutschland (BfR 2011), wird darüber hinaus im Krisengeschehen zusätzlich erheblicher öffentlicher Druck auf alle am Geschehen beteiligten Parteien erzeugt.

Da die Globalisierungstendenzen fortschreiten werden, entsteht für öffentliche als auch privatwirtschaftliche Organisationen die Notwendigkeit, sich auf zunehmend komplexere Ausbruchssituationen einzustellen. Insbesondere für den behördlichen Bereich ist dies aufgrund der eng begrenzten personellen und finanziellen Ressourcen eine Herausforderung.

Ein möglicher Lösungsansatz, der zudem allen an Lebensmittelkrisen beteiligten Parteien zugute kommt, ist die gemeinschaftliche Entwicklung, Pflege und Nutzung von Open-Source-Softwarelösungen, von denen hier drei Beispiele vorgestellt werden.

### **2 Ergebnisse**

#### **2.1 Open-Source-Software zur Datenintegration und -analyse**

Datenerfassung, -integration und -verarbeitung sind in Lebensmittelkrisen häufig die zeitaufwendigsten Arbeitsschritte, die der eigentlichen Datenanalyse und -exploration vorangehen. Auch wenn kontinuierlich Anstrengungen zur Standardisierung von Datenübermittlungsformaten zwischen den beteiligten behördlichen Einrichtungen unternommen werden, sind mit

den derzeit bestehenden Rahmenbedingungen in Krisensituationen umfangreiche Datenvorverarbeitungs- und Qualitätssicherungsschritte unvermeidbar. Daher ist es sinnvoll, derartige Arbeitsschritte so weit wie möglich zu standardisieren und als jederzeit einsatzbereite validierte Datenverarbeitungs-„Workflows“ der behördlichen „Community“ zur Verfügung zu stellen.

Zur Umsetzung dieser Aufgabe ist in besonderem Maße die Open-Source-Software KNIME (Konstanz Information Miner, [www.knime.org](http://www.knime.org)) (Michael et al. 2006) geeignet, die diesbezüglich vom BfR bereits erfolgreich eingesetzt wird. KNIME bietet darüber hinaus auch die Möglichkeit, durch die „KNIME R Statistics Integration“-Erweiterung „R“-Skripte (R Development Core Team 2008) zur Visualisierung und statistischen Datenanalyse einzubinden.

## **2.2 Open-Source-Software zur Simulation der räumlichen und zeitlichen Ausbreitung von Krankheitserregern**

Die Fähigkeit, die Ausbreitung der Krankheitserreger sowohl über Lebensmittelwarenströme als auch den direkten Kontakt zwischen Populationsmitgliedern (Ansteckung) zu modellieren, ist von erheblicher Bedeutung für die Expositionsabschätzung im Krisengeschehen. So können Simulationsmodelle bei Vorliegen adäquater Daten genutzt werden, um:

- räumliche und zeitliche Expositionsmodelle und valide Ausbruchverlaufsprognosen zu erstellen,
- Produktverteilungsmuster mit Ausbruchsmustern zu vergleichen und so die klassische Ursachenforschung im Ausbruchsfall (i.d.R. durch Waren-Rückverfolgung) zu beschleunigen,
- den Effekt von Management-Optionen (z.B. Schulschließungen) abzuschätzen.

Die Umsetzung dieser Aufgabe kann mithilfe der Open-Source-Software STEM (Spatiotemporal Epidemiological Modeler, <http://www.eclipse.org/stem>) erfolgen, die vom BfR mitentwickelt und bereits erfolgreich auf Eignung getestet wurde. STEM bietet darüber hinaus diverse Möglichkeiten zur Visualisierung von Warenströmen und kann dank seiner modularen Struktur schnell an spezifische Erregereigenschaften und Warenketten angepasst werden.

## **2.3 Open-Source-Software zur prädiktiven mikrobiellen Modellierung**

Im Falle mikrobieller oder viraler Lebensmittelkontaminationen ist eine modellbasierte Abschätzung der Vermehrung/Inaktivierung von Kontaminanten auf allen Stufen der Produktherstellung, -verbreitung und -zubereitung vorzunehmen. Dies ist insbesondere dann möglich, wenn die zu betrachtenden Lebensmittelverarbeitungsprozesse und Erreger bereits im Vorfeld in experimentellen Versuchen untersucht und auf Basis der gewonnenen experimentellen Daten sogenannte prädiktive mikrobielle Modelle (PMM) erstellt wurden.

Die Umsetzung dieser mathematischen Modellierungsaufgabe kann mithilfe der am BfR entwickelten Open-Source-Software PMM-Lab (<http://sourceforge.net/projects/pmmlab/>) erfolgen. PMM-Lab ist eine Erweiterung zu KNIME und bietet auch die Möglichkeit, erstellte Modelle in einer integrierten Datenbank zu speichern und mit anderen Einrichtungen auszutauschen.

### 3 Ausblick

Im Rahmen dieses Vortrags wurden mehrere Open-Source-Softwareressourcen vorgestellt, die für effiziente Expositionsabschätzungen und Warenstromanalysen in Lebensmittelkrisen von erheblichem Nutzen sind. Für den erfolgreichen Einsatz ist es jedoch notwendig, organisatorische Strukturen aufzubauen, die eine langfristige Pflege, Weiterentwicklung, Verbreitung und Endnutzerschulung der behördlichen und privatwirtschaftlichen Krisenbeteiligten gewährleisten können. Diesbezüglich könnte ein durch ein Public-Private-Partnership- (PPP-)Modell getragenes „Kompetenzzentrum Warenstromanalyse“ eine zielführende Handlungsoption darstellen.

**Danksagung:** Diese Arbeit wurde durch Projektförderung des BMBF (13N11202) ermöglicht.

### Referenzen

- BfR (2011). <http://www.bfr.bund.de/cm/350/ehec-ausbruch-2011-aufklaerung-des-ausbruchs-entlang-der-lebensmittelkette.pdf>.
- Krause, D. O. Hendrick, S. (2010). Zoonotic pathogens in the food chain. CABI, Wallingford.
- M.R. Berthold., N Cebron, F.Dill, G. di Fatta., T.R. Gabriel, F. Georg, T. Meini, P. Ohi, C.Sieb, B, Wiswedel (2006). Knime: The Konstanz Information Miner. <http://www.knime.org>.
- R Development Core Team (2008). R: A language and environment for statistical computing. <http://www.r-project.org>.
- Wilkinson, J. (2008). The Food Processing Industry, Globalization and Developing Countries. In: The Transformation of Agri-Food Systems: Globalization, Supply Chains and Smallholder Farmers. Food & Agriculture Org., New York: 87–108.



## **Einfluss der Lagertemperatur auf das Wachstumsverhalten von *Salmonella* Enteritidis in Hühnereiern**

A. Johne, S. Groß, J. Adolphs, H. Sharp, M. Greiner, K. Stingl, A. Käsbohrer, J. Bräunig, B. Appel  
Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin

Die Salmonellose zählt zu den häufigsten lebensmittelbedingten Erkrankungen des Menschen, die vor allem bei Säuglingen, Kleinkindern, älteren Menschen und immungeschwächten Personen mit einem sehr schweren Verlauf einhergehen kann. Bei dieser empfindlichen Personengruppe kann bereits eine sehr geringe Infektionsdosis (< 100 Keime) zur Manifestation einer schweren Erkrankung, vereinzelt mit Todesfolge, führen. Bei gesunden Erwachsenen hingegen ruft erst eine hohe Infektionsdosis von  $10^4$  bis  $10^6$  Keimen klinische Erscheinungen hervor und die Erkrankung ist in der Regel selbstlimitierend.

Die Zahl der gemeldeten Salmonellosefälle in Deutschland ist zwar noch beträchtlich hoch (zweithäufigste Zoonose), hat sich aber in den letzten Jahren deutlich verringert (Robert Koch-Institut 2012).

Als häufige Infektionsquelle wurden Konsumeier und roheihaltige Produkte identifiziert. Trotz des tendenziell steigenden Pro-Kopf-Verbrauchs an Eiern weist jedoch die Salmonellose in Deutschland eine deutlich sinkende Tendenz auf. Dies kann auf abnehmende Prävalenzahlen von Salmonellen in den Legebetrieben (1,9% in 2009; 0,6% in 2010 [Hartung und Käsbohrer 2012]) durch entsprechende Bekämpfungsmaßnahmen und folglich auf sinkende Prävalenzen in den Eiern zurückzuführen sein. Aber auch eine verbesserte Verbraucheraufklärung bezüglich der Gefahr, die von möglichen kontaminierten Eiern ausgehen kann, könnte zur Senkung der Salmonellose rate beigetragen haben.

Eine Kühlung von Konsumeiern wird als effektive Maßnahme betrachtet, das Wachstum von pathogenen Erregern wie *Salmonella* spp. zu limitieren (EFSA 2004). In der EU ist die Kühlung von Eiern nicht einheitlich geregelt. Nach VO (EG) Nr. 853/2004 müssen Eier bis zur Abgabe an den Endverbraucher bei einer – vorzugsweise konstanten – Temperatur aufbewahrt und befördert werden, die die hygienische Beschaffenheit am besten gewährleistet. In Deutschland wird derzeit vom Gesetzgeber ab dem 18. Tag nach dem Legen eine Kühlung von Eiern bei 5–8 °C vorgeschrieben.

Das BfR hat geprüft, ob die derzeitige Verpflichtung zur Kühlung von Eiern als Maßnahme einzuschätzen ist, die das Wachstum von Salmonellen im Ei vermindern kann. Hierbei wurden Erkenntnisse aus Sachverständigengesprächen und Literaturangaben sowie Erkenntnisse aus Simulationsergebnissen eines mathematischen Modells unter Berücksichtigung von Daten aus der Literatur und aus eigenen Studien miteinbezogen.

Beim Vergleich verschiedener Kühlenszenarien bezüglich des Wachstums von Salmonellen im Ei erweist sich eine durchgehende Kühlung als wachstumshemmende Maßnahme jedoch als am effektivsten. Dies steht im Konsens zu internationalen Expertenmeinungen, wonach die Kühlung als Methode der Wahl zur Einschränkung der Vermehrung von Salmonellen betrachtet wird; vorausgesetzt sie beginnt bereits im Legebetrieb und die Kühlkette wird strikt eingehalten (EFSA 2007). Wird hingegen die Kühlung nicht konsequent eingehalten, so sind Kondensationen außen auf der Eischale möglich, welche wiederum die Überlebensfähigkeit von Salmonellen, die der Schale anhaften, erhöhen.

Das Ergebnis einer Modellierung, die zu dieser Thematik am BfR erarbeitet wurde, belegt gleichermaßen, dass eine Kühlung von Eiern einen deutlich hemmenden Effekt auf das Wachstum von *Salmonella* Enteritidis im Eiinneren ausübt. Voraussetzung hierfür ist jedoch

ebenfalls, dass die Kühlung bereits frühzeitig beginnt und bis zur Abgabe an den Verbraucher nicht unterbrochen wird. Bei dem Modell des BfR wurde das Wachstum von Salmonellen im Ei unter verschiedenen Temperatur- und Zeitbedingungen entlang der Lebensmittelkette vom Legebetrieb bis hin zum Supermarktregal vor Abgabe an den Verbraucher simuliert (Kühlung bei 4–6 °C, 8–12 °C und ungekühlt). Das Wachstum von Salmonellen auf der Eischale wurde in dem Modell nicht berücksichtigt. Eine der Modellannahmen war, dass bei allen Simulationen jedes Ei mit mindestens einer Salmonellenzelle im Eiinneren kontaminiert war. Hier konnte festgestellt werden, dass eine konsequent durchgehende Kühlung das Wachstum von Salmonellen deutlich hemmt. Gleichzeitig wurde aber ermittelt, dass das Wachstum von Salmonellen im Ei bei insgesamt ungekühlter Lagerung relativ gering ist (bei 89 von 50.000 kontaminierten Eiern war ein Wachstum zu verzeichnen; 0,16 %). Eine alleinige Kühlung im Supermarktregal, ähnlich wie es derzeit vom Gesetzgeber vorgeschrieben wird, hatte im Vergleich zu den anderen Szenarien des Modells den geringsten hemmenden Effekt auf das Wachstum von Salmonellen im Ei.

## Referenzen

- EFSA, (2005): Opinion of the Scientific Panel on biological hazards (BIOHAZ) related to the Microbiological risks on washing of Table Eggs. *The EFSA Journal* (2005) 269:1-39.
- EFSA, (2007): The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents, Antimicrobial resistance and Foodborne outbreaks in the European Union in 2006. *The EFSA Journal* (2007) 130: 2-352.
- Hartung, M. und Käsbohrer, A. (2012): Erreger von Zoonosen in Deutschland im Jahr 2010. *BfR-Wissenschaft* 06/2012.
- Robert Koch- Institut (RKI) (2012): Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2011., Berlin, 2012:165-169.
- Tierische Lebensmittel-Hygieneverordnung - Tier-LMHV (2007): Verordnung über Anforderungen an die Hygiene beim Herstellen, Behandeln und Inverkehrbringen von bestimmten Lebensmitteln tierischen Ursprungs. Vom 8. August 2007 (BGBl. I S. 1816, 1828), zuletzt geändert durch Artikel 1 der Verordnung vom 10. November 2011, BGBl. I S. 2233.
- Verordnung (EG), (2004): Verordnung (EG) Nr. 853/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 29. April 2004 mit spezifischen Hygienevorschriften für Lebensmittel tierischen Ursprungs. *Amtsblatt der Europäischen Union* L 139/55.

**Wer ist schuld? Source Attribution für humane Salmonellosefälle in Deutschland**

L. Valentin, H. Sharp, A. Käsbohrer  
Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin

Salmonellosen gehören noch immer zu den am häufigsten und am weitesten verbreiteten Erkrankungen über die Nahrungsmittelkette, obwohl humane Infektionen mit Salmonellen in den letzten 10 Jahren bereits um ein Drittel auf 24.500 Fälle im Jahr 2011 gesenkt werden konnten. Als Teil des deutschen RESET-Projektes sollen die Anteile an humanen Salmonellosen, die vermutlich durch die verschiedenen Tierarten bzw. Lebensmittel hieraus verursacht wurden, anhand eines mathematischen Modells untersucht werden. Basis hierfür ist ein Modell von Hald et al. (2004). In diesem Ansatz wurden die Subtypen von Isolaten aus verschiedenen Quellen (z.B. Tierarten, Lebensmittel) mit der Verteilung der gleichen Subtypen beim Menschen verglichen. Die Anzahl der sporadischen humanen Infektionen, ausgelöst durch verschiedene Sero- und Phagentypen, wird als Funktion dieser Typen in tierischen Quellen verrechnet und mit der Verzehrsmenge der Quelle gewichtet. Das Modell schätzt so den Beitrag der einzelnen Quellen an den humanen Salmonellosefällen. Die Ergebnisse dieser Modelle können dazu beitragen, zielgerichtet Interventionsstrategien gegen Salmonellen bei den einzelnen Quellen zu entwickeln und bereits vorhandene auf ihre Effektivität hin zu prüfen.

Um für Deutschland die wichtigsten Quellen der humanen Salmonellose zu identifizieren, wurde das Modell an die deutschen Daten angepasst und anschließend mit aktuellen Datensätzen aus den nationalen Monitoringprogrammen gerechnet. Die Ergebnisse des Modells werden präsentiert und diskutiert, sowie in den europäischen Kontext gestellt.



## Kupfer- und Zinkresistenz in *Salmonella*-Isolaten vom Schwein und Schweinefleisch

Janine Beutlich, Katharina Thomas, Istvan Szabo, Beatriz Guerra, Annemarie Käsbohrer, Andreas Schroeter  
Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin

Die Spurenelemente Kupfer und Zink spielen eine wichtige Rolle im Stoffwechsel aller Organismen. Als essentielle Enzym-Kofaktoren oder bei der Aufrechterhaltung des osmotischen Druckes der Zellen sind sie wichtige Wachstumsfaktoren sowohl beim Tier als auch bei den Mikroorganismen. Zudem ist bekannt, dass beide Schwermetalle als Futterzusatz in adäquaten Dosen zur besseren Futtermittelverwertung und zu erhöhter täglicher Gewichtszunahme gerade bei der Mast von Schweinen und Geflügel führen. Die gesetzlich zugelassenen Konzentrationen in Futtermitteln regelt die EG-Verordnung 1334/2003. Aus der Literatur ist bekannt, dass dieser Einsatz die Resistenzbildung, wie zum Beispiel den Erwerb von Resistenzgenen bei Mikroorganismen, begünstigt. Für die Zelle ist demnach ein effektives System der Selbstregulation des Kupfer- bzw. Zinkgehaltes (Homöostase) lebensnotwendig. Auch die Koselektion von Antibiotikaresistenzen durch den Einsatz von Kupferverbindungen ist bereits beschrieben worden. Für Deutschland liegen bisher kaum belastbare Daten einer Kupfer- und /oder Zinkresistenz bei *Salmonella*-Isolaten vom Schwein und Schweinefleisch vor.

Basierend auf diesem Hintergrund wurden eine Studie zur Empfindlichkeit von porcinen *Salmonella*-Isolaten gegenüber Kupfer und Zink initiiert. Dazu wurden aus der Stammsammlung des Nationalen Referenzlabors für Salmonellen (NRL-Salm) insgesamt 456 Isolate ausgewählt, die aus folgenden Projekten stammten:

EU-Mastschweine studie 2006/07 (120 Isolate); EU-Zuchtschweine studie 2008 (50 Isolate); Diagnostik des NRL-Salm in 2010 (147 Isolate vom Schwein, 68 Isolate vom Schweinefleisch und 71 Isolate vom Hackfleisch).

Kriterien für die Auswahl der Isolate war die Berücksichtigung von Isolaten aus allen Bundesländern, allen nachgewiesenen *Salmonella*-Serovaren und deren bereits vorhandenen Resistenzprofilen.

Die Empfindlichkeit gegenüber Kupfer und Zink wurde im Agardilutionsverfahren nach Cavaco (Technical University of Denmark [DTU], pers. Mitteilung) für jeweils neun bzw. acht verschiedene Konzentrationen (Kupfersulfat 1–28 mM und Zinkchlorid 0,25–16 mM) ermittelt. Zwei *Salmonella*-Stämme (72-21803-1 und 72-21804-1) bzw. zwei *Staphylococcus aureus*-Stämme (21441-9B und 76-11995-1) wurden als Referenzstämme verwendet, die uns freundlicherweise von Hasman (DTU) zur Verfügung gestellt wurden. Im Gegensatz zu den Antibiotika gibt es für die Schwermetalle bisher keine allgemeingültigen Bewertungskriterien bezüglich einer Resistenz und die dafür zu testenden Konzentrationen der Schwermetalle. Deshalb wurde auf den Bewertungsmaßstab nach Cavaco et al. (2011)<sup>7</sup> zurückgegriffen, nach dem alle Isolate mit MHK-Werten von > 12 mM für Kupfersulfat und > 2 mM für Zinkchlorid als resistent betrachtet werden.

Insgesamt waren 98,7 % der Isolate resistent gegenüber Kupfersulfat, wovon 97,8 % MHK-Werte von  $\geq 20$  mM aufwiesen. Der Anteil resistenter Isolate beim Tier (Zuchtschwein, Mastschwein und Diagnostik Schwein) und aus den Lebensmitteln Schweinefleisch und Hackfleisch war mit 96,9 % bzw. 100 % nur geringfügig unterschiedlich. Die Isolate der EU-Zuchtschweine studie sind, wie die der untersuchten Lebensmittel, alle resistent, gefolgt von denen der EU-Mastschweine studie mit 98,4 % und den Schweineisolaten aus der Diagnostik

<sup>7</sup> Cavaco et al. (2011). Vet Microbiol 150: 344-348.

mit 94,5 %. Die Isolate der Zuchtschweine wiesen mit 42 % auch den höchsten Anteil von Isolaten mit einem MHK-Wert von 24 mM auf.

Gegenüber Zink waren die Isolate zu einem geringeren Anteil (60,0 %) resistent und wiesen MHK-Werte zwischen 4 bis 8 mM auf. Das spiegelte sich auch in der Prävalenz der Resistenz bei den Isolaten vom Tier (57,6 %) und den untersuchten Lebensmitteln (65,5 %) wider. Beim Vergleich beider Herkunftsarten ergibt sich aber für die Einzelherkünfte ein heterogenes Bild. Während der Anteil resistenter Isolate vom Tier bei Zuchtschweinen (2008) mit 84,0 % am höchsten war, lag er bei den Isolaten vom Schweinen (Diagnostik 2010) mit 67,8 % bzw. bei den Mastschweinen (2006/07) nur bei 34,2 %. Dagegen war er in Lebensmitteln, hier Fleisch vom Schwein (Diagnostik 2010), mit 97,1 % am höchsten und bei Hackfleisch (Diagnostik 2010) mit 35,2 % signifikant niedriger. Interessant ist der prozentuale Anteil von Isolaten mit einem MHK-Wert von 8 mM. Dabei wiesen die Isolate von Zuchtschweinen mit 52,0 % bzw. von Fleisch vom Schwein aus der Diagnostik mit 85,3 % die höchsten Werte auf, während sich die Isolate der anderen Herkünfte zwischen 5,6 % (Hackfleisch) und 17,1 % (Schwein Diagnostik 2010) bewegten.

Für den weiterführenden Nachweis von Kupfer- und Zinkresistenzgenen wurden 124 Isolate (EU-Mastschweine studie 2006/07: 30 Isolate; EU-Zuchtschweine studie 2008: 27 Isolate; Diagnostik: 29 Isolate vom Schwein, 16 Isolate von Hackfleisch und 22 Isolate von Schweinefleisch) ausgewählt, die kryokonserviert und deren MHK-Wert nochmals bestimmt wurde. Aus einer erstellten Primerliste zum Nachweis von Kupfer- und Zinkresistenzgenen (eigenes Primerdesign 26 und sieben aus der Literatur) wurden 18 ausgewählt, womit zehn Kupferresistenzgene, fünf Zinkresistenzgene und drei allgemeine Gene für den Kupfer- und Zinkstoffwechsel nachgewiesen werden konnten.

Die Gene *copA*, *copR*, *cueO*, *cuiD*, *cutF*, die für eine Kupferresistenz kodieren, und *zitB*, *zntA*, *zntB*, die für eine Zinkresistenz kodieren, sowie *cadA* als allgemeines Gen für den Kupfer- und Zinkstoffwechsel wurden in allen Isolaten nachgewiesen. Die Kupferresistenzgene *pcoA* (24,2 %), *pcoR* (25,0 %) und *pcoE* (23,4 %) konnten nur in einem Teil der Isolate nachgewiesen werden. Dagegen war das für ein Kationeneffluxsystem notwendige *cusA*-Gen bei 81,4 % der Isolate nachweisbar. Das für eine Cadmium-/Zinkresistenz kodierende Gen *czrC* war nur bei einem Isolat vorhanden, das einen MHK-Wert für Zink von 8 mM aufwies.

In keinem der Isolate waren die Kupferresistenzgene *copB*, *trcB*, die bisher auch noch nicht bei Salmonellen nachgewiesen wurden, und das Zinkresistenzgen *czcA* sowie das für den Kupfer-/Zinkstoffwechsel notwendige Gen *sodCIII* nachweisbar.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass der Anteil kupferresistenter Isolate höher war (98,7 %) als der gegenüber Zink (60,0 %), wenn man einen Bewertungsmaßstab für die Resistenz von >12 mM bei Kupfersulfat und >2 mM bei Zinkchlorid zugrunde legt. Die bisher nachgewiesenen Resistenzgene für beide Substanzen stützen diese Ergebnisse.

## Hoch Ciprofloxacin-resistente *S. Kentucky*-Isolate bei Tier und Mensch

Janine Beutlich<sup>1</sup>, Beatriz Guerra<sup>1</sup>, Andreas Schroeter<sup>1</sup>, M. Arvand<sup>2</sup>, Istvan Szabo<sup>1</sup>, Reiner Helmuth<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin

<sup>2</sup>Hessisches Landesprüfungs- und Untersuchungsamt im Gesundheitswesen, Zentrum für Gesundheitsschutz, Dillenburg

### Einleitung

*Salmonella*-Isolate mit Resistenzen gegen mehrere antimikrobiell wirksame Substanzen (Multiresistenz) stellen ein zunehmendes Gesundheitsrisiko für den Menschen dar, da sie immer häufiger Ursache humaner Einzelerkrankungen und Ausbrüche sind (Alcaine et al. 2007). Insbesondere Lebensmittel-produzierende Tiere werden dabei als Reservoir für nicht-typhöse, multiresistente Salmonellen identifiziert. Diese pathogenen Erreger werden hauptsächlich durch den Verzehr kontaminierter Lebensmittel übertragen (Cray et al. 2000; Pires et al. 2009). Multiresistenzen, insbesondere Resistenz gegen Ciprofloxacin, können eine Behandlung mit Fluorchinolonen oder  $\beta$ -Laktam-Antibiotika bei schwerem bzw. systemischem Verlauf der Erkrankung oder bei Patienten mit besonderer Disposition unwirksam machen (Anonym 2007). In der EU wurde das Auftreten des Serovars *S. Kentucky* beim Menschen bisher nur selten beobachtet und trat normalerweise in Verbindung mit Auslandsreisen auf (Weill et al. 2006; Collard et al. 2007). Nach Angaben von European Food Safety Authority (EFSA) und European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) stand *S. Kentucky* im Jahr 2009 erstmals an achter Stelle der häufigsten Ursachen humaner Salmonellosen (European Food Safety Authority und European Centre for Disease Prevention and Control 2011). Insgesamt wurden in Deutschland zwischen 2001 und 2011 insgesamt 554.122 Salmonellose-Fälle an das Robert Koch-Institut übermittelt, davon wurden 880 (0,16 %) von *S. Kentucky* verursacht (<http://www3.rki.de/SurvStat>, Datenstand: 19.09.2012). Nationale *Salmonella*-Überwachungssysteme in Frankreich, England, Wales, Dänemark und den USA registrierten in den vergangenen Jahren ein vermehrtes Auftreten multiresistenter *S. Kentucky* mit erhöhter Resistenz gegenüber Ciprofloxacin (MHK  $\geq 4$   $\mu\text{g/ml}$ ) (Le Hello et al. 2011). Diese Isolate wurden dem Ciprofloxacin-resistenten *S. Kentucky*-Klon ST198 zugeordnet, der in den oben genannten Ländern zwischen 2000 und 2008 für etwa 500 Fälle von Humaninfektionen verantwortlich war und der vermutlich durch Geflügel übertragen wurde (Le Hello et al. 2011). Da diese ernstzunehmende Entwicklung erhöhter Aufmerksamkeit bedarf, führte das Nationale Referenzlabor für Salmonellen (NRL-Salm) eine Studie innerhalb der laboreignen Stammsammlung durch, um zu ermitteln, ob Ciprofloxacin-resistente *S. Kentucky*-Isolate bereits auch in Deutschland vorkommen und ob sie mit bestimmten Lebensmitteln assoziiert sind.

### Material und Methoden

Für diese Studie wurden aus den Einsendungen des NRL-Salm hoch Ciprofloxacin-resistente (MHK  $\geq 4$  mg/l) *S. Kentucky*-Isolate deutscher Herkunft (insgesamt 15 Isolate) ausgewählt. Sieben *S. Kentucky* stammten aus Putenfleisch aus Baden-Württemberg (1 Isolat), Nordrhein-Westfalen (4), Sachsen (1) und Sachsen-Anhalt (1), zwei Isolate von Putenhaut aus Mecklenburg-Vorpommern (1) und Niedersachsen (1), zwei Isolate aus nicht spezifizierten Fleisch- bzw. Hackfleischproben aus Berlin (1) und Mecklenburg-Vorpommern (1), ein Isolat aus Hühnerfleisch aus Niedersachsen, ein Isolat aus Reptilienorganen aus Bayern, ein Isolat aus einer unspezifizierten Bakterienkultur aus Niedersachsen und ein Isolat aus einer Putenkotprobe (ohne Herkunftsangabe). Alle Stämme wurden zwischen März 2010 und Juli 2011 isoliert. Außerdem wurde ein hoch Ciprofloxacin-resistentes (MHK  $\geq 8$  mg/l) Humanisolat untersucht, das am NRL-Salm zur molekularen Analyse vom Hessischen Landesprüfungs- und Untersu-

chungsamt im Gesundheitswesen (Dillenburg) eingesandt wurde. Als Vergleichsgruppe wurden zusätzlich sieben sensible *S. Kentucky*-Isolate unterschiedlicher Herkunft der Jahre 2004 bis 2011 aus der NRL-Salm-Stammsammlung in die Studie mit einbezogen. Alle Isolate wurden in der Routinediagnostik des NRL-Salm einer phänotypischen Typisierung unterzogen. Die Serotypisierung erfolgte mittels Objektträgeragglutination nach den Vorgaben des White-Kauffmann-Le-Minor-Schemas (Grimont und Weill 2007) und die Empfindlichkeitsprüfung gegenüber verschiedenen antimikrobiellen Substanzen mittels Bestimmung der Minimalen Hemmkonzentration (MHK) nach Vorgaben des Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (Clinical and Laboratory Standards Institute 2009). In den Jahren 2000 bis 2007 wurde das Plattenformat NLMV1A mit 17 antimikrobiellen Substanzen eingesetzt. Ab 2008 wurde das europäische Plattenformat EUMVS mit 14 antimikrobiellen Substanzen verwendet (Bundesinstitut für Risikobewertung 2010). Die Bewertung der Ergebnisse erfolgte auf Grundlage der in der Entscheidung (EG) 2007/407 festgelegten Grenzwerte, die wiederum auf den vom European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing 2001; [www.eucast.org](http://www.eucast.org)) festgelegten Grenzwerten und/oder epidemiologischen Cut-Off-Werten (ECOFFs) beruhen. Im Rahmen der molekularbiologischen Untersuchungen wurden die Fluorchinolon-Targets kodierenden Gene *gyrA* und *parC* mittels PCR amplifiziert und anschließend bei der Firma Qiagen (Hilden) sequenziert. Ebenfalls mittels PCR-Amplifikationen erfolgte der Nachweis der chromosomalen Resistenzregion *Salmonella* Genomic Island 1 (SGI1) (Amar et al. 2008). Entsprechend ihres Resistenzphänotypen wurden alle Isolate mittels PCR auf 30 verschiedene Resistenzgene sowie Klasse-1-Integrone getestet (Beutlich et al. 2011). Die genomische DNA aller 23 *S. Kentucky*-Isolate wurde nach den Vorgaben des standardisierten PulseNet-Protokolls (<http://www.pulsenet-europe.org>) einer Makrorestriktionsanalyse mit der XbaI-Endonuklease unterzogen. Außerdem erfolgten Southern Blots/Hybridisierungen der XbaI-PFGE-Gele mit einer Sonde für das SGI1-lokalisierte Gen *aac(3)-Ie* sowie Multilocus-Sequenztypisierung nach Kidgell et al. (2002) und dem MLST-Protokoll für *Salmonella enterica* der MLST Database des University College Cork, Irland ([http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Senterica/documents/primersEnterica\\_html](http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Senterica/documents/primersEnterica_html)).

## Ergebnisse und Diskussion

Zwischen 1998 und 2012 (Stand: 24.09.2012) identifizierte das NRL-Salm unter all seinen Einsendungen (N = 67.953) insgesamt 176 *S. Kentucky*-Isolate, davon 122 aus Deutschland. Unter allen Einsendungen entweder aus dem Nutztier- oder Lebensmittelbereich wiesen 62 (35,2 %) Isolate Resistenzen gegen zwei oder mehr antimikrobielle Substanzen auf. Von den deutschen Isolaten wurden 40 (32,8 %) als multiresistent getestet, wobei die meisten aus Geflügelproben isoliert wurden. Insgesamt wiesen 25 der insgesamt 122 deutschen *S. Kentucky*-Isolate (20,5 %) einen MHK-Wert von mehr als 8 mg/l gegenüber Ciprofloxacin auf und gelten folglich sowohl nach EUCAST (clinical breakpoint MHK > 1 mg/l; ECOFF  $\geq$  0,064) als auch nach CLSI-Richtlinien (MHK  $\geq$  4 mg/l) als hoch resistent (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing 2011; Clinical and Laboratory Standards Institute 2008).

In den 15 im Rahmen dieser Studie untersuchten Isolate wurden neben der hohen Chinolon- (NAL, MHK > 64 mg/l) bzw. Fluorchinolon-Resistenz (CIP, MHK  $\geq$  8 mg/l) zusätzliche Resistenzen beobachtet. Das häufigste Resistenzmuster enthielt Resistenzen gegen Ampicillin, Gentamicin, Streptomycin, Tetracyclin und Sulfamethoxazol und wurde in 13 der insgesamt 15 Isolate nachgewiesen. Das Humanisolat trug diese Multiresistenz ebenfalls. Die Sequenzanalyse identifizierte als genetische Grundlage für die Ciprofloxacin-Resistenz in allen Isolaten Mutationen in den Genen *gyrA* und *parC*: eine Doppelmutation in *gyrA* (Serin83 und Asparagin87) mit einem Aminosäurewechsel im Codon Ser83 zu Phenylalanin (Phe) und im Codon Asp87 zu Tyrosin (Tyr) sowie eine Punktmutation in *parC* (Ser80) mit einem Wechsel zu Isoleucin (Ile). Die Untersuchungen auf eine mögliche Insertion der Multiresistenz übertragenden Region SGI1 zeigten für alle 16 Ciprofloxacin-resistenten Isolate ein positives Ergebnis, wobei 14 der Isolate die typischen Charakteristika der Variante SGI1-K und zwei die

Eigenschaften der Variante SGI1-P zeigten. Alle Isolate wurden einer Feintypisierung mittels MLST und PFGE zur Ermittlung ihrer genetischen Verwandtschaft unterzogen. Die MLST-Analyse zeigte, dass alle Isolate unabhängig ihrer Herkunft und Isolationsmatrix ausnahmslos dem Sequenztyp (ST) 198 angehörten. Die PFGE-Untersuchung generierte für alle Ciprofloxacin-resistenten Isolate insgesamt zehn eng verwandte Profile. Die sieben sensiblen Isolate zeigten von der klonalen Gruppe abweichende PFGE-Muster.

Verschiedene europäische Länder verzeichneten in den letzten Jahren ein Anstieg humaner Salmonellose-Fälle, die von dem hoch Ciprofloxacin-multiresistenten *S. Kentucky*-Klon ST198-X1 verursacht wurden. Die ersten Infektionen wurden zwischen 2002 und 2005 als in Ägypten erworben identifiziert, doch die geographische Verbreitung des Klons hat mittlerweile stark zugenommen. In Europa traten diese Humaninfektionen nach bisherigem Kenntnisstand nur reiseassoziiert auf, aber auch andere Infektionswege, wie z.B. der Verzehr kontaminierter importierter Lebensmittel, wären denkbar (Le Hello et al. 2011).

In der hier vorgestellten Studie beschreiben wir das seit 2010 ebenfalls in Deutschland verstärkte Auftreten von hoch Ciprofloxacin-resistenten *S. Kentucky*-Isolaten, die vorrangig aus in Deutschland gehandeltem Putenfleisch isoliert werden konnten. Die molekularbiologische Analyse zeigte, dass alle Ciprofloxacin-resistenten Isolate zu dem von Le Hello et al. (2011) beschriebenen ST198-X1, SGI1 positiven *S. Kentucky*-Klon gehörten. Diese Ergebnisse zeigen, dass vom Geflügel stammende Lebensmittel, insbesondere Putenfleisch, wichtige Überträger der Infektion mit diesem Klon sein können. In deutschen Putenmastbetrieben wurde *S. Kentucky* unserer Kenntnis nach bis vor Kurzem noch nicht isoliert (Friedrich et al. 2011). Das in diese Studie integrierte aus Putenkot stammende Isolat ist das erste und bisher auch einzige in der Datenbank des NRL-Salm erfasste Ciprofloxacin-resistente *S. Kentucky*-Isolat, das direkt beim Tier nachgewiesen wurde. Das Auftreten des hoch Ciprofloxacin-resistenten Klons ST198-X1 in Deutschland könnte vermutlich eine Folge des Imports kontaminierter Lebensmittel sein. Beim Menschen wurde der Klon ST198 in Deutschland erstmalig im August 2011 aus der Stuhlprobe eines an akuter Gastroenteritis erkrankten Patienten aus Bayern nachgewiesen. Der Patient hatte keine Reiseanamnese in den letzten vier Wochen vor der Erkrankung, sodass davon auszugehen ist, dass die Infektion in Deutschland erworben wurde. Dieser Befund lässt vermuten, dass sich dieser Klon auch in Deutschland als Erreger menschlicher Infektionen etablieren könnte. Da die WHO die Fluorchinolone als Wirkstoffe mit besonderer Bedeutung für die Human- und Veterinärmedizin ansieht (World Health Organization 2001) und sie nach wie vor Mittel der Wahl bei der klinischen Behandlung systemischer *Salmonella*-Infektionen sind (Anonym 2007; Helmuth und Hensel 2004), bedarf diese Entwicklung erhöhter Aufmerksamkeit. Außerdem erscheint die Implementierung geeigneter Überwachungssysteme zur Erfassung empfehlenswert.

## Referenzen

- Alcaine, S.D., Warnick, L.D., Wiedmann, M. (2007). Antimicrobial resistance in nontyphoidal *Salmonella*. *J Food Prot* 70: 780–790.
- Amar, C.F.L., Arnold, C., Bankier, A., Dear, P.H., Guerra, B., Hopkins, K.L., Liebana, E., Mevius, D.J., Threlfall, E.J. (2008). Real-time PCRs and fingerprinting assays for the detection and characterization of *Salmonella* Genomic Island-1 encoding multidrug resistance: application to 445 European isolates of *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Shigella*, and *Proteus*. *Microb Drug Resist* 14: 79–92.
- Anonym (2007). Joint FAO/WHO/OIE Expert Meeting on Critically Important Antimicrobials. Report of a meeting held in Rome, Italy, 26 to 30 November 2007. Food and Agriculture Organization of the United Nations Headquarters, Rome, Italy.
- Beutlich, J., Jahn, S., Malorny, B., Hauser, E., Hühn, S., Schroeter, A., Rodicio, M.R., Appel, B., Threlfall, J., Mevius, D., Helmuth, R., Guerra, B., on behalf of the Med-Vet-Net WP21 Project Group (2011). Antimicrobial resistance and virulence determinants in European

- Salmonella* Genomic Island 1 positive *Salmonella enterica* isolates from different origins. *Appl Environ Microbiol* 77: 5655–5664.
- Bundesinstitut für Risikobewertung (2010). Deutsche Antibiotika-Resistenzsituation in der Lebensmittelkette – DARLink.  
[http://www.bfr.bund.de/cm/350/deutsche\\_antibiotika\\_resistenzsituation\\_in\\_der\\_lebensmittelkette\\_darlink.pdf](http://www.bfr.bund.de/cm/350/deutsche_antibiotika_resistenzsituation_in_der_lebensmittelkette_darlink.pdf).
- Clinical and Laboratory Standards Institute (2008). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 18th informational supplement (M100-S18), Vol. 28, No. 1. CLSI, Wayne, PA.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (2009). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard, 8th ed. (M07-A8), vol. 29, no. 2. CLSI, Wayne, PA.
- Collard, J.M., Place, S., Denis, O., Rodriguez-Villalobos, H., Vrints, M., Weill, F.X., Baucheron, S., Cloeckeaert, A., Struelens, M., Bertrand, S. (2007). Travel-acquired salmonellosis due to *Salmonella* Kentucky resistant to ciprofloxacin, ceftriaxone and cotrimoxazole and associated with treatment failure. *J Antimicrob Chemother* 60: 190–192.
- Cray, P.J.F., Gray, J.T., Wray, C. (2000). *Salmonella* infections in pigs. In: *Salmonella* in Domestic Animals. Wray, C., Wray, A. (Eds.). CABI Publishing, Oxon, New York, 191–208.
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (2011). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 1.3, January 2011.  
[http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Disk\\_test\\_documents/EUCAST\\_breakpoints\\_v1.3\\_pdf.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_test_documents/EUCAST_breakpoints_v1.3_pdf.pdf).
- European Food Safety Authority und European Centre for Disease Prevention and Control (2011). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2009. *The EFSA Journal* 9: 1–378.
- Friedrich, A., Szabo, I., Dorn, C., Schroeter, A., Jaber, M., Berendonk, G., Brom, M., Ledwolorz, J., Malorny, B., Helmuth, R. (2011). Bericht des Nationalen Referenzlabors zur Durchführung von Analysen und Tests auf Zoonosen (Salmonellen) über die im Jahr 2009 eingesandten *Salmonella*-Isolate. *Berl Münch Tierärztl Wochenschr* 124: 10–19.
- Grimont, P.A.D., Weill, F.X. (2007). Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars, WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*, Institut Pasteur, Paris, France.
- Helmuth, R., Hensel, A. (2004). Towards the rational use of antibiotics: results of the first International Symposium on the Risk Analysis of Antibiotic Resistance. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 51: 357–360.
- Kidgell, C., Reichard, U., Wain, J., Linz, B., Torpdahl, M., Dougan, G., Achtman, M. (2002). *Salmonella typhi*, the causative agent of typhoid fever, is approximately 50,000 years old. *Infect Genet Evol* 2: 39–45.
- Le Hello, S., Hendriksen, R.S., Doublet, B., Fisher, I., Møller Nielsen, E., Whichard, J.M., Bouchrif, B., Fashae, K., Granier, S.A., Jourdan-Da Silva, N., Cloeckeaert, A., Threlfall, E.J., Angulo, F.J., Aarestrup, F.M., Wain, J., Weill, F.X. (2011). International spread of an epidemic population of *Salmonella enterica* serotype Kentucky ST198 resistant to ciprofloxacin. *J Infect Dis* 204: 675–684.
- Pires, S.M., Evers, E.G., van Pelt, W., Ayers, T., Scallan, E., Angulo, F.J., Havelaar, A., Hald, T., the Med-Vet-Net Workpackage 28 Working Group (2009). Attributing the human disease burden of foodborne infections to specific sources. *Foodborne Pathog Dis* 6: 417–424.
- Weill, F.X., Bertrand, S., Guesnier, F., Baucheron, S., Cloeckeaert, A., Grimont, P.A. (2006). Ciprofloxacin-resistant *Salmonella* Kentucky in travelers. *Emerg Infect Dis* 12: 1611–1612.
- World Health Organization (2001). Antibiotic resistance: synthesis of recommendations by expert policy groups. Alliance for the Prudent Use of Antibiotics. Geneva, WHO/CDS/CSR/DRS/2001.10.  
[http://whqlibdoc.who.int/hq/2001/WHO\\_CDS\\_CSR\\_DRS\\_2001.10.pdf](http://whqlibdoc.who.int/hq/2001/WHO_CDS_CSR_DRS_2001.10.pdf).

## Typisierung von *Salmonella enterica* Serovar Infantis-Stämmen aus Ausbruchsgeschehen in Deutschland (1973–2011)

T. Miller<sup>1</sup>, R. Prager<sup>1</sup>, Y. Pfeifer<sup>2</sup>, P. G. Braun<sup>3</sup>, W. Rabsch<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Robert Koch-Institut, FG 11 Bakterielle Infektionen, Wernigerode

<sup>2</sup>Robert Koch-Institut, FG 13 Nosokomiale Infektionen, Wernigerode

<sup>3</sup>Institut für Lebensmittelhygiene, Universität Leipzig

*Salmonella* (*S.*) Infantis-Infektionen des Menschen, oft durch Lebensmittel übertragen, sind weltweit von wachsender Bedeutung. Das nicht wirtsadaptierte Serovar *S. Infantis* nimmt seit 2001 einen vorderen Platz unter den Top Ten der bei Patienten nachgewiesenen *S. enterica*-Serovare deutschland- und europaweit ein (Galanis et al. 2006). Seit dem Ende der 1990er-Jahre wurde eine Zunahme dieses Serovars in Ungarn, Japan und Israel beobachtet (Nógrády et al. 2007; Bassal et al. 2011; Iwabuchi et al. 2011). *S. Infantis* kann auch als Erreger von Hospitalinfektionen vorwiegend bei Kleinkindern, aber auch bei Erwachsenen, die teilweise einen septikämischen Verlauf mit letalem Ausgang zeigten, vorkommen (Hasenson et al. 1995). Besonders bemerkenswert ist die Tatsache, dass *S. Infantis*-Hospitalinfektionen über längere Zeiträume persistieren können (Pessoa-Silva et al. 2002; Fonseca et al. 2006).

Die Reservoirs für *S. Infantis*-Salmonellosen beim Menschen sind hauptsächlich bei den Lebensmittel-liefernden Tieren zu finden. Die Daten der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA) belegen, dass *S. Enteritidis* und *S. Infantis* in den meisten Ländern das Hauptproblem in Geflügelbeständen darstellen. EU-weite epidemiologische Untersuchungen zum Vorkommen von *Salmonella* spp. identifizierten Masthähnchen und daraus gewonnene Lebensmittel als die häufigsten Quellen für *S. Infantis*-Infektionen des Menschen (EFSA 2012). Das stärkste Vorkommen des Serovars *S. Infantis* zeigte sich bei Masthähnchen in Ungarn mit 87 % und in Polen mit 19 % (EFSA 2007a; 2007b). In Deutschland beträgt der prozentuale Anteil von *S. Infantis* 3,9 % bei Legehennen bzw. 8,9 % bei Masthähnchen.

In einigen Ländern, auch in Deutschland, wird bereits seit Jahren mit Lebendvakzinen gegen *S. Enteritidis* und *S. Typhimurium* in Geflügelbeständen (Legehennen- und Elterntierbeständen) geimpft. Man muss davon ausgehen, dass durch eine Gabe des *S. Enteritidis*-Lebendimpfstoffes gegen Salmonellen der Gruppe 0:9 (D1) und im Fall der Gabe des *S. Typhimurium*-Lebendimpfstoffes gegen Salmonellen der Gruppe 0:4 (B) eine Immunität erreicht wird. Offensichtlich haben nach erfolgreicher Bekämpfung andere Serovare die Chance, in die ökologische Nische der Geflügelbestände einzudringen und zu persistieren. Nach der erfolgreichen Bekämpfung des Serovars *S. Gallinarum* in Geflügelbeständen kam es zum Eindringen von *S. Enteritidis* (Rabsch et al. 2000). Aus der Gruppe C1 wäre das Serovar *S. Infantis* ein zukünftiger Kandidat für solch einen Erregerwechsel. Für Serovar *S. Infantis* gibt es noch keinen zugelassenen Impfstoff. In Deutschland werden bestandsspezifische Impfstoffe gegen *S. Infantis* in Geflügelbeständen eingesetzt. In Ungarn, Japan und Israel ist *S. Infantis* schon das häufigste Serovar bei Masthähnchen, was sich wiederum bei Humanisolaten in diesen Ländern widerspiegelt (Nógrády et al. 2008; Shahada et al. 2008; Bassal et al. 2011).

Zur besseren Überwachung des Serovars *S. Infantis* wurde am Nationalen Referenzzentrum (NRZ) für Salmonellen des Robert Koch-Institutes ein neues Lysotypiesystem entwickelt. Das etablierte Lysotypiesystem umfasst letztlich 17 Typisierungssysteme. Insgesamt wurden 1.110 *S. Infantis*-Stämme in dieser Studie untersucht, die aus Ausbrüchen und sporadischen Fällen von Gastroenteritiden des Menschen, von Tieren, aus Lebensmitteln, Futtermitteln und durch Umgebungsuntersuchungen in der Periode von 1973 bis 2011 isoliert wurden. Von den 1.110 untersuchten *S. Infantis*-Stämmen waren 1.087 Isolate durch das entwickelte Lysotypiesystem typisierbar und in 61 Lysotypen (LT) zu differenzieren. 23 Stämme konnten

durch die Lysotypie nicht charakterisiert werden. Unter den 61 Lysotypen dominierten vor allem die Lysotypen LT 29 (30 %), LT 1 (21 %), LT 11 (7 %) sowie LT 9 (7 %), die sowohl beim Menschen als auch in Lebensmitteln und bei Tieren vorkamen und wahrscheinlich als epidemisch relevante Stämme anzusehen sind.

Zur molekularen Subdifferenzierung wurden 346 *S. Infantis*-Isolate verschiedener Herkunft ausgewählt und durch Lysotypie und *Xba*I-Makrorestriktionsanalyse untersucht, wobei 32 Lyso- und 58 *Xba*I-Typen identifiziert wurden. Die Analyse von Stämmen (n = 103), die zu mehreren Ausbrüchen gehörten, zeigen innerhalb eines Geschehens einen einheitlichen Lyso- bzw. *Xba*I-Typ, wie z.B. die Stämme der Ausbrüche in Dobel (LT 29/*Xba*I 27), in Lüneburg (LT 8/*Xba*I 43a) und in Stolberg (LT 1/*Xba*I 34). Es gab darüber hinaus auch sporadische Isolate vom Mensch und von verschiedenen Tierarten (n = 157) mit den gleichen Lyso-/*Xba*I-Typ-Kombinationen, die bei Ausbruchstämmen gefunden wurden. Das könnte auf eine Verbreitung und lange Persistenz dieser Klone hindeuten. Andere sporadische Isolate (n = 86) hingegen zeigten verschiedene Lyso- und *Xba*I-Typ-Kombinationen. Diese Ergebnisse zeigen, dass durch die komplexe Typisierung eine bessere Diskriminierung von *S. Infantis*-Stämmen möglich wird. Bei 66 untersuchten Ausbrüchen (54 Lebensmittelvergiftungen und 12 Hospitalinfektionen, insgesamt 197 Stämme) wurden 13 Lysotypen nachgewiesen.

Bei mehreren dieser Ausbrüche wurde der Klon LT 29/*Xba*I 27 identifiziert, der vermehrt bei Masthähnchen vorkommt. Besonders bemerkenswert ist das Auftreten von *S. Infantis* als nosokomialer Erreger von Hospitalausbrüchen in deutschen Kliniken. Beispielsweise traten in einer Klinik in Baden-Württemberg zwischen 2002 und 2009 immer wieder *S. Infantis*-Stämme des Klones (LT 29/*Xba*I 27) auf. Die für Baden-Württemberg erwähnten *S. Infantis*-Ausbrüche scheinen sich von den in der Literatur genannten dadurch zu unterscheiden, dass die Infektionen über einen Zeitraum von 17 Jahren immer wieder auftraten. Eine Aussage, ob innerhalb von 17 Jahren ein identischer Klon persistierte, kann nicht getroffen werden, da aus dieser Klinik keine Patientenisolat zwischen 1991 und 2001 an das NRZ eingesandt wurden. Die epidemiologische Konstanz ergibt sich auch aus dem Befund, dass in einer Klinik von verschiedenen Patienten zu verschiedenen Zeiten (2002–2009) isolierte Stämme den gleichen Typ (LT 29/*Xba*I 27) aufwiesen. Die Tatsache, dass Isolate mit identischem Muster über einen so langen Zeitraum (2002–2009) hinweg immer wieder nachgewiesen wurden, könnte darauf hindeuten, dass *S. Infantis* durch mögliche Schwachstellen im Hygienekonzept in der Klinik persistierte. Die Ergebnisse der retrospektiven Fall-Kontroll-Studie von Ausbruchgeschehen im Jahr 2009 zeigten, dass Ausscheider und/oder Kreuzkontamination in der Küche als Infektionsursache identifiziert wurden. Offensichtlich gibt es bei diesem Serovar einige Klone, die dauerhaft persistieren können.

Bei zwei weiteren Ausbrüchen in Nordrhein-Westfalen in den Jahren 2007 und 2008, die durch Schweinebraten und Geflügeldöner verursacht wurden, sind die *S. Infantis*-Klone LT 1/*Xba*I 34a und LT 1/*Xba*I 34 identifiziert worden. Der Klon (LT 1/*Xba*I 34) wurde auch bei Schwein, Masthähnchen, Rind, Schweinefleisch und Wurst nachgewiesen. Die komplexe Typisierung beweist, dass diese Tier-Spezies als Infektionsquellen für *S. Infantis* dienen.

Eine überregionale Häufung von *S. Infantis*-Meldungen aus Thüringen, Niedersachsen und Nordrhein-Westfalen fiel im Oktober 2007 auf, wobei alle *S. Infantis*-Isolate bezüglich des Lyso-/*Xba*I-Typs (LT 29/*Xba*I 27a) identisch waren. Somit lassen sich durch kontinuierliche komplexe Typisierung von *S. Infantis*-Isolaten auch diffuse Ausbrüche erfassen. Zwei Lebensmittelvergiftungen mit 188 Erkrankten in zwei Krankenhäusern wurden im Jahr 2004 in Bayern durch Backwaren verursacht. Mittels Lysotypie und PFGE konnten alle eingesandten Stämme von Menschen und Lebensmitteln als Klon (LT 53/*Xba*I 6) charakterisiert werden.

*S. Infantis*-Stämme sind in Geflügelbeständen weit verbreitet. Isolate von Masthähnchen, die aus Deutschland und Ungarn stammten, wurden typisiert und in 24 Lysotypen eingeordnet.

Der bei Masthähnchen nachgewiesene Klon (LT 29/Xbal 27) wurde bei mehreren dieser Ausbrüche identifiziert, was auf eine klonale Ausbreitung hindeutet. Neben diesem Klon wurden noch weitere Klone beim Masthähnchen gefunden, die deutschlandweit verbreitet sind, wie z.B. LT 4/Xbal 4 und LT 29/Xbal 5, wobei der Klon (LT 29/Xbal 5) sowohl bei deutschem als auch bei ungarischem Masthähnchen (durch Import aus Ungarn) gefunden wurde. In Deutschland wurde dieser Klon nur bei Einzelerkrankungen beobachtet.

Es ist wichtig anzumerken, dass der Klon (LT 29/Xbal 27) aus Deutschland und der Klon (LT 29/Xbal 5) aus Deutschland/Ungarn einen identischen Lysotyp nach dem „Wernigeröder Schema“ besitzen. Die Unterschiede in den Xbal-Mustern weisen kleine Variabilitäten (zwei Banden von ca. 70 kbp und 170 kbp) auf und sind sehr wahrscheinlich durch das Auftreten von Plasmiden bedingt. Beispielweise konnte aus den Stämmen 03-02419 und 04-91651 (Masthähnchen, Ungarn, LT 29/Xbal 5) ein Plasmid mit einer Größe von 170 kbp isoliert werden.

Die Lysotypieergebnisse zeigten, dass die Lysotypen 1, 4, 9, 11, 24, 29 sowohl für Mensch als auch für Masthähnchen epidemiologisch relevant sind, was auch die Ergebnisse von anderen Autoren aus Ungarn, Israel, und Japan bestätigen (Nogrady et al. 2008; Shahada et al. 2008; Bassal et al. 2011). Die komplexe Typisierung durch Lysotypie und Makrorestriktionsanalyse erlaubt eine Feindifferenzierung der *S. Infantis*-Isolate und kann somit zur Aufklärung epidemiologischer Fragestellungen (Infektionsketten) beitragen.

Im Rahmen der Untersuchungen wurden außerdem 14 Isolate (Mensch, Masthähnchen) des Serovars *S. Infantis* gefunden, die über eine Extended-Spectrum-Beta-Lactamase- (ESBL-) vermittelte Resistenz gegen Cephalosporine der 3. Generation verfügten. Diese Isolate bilden die ESBL-Typen: CTX-M-1 (n = 11; *bla*<sub>CTX-M-1</sub>), TEM-52 (n = 2; *bla*<sub>TEM-52</sub>) als auch CTX-M-14 (n = 1; *bla*<sub>CTX-M-14</sub>) und gehörten zu den häufig vorkommenden Lysotypen LT 01, LT 04 und LT 29.

## Referenzen

- Bassal, R., et al. (2011). Recent trends in the epidemiology of non-typhoidal *Salmonella* in Israel, 1999–2009. *Epidemiology and Infection* 1: 1–8.
- EFSA (2007a). Report of the task force on zoonoses data collection on the analysis of the baseline survey on the prevalence of *Salmonella* in broiler flocks of *Gallus gallus*. The EFSA Journal 98: 1–85.
- EFSA (2007b). Report of the Task Force on Zoonoses Data Collection on the Analysis of the baseline study on the prevalence of *Salmonella* in holdings of laying hen flocks of *Gallus gallus*. The EFSA Journal 97: 18–19.
- European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control (2012). The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2010. *EFSA Journal* 10: 440–442.
- Fonseca, E.L., et al. (2006). Clonality and antimicrobial resistance gene profiles of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar infantis isolates from four public hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Clinical Microbiology* 44: 2767–2772.
- Galanis, E., et al. (2006). Web-based surveillance and global *Salmonella* distribution, 2000–2002. *Emerging Infectious Diseases* 12: 381–388.
- Hasenson, L., et al. (1995). Epidemiological and microbiological studies on salmonellosis in Russia. *Zentralblatt für Hygiene Umweltmedizin* 198: 97–116.
- Iwabuchi, E., et al. (2011). Prevalence of *Salmonella* isolates and antimicrobial resistance patterns in chicken meat throughout Japan. *Journal of Food Protection* 2: 270–273.
- Nógrády, N., et al. (2007). Emergence of multidrug-resistant clones of *Salmonella* Infantis in broiler chickens and humans in Hungary. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 60: 645–648.

- Nogrady, N., et al. (2008). Prevalence and characterization of *Salmonella* infantis isolates originating from different points of the broiler chicken-human food chain in Hungary. *International Journal of Food Microbiology* 127: 162–167.
- Pessoa-Silva, C.L., et al. (2002). Infection due to extended-spectrum beta-lactamase-producing *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotype infantis in a neonatal unit. *The Journal of pediatrics* 141: 381–387.
- Rabsch, W., et al. (2000). Competitive exclusion of *Salmonella enteritidis* by *Salmonella gallinarum* in poultry. *Emerging Infectious Diseases* 6: 443–448.
- Shahada, F., et al. (2008). Temporal distribution and genetic fingerprinting of *Salmonella* in broiler flocks from southern Japan. *Poultry Science* 87: 968–972.

## Extended-Spektrum $\beta$ -Laktamasen (ESBL) und AmpC $\beta$ -Laktamasen in *Enterobacteriaceae* bei Tier, Lebensmitteln und Mensch

B. Guerra<sup>1</sup>, J. Fischer<sup>1</sup>, I. Rodríguez<sup>1</sup>, C. Eller<sup>2</sup>, R. Helmuth<sup>1</sup>, Y. Pfeifer<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin

<sup>2</sup>Robert Koch-Institut, FG13 Nosokomiale Infektionen, Wernigerode

Die veterinärmedizinischen und humanmedizinischen Studien der Nationalen Referenzlabore des Bundesinstituts für Risikobewertung, und des Robert Koch-Instituts (RKI) sowie die Studien des seit 2011 aktiven Forschungsverbundes RESET ([www.reset-verbund.de](http://www.reset-verbund.de)) haben die Erfassung der Ausbreitung neuer Resistenzeigenschaften bei gramnegativen Bakterien und die Verhütung von Resistenzen gegen hochwirksame antimikrobielle Substanzen (Cephalosporine der 3. und 4. Generation und Carbapeneme) zum Ziel. Bei *Enterobacteriaceae* ist die Bildung von  $\beta$ -Laktam-spaltenden Enzymen, wie Extended-Spektrum  $\beta$ -Laktamasen (ESBL) und AmpC  $\beta$ -Laktamasen ein bedeutender Resistenzmechanismus, der seit der Erstbeschreibung in den 1980er Jahren weltweit zunimmt. Bei den ESBL unterscheidet man heute bereits mehrere hundert Enzymvarianten der TEM-, SHV- und CTX-M-Familie, deren Gene zumeist plasmidlokalisiert sind und somit leicht zwischen verschiedenen enterobakteriellen Spezies ausgetauscht werden können. Dies gilt auch für Plasmid-kodierte AmpC  $\beta$ -Laktamasen, insbesondere der CMY-, ACC- oder DHA-Familie.

Im Rahmen des RESET-Forschungsverbundes wurden seit 2011 in Longitudinal- (Freie Universität Berlin) und Querschnittsstudien (Tiermedizinische Hochschule Hannover) Cefotaxim-resistente Broiler-, Schweine- und Rinderisolate gewonnen. Diese Isolate wurden am BfR bezüglich ihrer phänotypischen und molekularbiologischen Eigenschaften getestet. Insgesamt wurden bislang 274 ESBL/AmpC-tragende Isolate (271 *E. coli*, drei Salmonellen) charakterisiert. Es konnten die  $\beta$ -Laktamase-Gene  $bla_{CTX-M-1}$  (61 %),  $bla_{CTX-M-15}$  (8 %),  $bla_{CTX-M-14}$  (7 %),  $bla_{CTX-M-24}$  und  $bla_{CTX-M-9}$  (1 % und 0,4 %) nachgewiesen werden. Darüber hinaus trugen 4 % der Isolate  $bla_{TEM-52}$ , 3 %  $bla_{SHV-12}$  und 0,7 % der Isolate  $bla_{TEM-20}$ . Außerdem konnten die AmpC-gene  $bla_{CMY-2}$  (7 %),  $bla_{ACC-1}$  (2 %) und  $bla_{CMY-2/22}$  (0,7 %) festgestellt werden. Alle ACC-1-positiven Isolate (zwei *E. coli*, drei Salmonellen) trugen zusätzlich das Carbapenemase-Gen VIM-1. Die Carbapenemase-kodierenden  $bla_{VIM-1}$ -Gene waren in allen Fällen in Klasse-1-Integrans auf großen Plasmiden (*Salmonella* 300 kb und *E. coli* 220 kb) lokalisiert. Dieses Ergebnis ist von besonderer Bedeutung, da dies die erste Beschreibung eines Carbapenemase-Gens in deutschen Tierbeständen ist. Bei der Untersuchung aller CTX-M-15-positiven Stämme (RESET-Studie und BfR-Routine) zeigte sich, dass die aktuelle Verbreitung dieses Gens in Geflügel-, Schweine- und Rinderbetrieben mit einer klonalen *E. coli*-Linie des MLST-Typs ST410 im Zusammenhang steht.

Die ESBL-bildenden *E. coli*-Isolate vom Nutztier und aus Lebensmitteln werden derzeit mit humanen ESBL-*E. coli*-Isolaten, die in den humanmedizinischen Studien des RESET-Verbundes gewonnen wurden, verglichen. Die ersten Ergebnisse des RKI zu ESBL in nosokomialen bzw. ambulanten *E. coli*-Isolaten zeigen, dass zwei CTX-M-Varianten (CTX-M-1 und CTX-M-15, Anteil jeweils 30–40 % aller ESBL) dominieren. Insbesondere CTX-M-1 ist auch die bei Nutztieren am häufigsten nachgewiesene ESBL-Variante (30–40 %); dagegen ist die beim Tier sehr seltene Variante CTX-M-15 in humanen *E. coli*-Isolaten sehr häufig. Ein zurzeit vom LGL Bayern durchgeführtes Screening von mehr als 3.000 gesunden Probanden (Normalbevölkerung) zeigt außerdem, dass bis zu 7 % der Studienteilnehmer mit ESBL-*E. coli* besiedelt sind. Die insbesondere beim Geflügel häufiger vorkommenden AmpC  $\beta$ -Laktamasen vom CMY-Typ wurden auch in fünf *Salmonella* Isolaten vom Mensch, mehreren nosokomialen *E. coli*- und *Klebsiella pneumoniae*-Isolaten sowie in 22 *Proteus mirabilis*-Isolaten aus Harnwegsinfektionen nachgewiesen. Weitere detailliertere Untersuchungen sollen nun zeigen, inwieweit ein Austausch von ESBL-bildenden *E. coli*-Stämmen oder ESBL-Gen-tragenden Plasmiden zwischen Tier und Mensch über die Nahrungskette erfolgt.



## ESBLs und AmpC, nur ein Problem bei Nutztieren?

S. Guenther<sup>1</sup>, A. Bethe<sup>1</sup>, L. H. Wieler<sup>1</sup>, C. Ewers<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen, Freie Universität Berlin

<sup>2</sup>Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, Justus-Liebig-Universität Gießen

Extended-Spektrum Beta-Laktamase (ESBL) bildende *E. coli*, *Klebsiella spec.* und andere gramnegative Bakterien sind ein weltweites Problem sowohl in der Human- als auch in der Veterinärmedizin. Dabei stehen in der aktuellen Diskussion über die Verbreitung von multiresistenten Erregern vor allem Lebensmittel-produzierende Tiere im Vordergrund. Dort ergaben sich in einigen Studien Hinweise auf eine direkte Übertragung von multiresistenten zoonotischen Erregern zwischen Mensch und Tier.

Die Rolle von Heim- und Hobbytieren wie Hunden, Katzen und Pferden und ihr möglicher Beitrag zur Transmission multiresistenter Erreger ist jedoch nur unzureichend bekannt. Die soziale Rolle von Heimtieren hat sich in den letzten Jahrzehnten extrem gewandelt und vor allem Hunde und Katzen werden oft als Familienmitglieder angesehen. Dies hat zu einem engeren Kontakt zwischen Tieren und ihren Besitzern geführt, welcher sich auch anhand von Studien, die sich mit „Face to Fur contact“ oder der Häufigkeit, mit der Heimtiere im Bett des Halters schlafen, belegen lässt.

Diese soziale Entwicklung begünstigt eine Übertragung multiresistenter Erreger oder ihrer Resistenz vermittelnden Gene, nicht nur von Lebensmittel-produzierenden Tieren auf den Menschen, sondern verstärkt auch von Heimtieren. Daraus resultierend könnten diese multiresistenten Erreger zu bakteriellen Infektionen mit nur noch eingeschränkten Therapieoptionen führen. Weiterhin ist dabei anzumerken, dass der umgekehrte Weg – also die Übertragung vom Menschen auf das Tier – hier möglicherweise eine größere Rolle spielt als bei Nutztieren und so Heimtiere eine Reservoirfunktion für humane multiresistente Erreger übernehmen könnten.

Im Rahmen dieses Vortrags soll die zunehmende Belastung durch Extended-Spektrum Beta-Laktamase (ESBL) bzw. AmpC bildende *Enterobacteriaceae* bei Heimtieren anhand der bisher bekannten Daten dargestellt werden. Unsere eigenen Ergebnisse zur molekularen phylogenetischen Charakterisierung von ESBL/AmpC produzierenden *E. coli* zeigen zudem, dass Heimtiere und Menschen sehr oft identische Stämme dieser multiresistenten Erreger tragen, was die eingangs erwähnte Möglichkeit einer Transmission zwischen Mensch und Tier und *vice versa* unterstreicht.

Bei der Betrachtung des komplexen Problems der Transmission multiresistenter Erreger muss, neben der Einbeziehung möglicher neuer Infektionszyklen zwischen Haustieren und deren Besitzern, aber auch die Verbreitung multiresistenter Erreger in der Umwelt betrachtet werden. Innerhalb der letzten zehn Jahre zeigen Publikationen ein weltweites Auftreten ESBL-produzierender *E. coli* in verschiedenen Wildtierpopulationen, welche als Indikator für die Belastung der Umwelt mit multiresistenten Keimen dienen könnten. Die derzeit dazu vorhandenen Daten werden im Rahmen des Vortrages zusammengefasst und durch eigene Untersuchungen zur molekularen Typisierung von ESBL-*E. coli* aus Wildtieren ergänzt. Auch diese Daten zeigen das prinzipielle Vorkommen identischen Erreger bei Menschen, Nutz-, Haus- und Wildtieren, was die enorme Komplexität der Transmission multiresistenter Erreger unterstreicht. Die derzeitige alleinige Fokussierung der Diskussion auf Lebensmittel-produzierende Tiere als Ursache der Verbreitung multiresistenter Erreger erscheint bei Einbeziehung dieser Daten nicht angebracht, da sie nur einen Teilaspekt der Gesamtsituation betrachtet.



## Drei Jahre Resistenzmonitoring in Deutschland

B.-A. Tenhagen, A. Schroeter, K. Alt, B. Guerra, K. Stingl, A. Fetsch, A. Käsbohrer  
Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin

### Einleitung

Die zunehmende Resistenz von Bakterien gegenüber antimikrobiellen Substanzen wird seit Jahren als eine der größten Herausforderungen im Public-Health-Bereich angesehen. In der Europäischen Union sind die Mitgliedsstaaten durch die Richtlinie 2003/99/EG gehalten, repräsentative Daten über die Resistenz von Zoonoseerregern gegenüber antimikrobiellen Substanzen zu erheben, zu bewerten und an die Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA) zu melden. Zu diesem Zweck wurden alle an das BfR im Rahmen der Überwachung eingesandten Isolate von *Salmonella enterica* und *Campylobacter* spp. sowie verotoxinbildenden *Escherichia (E.) coli* auf ihre Resistenz gegenüber antimikrobiellen Substanzen untersucht, die Ergebnisse bewertet und die Daten an die EFSA übermittelt.

Mit der im Jahr 2009 in Deutschland wirksam gewordenen AVV Zoonosen Lebensmittelkette steht darüber hinaus jetzt ein Instrumentarium zur Verfügung, um gezielt repräsentative Erhebungen zum Vorkommen von Zoonoseerregern entlang der verschiedenen Lebensmittelketten durchzuführen und die dabei gewonnenen Isolate dem BfR zur weiteren Differenzierung und Resistenztestung zu übermitteln. Nach diesem neuen System wurden in den Jahren 2009 bis 2011 insgesamt 11.736 Isolate der Spezies *Salmonella enterica*, *Campylobacter (C.) jejuni* und *C. coli*, verotoxinbildende *E. coli* und Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* sowie Isolate von kommensalen *E. coli* an das BfR übermittelt und getestet. Kommensale *E. coli* gelten dabei als Spiegelbild für den Selektionsdruck, der auf die Bakterienpopulation von Nutztieren einwirkt, weil kommensale *E. coli* praktisch immer beim Tier vorhanden sind und damit auch jeder Anwendung von Antibiotika ausgesetzt sind.

Für die Gewinnung der Isolate wurden, soweit verfügbar, international standardisierte mikrobiologische Nachweisverfahren eingesetzt. Details hierzu werden im Zoonosen-Stichprobenplan sowie im Beitrag zu den Ergebnissen des Zoonosen-Monitorings beschrieben.

Alle Untersuchungen zum Erregernachweis wurden in den akkreditierten Untersuchungseinrichtungen der Länder durchgeführt. Alle ausgewählten Isolate von *Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *E. coli* (Kommensale und VTEC) sowie Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) wurden mittels eines international anerkannten, quantitativen Verfahrens für die Resistenzbestimmung (hier Mikrobouillonverdünnungsmethode nach ISO 20776-1:2006 bzw. CLSI M31-A3) im Nationalen Referenzlabor (NRL) für Antibiotikaresistenz bzw. im NRL für *Campylobacter* untersucht. Alle untersuchten Isolate wurden dem vom BfR empfohlenen, erweiterten Untersuchungsspektrum antimikrobieller Substanzen unterzogen. Hierfür wurden die fertig konfektionierten Plattenformate EUMVS2 (*Salmonella* spp. und *E. coli*), EUCAMP (*Campylobacter* spp.) und EUST (MRSA) der Firma TREK Diagnostic Systems, Magellan Biosciences, Inc. verwendet.

Die Bewertung der minimalen Hemmkonzentrationen (MHK) erfolgte anhand der epidemiologischen Cut-Off-Werte ([www.eucast.org](http://www.eucast.org)). Diese Werte sind insbesondere dazu geeignet, frühzeitig Resistenzentwicklungen zu erkennen, und wurden daher auch von der EFSA für die Bewertung empfohlen. Für Salmonellen und *Campylobacter* wurden die Cut-Off-Werte verwendet, wie sie im Rahmen der EU-Rechtssetzung (Entscheidungen 2007/407/EG bzw. 2007/516/EG) vorgegeben wurden. Wirkstoffe, die aufgrund nationalen Interesses zusätzlich getestet wurden, ebenso wie die Ergebnisse für kommensale *E. coli* und VTEC wurden auf

der Grundlage der von EUCAST veröffentlichten Cut-Off-Werte bewertet. Die Bewertung von MRSA erfolgte, soweit vorhanden, nach den von EUCAST publizierten Werten für MRSA. Standen keine Cut-Off-Werte für MRSA zur Verfügung, so wurden die Cut-Off-Werte für *Staphylococcus aureus* verwendet.

Isolate wurden als mikrobiologisch resistent bewertet, wenn die minimale Hemmkonzentration oberhalb des angegebenen Cut-Off-Wertes lag. Als mehrfach resistent wurde ein Isolat bezeichnet, wenn eine Resistenz gegenüber mehr als einer Wirkstoffklasse nachgewiesen wurde. Die verwendeten epidemiologischen Cut-Off-Werte können den einschlägigen Berichten des BfR und des BVL entnommen werden (Schroeter und Käsbohrer 2012; BVL 2012). Die wesentlichen Ergebnisse dieses Monitorings sollen in diesem Beitrag kurz nach Lebensmittelketten getrennt skizziert werden.

### 1. Huhn

Aus den Lebensmittelketten vom Huhn wurden im Rahmen des Zoonosen-Monitorings getrennt Isolate von Legehennen und Masthähnchen, sowie von Hähnchenschlachtkörpern und aus Hähnchenfleisch berücksichtigt. Vereinzelt wurden auch Isolate aus Eiern untersucht. Es zeigte sich, dass sich die Resistenzraten zwischen Legehennen einerseits und Masthähnchen sowie Hähnchenfleisch andererseits deutlich unterscheiden. Isolate von Salmonellen und *E. coli* von Masthähnchen, ihren Schlachtkörpern und aus Hähnchenfleisch waren deutlich häufiger resistent gegen eine oder mehrere Substanzklassen als solche von Legehennen.

Isolate von MRSA standen von Legehennen kaum zur Verfügung. Auch bei Masthähnchen im Bestand konnten im Rahmen des Monitorings nur wenige MRSA-Isolate für die Resistenztestung gewonnen werden. Isolate von Hähnchenschlachtkörpern und aus Hähnchenfleisch fielen vor allem durch einen hohen Anteil an Stämmen auf, die nicht dem Nutztier-assoziierten LA-MRSA CC398 zugeordnet werden konnten und im Gegensatz zu LA-MRSA häufig gegen Ciprofloxacin resistent waren.

### 2. Pute

Isolate von der Pute standen aus den Beständen, vom Schlachthof (Blinddärme und Schlachtkörper) sowie von Putenfleisch aus dem Einzelhandel zur Verfügung. Die Isolate wiesen sehr hohe Resistenzraten gegen zahlreiche Substanzklassen auf. Besonders auffällig waren bei der Pute, wie schon bei den Masthähnchen, hohe Resistenzraten gegen das Fluorchinolone Ciprofloxacin. Diese sind aufgrund der herausragenden Bedeutung der Fluorchinolone für die Humanmedizin von besonderer Bedeutung. Sie finden sich bei Salmonellen, *E. coli* und auch *Campylobacter* spp. Aber auch von der Pute stammende MRSA, insbesondere wenn sie nicht dem klonalen Komplex CC398 angehörten, wiesen oft Resistenzen gegen das Fluorchinolone auf.

### 3. Schwein

Isolate aus Mastschweinebeständen, von Schweinen am Schlachthof sowie aus Schweinefleisch wiesen Resistenzraten auf, die insgesamt geringer waren als bei Mastgeflügel, aber höher als bei Legehennen oder Milchrindern. Bei den Salmonellen dominierten beim Schwein *S. Typhimurium* und seine monophasische Variante *S. 4,[5],12:i:-*, die in den meisten Fällen resistent gegen fünf (*S. Typhimurium*) bzw. vier Substanzklassen (*S. 4,[5],12:i:-*) sind. Auch von den *E. coli*-Isolaten waren viele mehrfachresistent. Vom Schwein stammende

MRSA wiesen zwar Mehrfachresistenzen auf, waren aber insgesamt ebenfalls gegen weniger Substanzklassen resistent als solche vom Mastgeflügel.

#### 4. Rind

Beim Rind müssen ähnlich wie beim Huhn unterschiedliche Kategorien klar unterschieden werden. Während bei den vom Milchrind eingesandten Isolaten von *E. coli* die überwiegende Mehrheit gegen alle untersuchten Substanzen sensibel war, waren Isolate von *E. coli* vom Mastkalb häufig mehrfachresistent. Interessanterweise wiesen Isolate von Mastrindern und aus Rindfleisch, die 2011 untersucht wurden, ähnliche Resistenzraten auf wie die von Milchkühen. Damit hoben sie sich deutlich von den Masttieren der anderen Spezies und den Mastkälbern ab. Auch bei MRSA zeigten sich deutliche Unterschiede, die sich aber weniger auf die Resistenz der gewonnenen Isolate bezogen, sondern eher auf die Prävalenz von MRSA in den Beständen, den Tieren und in Lebensmitteln. Hier wiesen Mastkälber und ihr Fleisch eine deutlich höhere Prävalenz auf als Milchkühe und Mastrinder. Die Ähnlichkeit der Resistenzraten bei diesen Isolaten lassen sich möglicherweise dadurch erklären, dass die Kälber zu einem nicht unerheblichen Teil auch aus den Milchviehbetrieben stammten und über den Tierhandel in die Masttierherden gelangen.

#### Ausblick

Im laufenden Jahr hat die EFSA neue Empfehlungen zum Resistenzmonitoring bei Zoonoseerregern und Kommensalen sowie bei MRSA erarbeitet (EFSA 2012a; EFSA 2012b). Diese werden auch die Grundlage für die Überarbeitung der Entscheidung 407/2007/EG sein, die in den vergangenen Jahren vor allem das Monitoring von Antibiotikaresistenzen bei Salmonellen vom Geflügel und von Schweinen regelte. Die EFSA empfiehlt, zusätzlich zum Monitoring bei Salmonellen und *Campylobacter* spp. das Monitoring von Resistenzen bei kommensalen Keimen (*E. coli* und Enterokokken) verbindlich festzulegen, da dieses Monitoring sehr gut geeignet ist, die Entwicklungstendenzen von Resistenzen gegenüber antimikrobiellen Substanzen zu erkennen und zu beschreiben. Auch das Monitoring von MRSA bei Nutztieren wird von EFSA dringend empfohlen. Mit dem Monitoring nach der AVV Zoonosen Lebensmittelkette wird Deutschland diesen Forderungen in vielen Bereichen schon gerecht. Andere Bereiche, wie das Monitoring bei Enterokokken, werden in Zukunft verstärkt berücksichtigt werden müssen, wofür entsprechende Ressourcen bereitzustellen sind.

#### Referenzen

- BVL (2012). Berichte zur Lebensmittelsicherheit 2010 – Zoonosen-Monitoring, [http://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/01\\_Lebensmittel/04\\_Zoonosen\\_Monitoring/Zoonosen\\_Monitoring\\_Bericht\\_2010.pdf?\\_\\_blob=publicationFile&v=6](http://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/01_Lebensmittel/04_Zoonosen_Monitoring/Zoonosen_Monitoring_Bericht_2010.pdf?__blob=publicationFile&v=6).
- EFSA (2012a). Technical specifications on the harmonised monitoring and reporting of antimicrobial resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in food-producing animals and food. EFSA Journal 10 (10). 2897.
- EFSA (2012b). Technical specifications on the harmonised monitoring and reporting of antimicrobial resistance in *Salmonella*, *Campylobacter* and indicator *Escherichia coli* and *Enterococcus* spp. bacteria transmitted through food. EFSA Journal 10 (6). 2742.
- Schroeter, A., Käsbohrer, A. (2012). Deutsche Antibiotikaresistenz-Situation in der Lebensmittelkette – DARLink 2009. 5/2012 ed. Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR), Berlin.