

Zoonosen und Lebensmittelsicherheit

BfR-Symposium Zoonosen und Lebensmittelsicherheit, 10.–11. November 2016, Berlin

Impressum

BfR-Abstracts

BfR-Symposium Zoonosen und Lebensmittelsicherheit

Für den Inhalt der Abstracts sind deren Autoren verantwortlich.

Bundesinstitut für Risikobewertung
Max-Dohrn-Straße 8–10
10589 Berlin

Berlin 2016
63 Seiten

Druck: BfR-Hausdruckerei Marienfelde

Inhalt

1	Vorwort	5
2	Programm	7
3	Abstracts	11
3.1	Neues aus dem Zoonosen-Monitoring: Daten für Deutschland, 2014–2015	11
3.2	Salmonellose-Meldezahlen – Trends der letzten Jahre	15
3.3	Salmonellen in Nutztieren, Lebens- und Futtermitteln in Deutschland: Bericht aus dem NRL <i>Salmonella</i>	17
3.4	Kleinkind-Salmonellosen durch Reptilien im Haushalt	19
3.5	Salmonellen in Futtermitteln – Bewertung und Handlungsoptionen	23
3.6	Perspektiven für die Salmonellenbekämpfung in der Schweinemast durch stringenteren Überwachung der vorgelagerten Stufen	25
3.7	Eine Vision? Reduzierung von Zoonoseerregern in der Lebensmittelkette als strategisches Ziel des MNKP für die Zukunft	27
3.8	The use of risk assessment to support control of <i>Salmonella</i> in pork	29
3.9	Aufklärung eines Listeriose-Ausbruchs durch kontaminierte Wurstwaren	31
3.10	Listerioseausbruch in Süddeutschland: Molekulares Tracing mittels NGS	33
3.11	<i>Clostridium difficile</i> als Zoonoseerreger? Ein Update	35
3.12	Monitoring of foodborne outbreaks caused by toxin-producing bacteria in the European Union	39
3.13	<i>Bacillus thuringiensis</i> – ein bedeutender Mikroorganismus für den biologischen Pflanzenschutz	43
3.14	Tenazität von Clostridien	45
3.15	Targeting <i>S. aureus</i> toxin production – for improved food safety and animal health	47
3.16	How to manage and characterize staphylococcal food poisoning outbreaks: from food vehicle to incriminated source	51
3.17	Lebensmittelbedingte Ausbrüche durch bakterielle Toxinbildner in Bayern (2005–2015)	53
3.18	Dose-response modelling of staphylococcal enterotoxins using outbreak data: which model, which precision?	55
3.19	Von der Taxonomie zum Risiko – Differenzielle <i>Bacillus cereus</i> Diagnostik	57
3.20	Botulismus: Eine altbekannte Erkrankung stellt uns vor neue Herausforderungen	59
3.21	Die Tücke steckt im Detail! Herausforderungen und Grenzen des Nachweises von Staphylokokken-Enterotoxinen im Lebensmittel	61
4	Autorenverzeichnis	63

1 Vorwort

Sehr geehrte Kolleginnen und Kollegen,
sehr geehrte Gäste,

wir heißen Sie im BfR recht herzlich willkommen zum mittlerweile 4. Symposium „Zoonosen und Lebensmittelsicherheit“!

In den nächsten zwei Tagen wird Ihnen mit 21 Vorträgen eine Übersicht über bedeutsame und aktuelle Fragestellungen und Bewertungen zu Zoonoseerregern und mikrobiellen Toxinbildnern im Kontext der Lebensmittelsicherheit vorgestellt. Hierzu konnten wir eine Vielzahl von internationalen und nationalen Expertinnen und Experten von Bundes- und Landesinstituten, Universitäten und anderen Forschungseinrichtungen gewinnen.

Am ersten Tag dieser Veranstaltung möchten wir Sie über neuere Entwicklungen im Hinblick auf das Vorkommen von Zoonoseerregern in Lebensmitteln und das Risiko für den Menschen informieren.

Durch die Erfolge bei der Salmonellenbekämpfung beim Geflügel hat sich die Zahl der gemeldeten Fälle von Salmonellosen des Menschen in Deutschland und der Europäischen Union in den letzten Jahren deutlich verringert. Es werden dadurch aber auch andere Herausforderungen sichtbar, wie das Vorkommen von Salmonellen in der Schweinehaltung oder im Haushalt gehaltene Reptilien als Quelle von Salmonellen. Deshalb stehen Salmonellen im Vordergrund der Vorträge des ersten Tages. Wir wollen dabei sowohl die Situation entlang der Lebensmittelkette beleuchten als auch mögliche Ansatzpunkte aufzeigen für eine weitergehende Verbesserung des gesundheitlichen Verbraucherschutzes in diesem Bereich. Weiterhin werden Sie am ersten Tag etwas über die Aufklärung des überregionalen Listeriose-Ausbruchs in Süddeutschland erfahren. Mit *Clostridium difficile* wenden wir uns schließlich einem Erreger zu, der Krankenhäuser vor zunehmende Probleme stellt, den wir aber auch in Tierbeständen finden können. Die klassische One-Health Frage ist: Gibt es eine Verbindung zwischen diesen beiden Bereichen über Lebensmittel?

Der zweite Tag der Veranstaltung ist erstmals den mikrobiellen Toxinbildnern gewidmet. Dabei wird es um die Bedeutung, das Vorkommen und den Nachweis von toxinbildenden Staphylokokken, Bazillen und Clostridien gehen. Auf EU-Ebene nehmen die Fallzahlen lebensmittelbedingter Erkrankungen durch Toxinbildner kontinuierlich zu. Auf dem Symposium werden unter anderem Ergebnisse von Ausbruchsuntersuchungen und geeignete Untersuchungsverfahren für Lebensmittel vorgestellt. Die Beiträge werden auch der Frage nachgehen, ob wir mehr Anstrengungen unternehmen müssen, um das von diesen Toxinbildnern ausgehende Risiko mittelfristig besser abschätzen zu können.

Ich wünsche Ihnen eine erfolgreiche und spannende Tagung, angeregte Diskussionen und angenehme Tage in Berlin.

Professor Dr. Dr. Andreas Hensel

2 Programm

Donnerstag, 10. November 2016

10:00–10:15 Uhr

Begrüßung

Prof. Dr. Dr. Andreas Hensel,
Präsident des Bundesinstituts für Risikobewertung, Berlin

10:15–10:45 Uhr

Neues aus dem Zoonosen-Monitoring

Dr. Katja Alt, Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin

10:45–11:15 Uhr

Salmonellose-Meldezahlen – Trends der letzten Jahre

Dr. Christina Frank, Robert Koch-Institut, Berlin

11:15–11:45 Uhr

**Salmonellen in Nutztieren, Lebens- und Futtermitteln in Deutschland:
Bericht aus dem NRL *Salmonella***

Dr. Istvan Szabo, Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin

11:45–12:15 Uhr

Kleinkind-Salmonellosen durch Reptilien im Haushalt

Dr. Wolfgang Rabsch, Robert Koch-Institut, Wernigerode

12:15–13:15 Uhr Mittagspause

13:15–13:45 Uhr

Salmonellen in Futtermitteln – Bewertung und Handlungsoptionen

Dr. Bert-Andre Zucker, Senatsverwaltung für Justiz und Verbraucherschutz, Berlin

13:45–14:15 Uhr

**Perspektiven für die Salmonellenbekämpfung in der Schweinemast durch strin-
gentere Überwachung der vorgelagerten Stufen**

Dr. Anja Rostalski, Tiergesundheitsdienst Bayern e. V., Grub

14:15–14:55 Uhr

**Eine Vision? Reduzierung von Zoonoseerregern in der Lebensmittelkette als
strategisches Ziel des MNKP für die Zukunft**

Ursula Müller/Martin Schnabel, Niedersächsisches Ministerium für Ernährung, Land-
wirtschaft und Verbraucherschutz/Sächsisches Staatsministerium für Soziales und
Verbraucherschutz, Hannover/Dresden

14:55–15:30 Uhr Kaffeepause

15:30–16:00 Uhr

The use of risk assessment to support control of *Salmonella* in pork

Dr. Maarten Nauta, DTU Food, Kopenhagen (Dänemark)

16:00–16:30 Uhr

Aufklärung eines Listeriose-Ausbruchs durch kontaminierte Wurstwaren

Dr. Ute Messelhäuser,

Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Oberschleißheim

16:30–17:00 Uhr

Listeriose-Ausbruch in Süddeutschland: Molekulares Tracing mittels NGS

Dr. Sylvia Kleta, Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin

17:00–17:30 Uhr

***Clostridium difficile* als Zoonoseerreger? Ein Update**

Dr. Sven Maurischat, Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin

Ab 18:00 Uhr Get Together im Foyer des Bundesinstituts für Risikobewertung

Freitag, 11. November 2016

09:00–09:30 Uhr

Monitoring of foodborne outbreaks caused by toxin-producing bacteria in the European Union

Dr. Giusi Amore, European Food Safety Authority, Parma (Italien)

09:30–10:00 Uhr

***Bacillus thuringiensis* – ein bedeutender Mikroorganismus für den biologischen Pflanzenschutz**

Dr. Dietrich Stephan, Julius Kühn-Institut, Darmstadt

10:00–10:30 Uhr

Tenazität von Clostridien

Dr. Christian Seyboldt, Friedrich-Loeffler-Institut, Jena

10:30–11:00 Uhr

Targeting *S. aureus* toxin production – for improved food safety and animal health

Dr. Jenny Schelin, Lund University, Lund (Schweden)

11:00–11:30 Uhr Kaffeepause

11:30–12:00 Uhr

How to manage and characterize staphylococcal food poisoning outbreaks: from food vehicle to incriminated source

Dr. Jaques-Antoine Hennekine,

Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, Maisons-Alfort (Frankreich)

12:00–12:30 Uhr

Lebensmittelbedingte Ausbrüche durch bakterielle Toxinbildner in Bayern (2005–2015)

Dr. Ute Messelhäuser,

Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Oberschleißheim

12:30–13:00 Uhr

Dose-response modelling of staphylococcal enterotoxins using outbreak data: which model, which precision?

Dr. Laurent Guillier,

Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, Maisons-Alfort (Frankreich)

13:00–14:00 Uhr Mittagspause

14:00–14:30 Uhr

Von der Taxonomie zum Risiko – Differenzielle *Bacillus cereus* Diagnostik

Prof. Dr. Monika Ehling-Schulz,

Veterinärmedizinische Universität Wien, Wien (Österreich)

14:30–15:00 Uhr

Botulismus: Eine altbekannte Erkrankung stellt uns vor neue Herausforderungen

Dr. Brigitte Dorner, Robert Koch-Institut, Berlin

15:00–15:30 Uhr

Die Tücke steckt im Detail! Herausforderungen und Grenzen des Nachweises von Staphylokokken-Enterotoxinen im Lebensmittel

Dr. Alexandra Fetsch, Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin

15:30 Uhr

Schlusswort

Dr. Juliane Bräunig, Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin

3 Abstracts

3.1 Neues aus dem Zoonosen-Monitoring: Daten für Deutschland, 2014–2015

Dr. Katja Alt, PD Dr. Bernd-Alois Tenhagen, Dr. Istvan Szabo, Dr. Alexandra Fetsch, Dr. Sylvia Kleta, Dr. Angelika Miko, Dr. Elisabeth Hauser, Dr. Kerstin Stingl, Prof. Dr. Annemarie Käsbohrer

Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin

Einleitung

Das Ziel des Zoonosen-Monitorings ist, das Ausmaß der Verbreitung von Zoonoseerregern, die eine besondere Gefahr für die menschliche Gesundheit darstellen, auf verschiedenen Stufen unterschiedlicher Lebensmittelketten zu schätzen. Die rechtlichen Grundlagen dazu bilden die *Richtlinie 2003/99/EG zur Überwachung von Zoonosen und Zoonoseerregern* und die *Allgemeine Verwaltungsvorschrift über die Erfassung, Auswertung und Veröffentlichung von Daten über das Auftreten von Zoonosen und Zoonoseerregern entlang der Lebensmittelkette (AVV Zoonosen Lebensmittelkette)*. Auch werden die Vorgaben des Beschlusses 625/2013/EU zur Überwachung von Antibiotikaresistenzen berücksichtigt, welcher auch spezifische resistente Bakterien adressiert. Das System dient einerseits der Bewertung des Vorkommens von Zoonoseerregern und Antibiotikaresistenzen; andererseits sollen neue Entwicklungen frühzeitig erkannt werden. Betrachtet werden vor allem Lebensmittelketten tierischen Ursprungs, aber auch pflanzliche Lebensmittel und Futtermittel werden im Stichprobenplan berücksichtigt.

Seit dem Jahr 2009 werden mit diesem Instrument wichtige Erkenntnisse zum Vorkommen von Zoonoseerregern und Antibiotikaresistenzen in der Lebensmittelkette in Deutschland gewonnen. Zusammen betrachtet mit den Erkenntnissen aus dem Human- und Umweltsektor leistet das Zoonosen-Monitoring in der Lebensmittelkette einen wichtigen Beitrag zur Beurteilung der Lebensmittelsicherheit im Hinblick auf mikrobielle Risiken in Deutschland und Europa.

Material und Methoden

Das BfR bereitet jährlich einen Stichprobenplan für Querschnittsstudien vor, der die Vorschläge der Bundesländer, weiterer Bundesbehörden sowie die Vorgaben der Europäischen Kommission und die Empfehlungen der Europäischen Lebensmittelsicherheitsbehörde (EFSA) berücksichtigt. Die Durchführung des Zoonosen-Monitorings wird von den Ländern im Rahmen der amtlichen Lebensmittel- und Veterinärüberwachung gewährleistet. Eine für Deutschland repräsentative Auswahl von Proben wird auf allen Produktionsstufen angestrebt. In der Regel beträgt der Probenumfang 384 je untersuchter Matrix und Jahr. Ausnahme sind die Untersuchungen von Geflügel auf *Campylobacter* im Schlachthof, bei denen mehr Proben (>560) zur Erfüllung der von der EU geforderten Mindestzahl an Isolaten für die Resistenztestung nötig sind. Die Proben wurden von den Landesuntersuchungseinrichtungen nach international standardisierten mikrobiologischen Nachweismethoden sowie Empfehlungen der EFSA bzw. des BfR auf die jeweiligen Erreger untersucht. Die Untersuchungsergebnisse wurden von den Einrichtungen der Länder an das Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) übermittelt. Qualitätskontrollen des so gewonnenen Datensatzes beinhalteten die Einhaltung der Vorgaben des Stichprobenplans, wie beispielsweise an der Anzahl untersuchter Proben oder die Angabe der untersuchten Lebensmittelmatrizes und Betriebsarten.

Die untersuchten Erreger umfassten in den Jahren 2014 und 2015 *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Listeria monocytogenes*, VTEC, MRSA und ESBL-/AmpC-bildende *Escherichia coli*. Schwerpunkte bei den betrachteten Lebensmittelketten lagen beim Mastgeflügel sowie beim Milchrind, Schwein (Zucht- und Mastbereich) und kleine Wiederkäuer zur

Milchproduktion. Sonderprogramme stellten ‚frische Kräuter‘, ‚Blattsalate‘ und ‚rohe Garnelen‘ dar.

Gewonnene Isolate wurden an die Nationalen Referenzlabore am BfR zur weiteren Charakterisierung gesandt. Dies umfasste u. a. die Speziesbestätigung und weitere Typisierung.

Ergebnisse und Diskussion

In den Jahren 2014 und 2015 wurden jeweils 6.865 und 6.106 untersuchte Proben dem Zoonosen-Monitoring zugeordnet. Insgesamt war die Erfüllung des Probensolls gut (>90 %). Einschränkungen gab es bei den Programmen zu Sammelmilch von Milchrindern aus ökologisch wirtschaftenden Betrieben (78 %) und zu Rohmilchkäse verschiedener Tierarten (67–85 %).

Im Folgenden werden ausgewählte Ergebnisse nach Bakterienart in Zusammenhang mit den Ergebnissen vergangener Jahre (siehe dazu ‚Berichte zur Lebensmittelsicherheit-Zoonosen-Monitoring‘ unter www.bvl.bund.de) besprochen:

- *Salmonella* spp.

Während in den Jahren 2010 und 2011 noch rund 18 % der Schlachtkörper von Mastputen und Masthähnchen mit Salmonellen kontaminiert waren, waren 2014 nur noch jeweils etwa 7 % der (Hals)hautproben positiv. Ebenso fiel bei frischem Putenfleisch die Prävalenz von 5,8 % (2009) auf 1,7 % (2014). Frische Hähnchenschenkel mit Haut waren 2014 mit 4,7 % seltener positiv als in 2009 untersuchtes, frisches Hähnchenfleisch (7,6 %).

Salmonellen wurden in Ferkelerzeugerbetrieben häufiger in dem Stallbereich identifiziert, in dem die abgesetzten Ferkel und Läufer stehen (10,3 %) als im Wartebereich der Zuchtsauen (5,6 %). Auch die Typisierung der Isolate zeigte Unterschiede zwischen den Bereichen. Während in den Wartebereichen überwiegend *S. Derby* identifiziert wurde, dominierte bei den Läufern die monophasische Variante von *S. Typhimurium*. Die Prävalenz bei den Läufer-schweinen entsprach in etwa der Prävalenz, die im Monitoring 2011 im Mastbereich bei den jüngeren Schweinen (<4 Monate) identifiziert wurde. Die Untersuchungsergebnisse von Schweineschlachtkörpern (4,5 %) und Schweinefleisch im Einzelhandel (0,4 %) entsprachen weitgehend den Ergebnissen von 2011. Schweine- und Rindfleischproben waren im Jahr 2015 wie in den Jahren zuvor gleich belastet (0,4 %).

Aus frischen Kräutern und vorgeschnittenen Blattsalaten gelang aus je einer Probe ein Nachweis (0,3 %) (*S. Subspez. IV*, *S. Berta*).

- *Campylobacter* spp.

Sammelmilchproben aus konventionellen Milchviehbetrieben waren etwas häufiger belastet (2,2 %) als Proben aus ökologischen Betrieben (1,0 %). Die Ergebnisse lagen in derselben Größenordnung der Untersuchungen von Tankmilch im Zoonosen-Monitoring 2009 und 2010.

Beim untersuchten Mastgeflügel waren sowohl die Kotproben aus Blinddarm am Schlachthof (Masthähnchen 50,4 %; Mastputen 68,9 %) als auch Fleisch im Einzelhandel (Hähnchenfleisch 54,0 %; Putenfleisch 25,4 %) deutlich häufiger positiv als in der Vergangenheit (ca. doppelt so häufig am Schlachthof und 10–15 % mehr Nachweise im Fleisch).

- *Listeria monocytogenes*

Proben von Sammelmilch aus konventionellen Milcherzeugerbetrieben waren häufiger positiv (3,5 %) als Proben aus ökologischen Betrieben (1,3 %). Im Jahr 2010 waren Tankmilchproben mit 4,6 % etwas häufiger mit *L. monocytogenes* kontaminiert. Auch in Rohmilch von kleinen Wiederkäuern (1,9 %) sowie in Rohmilchkäse vom Rind (0,3 %), Schaf und Ziege

(0,3 %) gelangen Nachweise. Die identifizierten Serotypen (IIa, IIb und IVb) entsprachen denen der vergangenen Jahre und werden auch bei Infektionen des Menschen regelmäßig beschrieben.

- VTEC

Sammelmilch aus konventionellen Betrieben war etwas häufiger (3,6 %) mit VTEC kontaminiert als Sammelmilch aus ökologischen Betrieben (2,0 %). Die Werte sind mit den Ergebnissen der Vorjahre (2009 und 2010) vergleichbar. Tankmilch aus Milcherzeugerbetrieben von Schafen und Ziegen war dagegen mit 7,3 % deutlich häufiger mit VTEC kontaminiert. Die Nachweise in Rohmilchkäseproben waren vergleichbar unter den Wiederkäuerarten (<1 %). Der humanpathogene Serotyp O26 wurde in einem Isolat aus Tankmilch kleiner Wiederkäuer nachgewiesen.

- MRSA

Sammelmilchproben aus konventionellen Milchviehbetrieben waren deutlich häufiger (9,7 %) kontaminiert als Proben aus ökologischen Betrieben (1,7 %). Der Anteil positiver Proben war deutlich höher als in den Jahren 2009 und 2010 (<5 %).

MRSA kamen in Sockentupferproben aus dem Aufzuchtbereich von Läufern häufiger (41,3 %) als aus dem Wartebereich von Zuchtsauen (26,3 %) vor. Die Belastung von frischem Schweinefleisch (13,1 %) war vergleichbar mit Ergebnissen aus dem Jahr 2009. Wie in den vergangenen Jahren waren die meisten Isolate dem klonalen Komplex CC398 zuzuordnen.

- ESBL-/AmpC-bildende *E. coli*

Der selektive Nachweis in Erzeugerbetrieben von Zuchthühnern der Legerichtung (39,3 %) und von Legehennen (45,6 %) gelang häufig. Dagegen wurde auf der Schale von Konsumiern ESBL/AmpC bildende *E. coli* mit 0,5 % positiver Poolproben deutlich seltener gefunden. In Ferkelerzeugerbetrieben waren jeweils etwa die Hälfte der untersuchten Proben von Zuchtsauen (53,9 %) und Läufern (47,6 %) positiv. Ähnlich wie in der Lebensmittelkette Huhn und Rindfleisch im Jahr 2013 wurde ebenfalls eine Reduktion hin zum Einzelhandel beobachtet, wo ca. 6 % der Schweinefleischproben kontaminiert waren.

Proben von vorgeschnittenen Blattsalaten und frischen Kräutern waren ähnlich häufig belastet (ca. 2 %).

Fazit

Die Erfolge der EU-weiten Salmonellen-Bekämpfungsmaßnahmen in den Geflügelbeständen schlagen sich auch weiterhin in den jeweiligen Lebensmittelketten nieder. Bei Mastputen und Masthähnchen ist die Kontaminationsrate sowohl der Schlachtkörper als auch des frischen Fleisches mit Salmonellen weiter gesunken. Andererseits zeigen die Ergebnisse für die Geflügel-Lebensmittelketten, dass bei der Verringerung von *Campylobacter* spp. in den letzten Jahren keine Fortschritte erzielt wurden. Mängel im Schlachtprozess führen zu einer Verunreinigung der Schlachtkörper, insbesondere des Geflügelfleisches mit durch Fäkalien übertragenen *Campylobacter*. Auf europäischer Ebene wird daher u. a. über die Einführung eines mikrobiologischen Grenzwertes für *Campylobacter* spp. auf Geflügelhalshaut nach Schlachtung und Kühlung diskutiert, um die quantitative Belastung mit dem Erreger zu verringern. Insgesamt ist bemerkenswert, dass alle am Schlachthof untersuchten Tierarten (Masthähnchen, Mastpute, Mastschwein, Mastkalb/Jungrind) mehrheitlich mit *Campylobacter* spp. besiedelt sind (Prävalenzen zwischen 50,4 % und 73,1 %). Entscheidend für die Prävalenz auf dem Lebensmittel scheint der Schlachtprozess mit der damit verbundenen fäkalen Kontamination zu sein, da große Unterschiede in dem prozentualen Anteil der *Campylobacter* positiven Fleischproben in der Geflügel- und Rotfleischkette auftraten. Auch bei MRSA zeigte sich weiter eine hohe Nachweisrate im Endprodukt Putenfleisch.

Insgesamt war Schweinefleisch und Rindfleisch sehr selten mit Salmonellen belastet.

In Proben aus dem Aufzuchtbereich von Läufern wurden sowohl Salmonellen als auch MRSA häufiger isoliert als aus dem Wartebereich von Zuchtsauen. Von den weiter vermarkteten Läufern geht damit ein Risiko für die Einschleppung von Zoonoseerregern in die Mastbetriebe aus. Jedoch deuten die Ergebnisse im Einzelhandel darauf hin, dass der Schlachtprozess bei Schweinen und die Verarbeitung des Fleisches die Kontamination des Fleisches mit enteralen Zoonoseerregern deutlich vermindert. Es ist festzuhalten, dass nach wie vor der häufige Tierkontakt als der Hauptübertragungsweg für eine Besiedlung bzw. Infektion des Menschen mit „Nutztier-assoziierten“ MRSA-Stämmen gilt.

Sammelmilchproben aus konventionellen Milchviehbetrieben waren etwas häufiger mit allen untersuchten Zoonoseerregern belastet als Proben aus ökologischen Betrieben. Möglicherweise spiegelt dieses Ergebnis Unterschiede im Antibiotikaeinsatz zwischen beiden Wirtschaftsweisen oder andere Unterschiede wie Bestandsgröße, regionale Verteilung oder Tierherkunft wider. Diese Parameter wurden jedoch nicht erfasst oder untersucht. Über Rohmilch muss jedoch, unabhängig von der Wirtschaftsform, mit einem Eintrag von Zoonoseerregern in die Lebensmittelkette gerechnet werden. Auch von nicht wärmebehandelter Rohmilch und Rohmilchprodukten von Schafen und Ziegen kann ein Risiko für eine Infektion des Menschen mit VTEC ausgehen, da vereinzelt O-Gruppen nachgewiesen wurden, die als häufige Erreger von EHEC-Infektionen und des hämolytisch urämischen Syndroms bekannt sind. Empfindlichen Verbrauchergruppen wie Kleinkindern, älteren und immunsupprimierten Menschen sowie Schwangeren sollte deshalb vom Konsum von Rohmilchprodukten abgeraten werden. Rohmilch sollte vor dem Verzehr grundsätzlich durcherhitzt werden. Der über die Jahre zu verzeichnende Anstieg des Nachweises von MRSA in der Tankmilch deutet auf ein zunehmendes veterinärmedizinisches Problem mit MRSA als Mastitiserreger beim Milchrind hin.

Der seltene Nachweis auf Konsumeiern weist auf ein eher geringes Risiko für Verbraucher hin, über Konsumeier mit *Campylobacter* spp. oder ESBL-AmpC-bildenden *E. coli* in Kontakt zu kommen.

Die Ergebnisse zu frischen Kräutern und vorgeschnittenen Blattsalaten unterstreichen die Empfehlung, diese vor dem Verzehr gründlich zu waschen. Besonders da diese Lebensmittel häufig roh verzehrt werden, stellen sie eine mögliche Quelle von Infektionen und/oder Besiedlungen mit Zoonoseerregern und/oder resistenten Keimen für den Menschen dar.

Danksagung

Die Autorinnen und Autoren danken den Behörden und Untersuchungseinrichtungen der Länder und dem Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit sowie den Mitarbeitern aus den Referenzlaboren des BfR, ohne deren Unterstützung die erfolgreiche Durchführung des Zoonosen-Monitorings nicht möglich wäre.

3.2 Salmonellose-Meldezahlen – Trends der letzten Jahre

Dr. Christina Frank

Robert Koch-Institut, Berlin

In Deutschland ist jede labordiagnostisch nachgewiesene akute Infektion des Menschen mit Salmonellen (*Salmonella enterica*) meldepflichtig nach §7 IfSG (Fälle von Typhus und Paratyphus werden getrennt erfasst und sind hier nicht dargestellt).

Die Meldung erfolgt vom Labor an das zuständige lokale Gesundheitsamt; Serovar-Informationen müssen ggf. nachgemeldet werden, jedoch unterbleibt die Serotypie auch häufig. Nach Ermittlung weiterer Falldetails, übermittelt das Gesundheitsamt den Fall pseudonymisiert weiter an Landes- und Bundesebene, wo die Daten beim Robert Koch-Institut für bundesweite Trendanalysen ausgewertet werden können. Dabei ist zu bedenken, dass die Meldung von Fällen abhängig von den Diagnose-Schemata der behandelnden Ärzte bei Durchfall-Patienten ist. Die erregerspezifische Diagnostik ist für die Behandlung der meisten Durchfall-Patienten kein informationeller Zugewinn und unterbleibt insbesondere bei gestiegenem Kostendruck, Budgetfragen und Rationalisierungen im Gesundheitswesen. Darüber hinaus fehlen auch Patienten, die gar nicht zum Arzt gehen in der Statistik. Dabei sind das Arztverhalten und insbesondere das Arztverhalten bei der Diagnostik durch Veränderungen der medizinischen Abrechnungssysteme Schwankungen unterworfen, die die Zahlen erheblich beeinflussen können.

In den letzten 5 Jahren mit vollständigen Meldedaten (2011–2015) hat sich die Abnahme der gemeldeten Salmonellosen weiter fortgesetzt: Wurden 2011 bundesweit noch über 24.000 Fälle gemeldet, waren es 2015 nur noch knapp unter 14.000. Nur 0,1 % der Fälle betreffen Infektionen mit anderen Salmonellen-Subspezies als *S. enterica* Subspezies *enterica* (ssp I). Die beiden wichtigsten Serovare *S. Enteritidis* und *S. Typhimurium* wurden 2011–2015 bei insgesamt 31 % bzw. 32 % aller Fälle nachgewiesen; 14 % hatten Nachweise anderer Serovare (Anteil mehr als verdoppelt gegenüber 2006–2010), bei 13 % wurde nur auf der Gruppenebene typisiert (Anteil verdoppelt gegenüber 2006–2010) und 9 % wurden gar nicht serotypisiert (Anstieg um 48 % gegenüber 2006–2010). Während im 5-Jahres-Zeitraum 2006–2010 die gemeldeten *S. Enteritidis*-Infektionen um 71 %, Infektionen mit *S. Typhimurium* aber um nur 24 % abnahmen, betraf die relative Abnahme im Zeitraum 2011–2015 beide Hauptserovare annähernd gleich (*S. Enteritidis*: 53 %, *S. Typhimurium*: 55 %). Das Altersmittel der Erkrankten ist zwischen 2011 und 2015 leicht von 32 Jahren auf 35 Jahre angestiegen. Es sind konstant um 49 % der Erkrankten weiblichen Geschlechts.

Die gemeldeten Fälle von Salmonellose beim Menschen in Deutschland gehen weiter zurück. Es ist aber wahrscheinlich, dass ein Teil des Rückganges auf verändertes Verhalten von Patienten und Ärzten (z. B. Zurückhaltung bei Stuhluntersuchungen) zurückgeht. Der diskrepant höhere Rückgang der *S. Enteritidis*-Infektionen gegenüber *S. Typhimurium* der Vorjahre, der vor allem auf die Maßnahmen (Impfungen) in der Primärproduktion von Geflügel erklärt wurde) scheint gestoppt. Der steigende Anteil an Infektionen mit anderen Serovaren als *S. Enteritidis* und *S. Typhimurium* ist vermutlich Änderungen im Serotypisierungsverhalten der Labore geschuldet. Mit knapp 14.000 Fällen im Jahr 2015 bleibt die Salmonellose jedoch eine der häufigsten in Deutschland gemeldeten bakteriellen Infektionen des Menschen.

3.3 Salmonellen in Nutztieren, Lebens- und Futtermitteln in Deutschland: Bericht aus dem NRL *Salmonella*

Dr. Istvan Szabo

Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin

Das Nationale Referenzlabor zur Durchführung von Analysen und Tests auf Zoonosen (Salmonellen) NRL *Salmonella* erhält *Salmonella*-Einsendungen von Landeslaboratorien, privaten Untersuchungseinrichtungen und Universitäten. Im Rahmen seiner Routinediagnostik, inbegriffen der gesetzlich vorgeschriebenen Bekämpfungsprogramme und Monitoring- bzw. Prävalenzstudien gemäß Verordnung (EG) Nr. 2160/2003 und Richtlinie 2003/99 EG, werden ca. 99 % der Einsendungen der Gattung *Salmonella* zugeordnet und weiter charakterisiert.

Das NRL *Salmonella* erhielt im Jahr 2015 3390 *Salmonella*-Isolate. 54,7 % der Isolate stammten aus Tieren, 19,8 % der Isolate aus Lebensmitteln, 11 % aus Futtermitteln, 6,6 % aus der Umwelt und weitere 7,9 % aus sonstigen Quellen. Ein Großteil (67,2 %) der Tierisolate stammt aus Nutztieren, davon 58 % aus der Schweineproduktion und 32 % aus der Geflügelproduktion. Das dominierende Serovar beim Schwein war mit 66 % *S. Typhimurium* – wobei zwei Drittel dieser Isolate auf die monophasische Variante entfiel – gefolgt von *S. Derby*. Bei Legehennen waren *S. Enteritidis*, *S. Mbandaka* und *S. Typhimurium*, in der Broilerproduktion *S. Enteritidis*, *S. Infantis* und *S. Paratyphi B dTartrat+* die meisten nachgewiesenen Serovare.

Die häufigsten Isolate aus dem Lebensmittelbereich stammten aus Fleisch und Fleischprodukten von Schwein und Geflügel und konnten als *S. Typhimurium* (9,8 %) und dessen monophasischen Variante (19,1 %), gefolgt von *S. Derby* (9,3 %), *S. Infantis* (9 %) und *S. Subspecies I. Rauform* (9 %) bestätigt werden.

Die aus Futtermitteln stammenden Isolate zeigen eine hohe Diversität und jährlich wechselnde Häufigkeit der dominierenden Serovare. In 2015 waren *S. Livingston*, *S. Goldcoast* und *S. Senftenberg* die am häufigsten aus Futtermitteln isolierten Serovare.

In den letzten Jahren ist ein Anstieg der Einsendungen aus dem Bereich Heim- und Zootiere zu beobachten, was insbesondere an einem höheren Anteil an Isolaten von Reptilien liegt.

3.4 Kleinkind-Salmonellosen durch Reptilien im Haushalt

Dr. Wolfgang Rabsch

Robert Koch-Institut, Wernigerode

Einleitung

Reptilien spielen als Haustiere eine stetig zunehmende Rolle in Deutschland. Laut Industrieverband Heimtierbedarf (IVH) wurden 2015 mittlerweile in 1 % der Haushalte ein oder mehrere Reptilien, Amphibien oder wirbellose Tiere in 0,7 Millionen Terrarien in Deutschland gehalten. 2009 waren es nur 0,4 Millionen Terrarien. Die steigende Zahl der Reptilienliebhaber geht einher mit einer steigenden Zahl von *Salmonella*-Infektionen bei Kindern, was es notwendig macht, auf die Risiken hinzuweisen und an hygienische Verhaltensregeln im Umgang mit Reptilien zu erinnern. Eine Infektion erfolgt wahrscheinlich durch direkten Kontakt mit Reptilien oder indirekt nach dem Reinigen der Terrarien durch Kot und Stäube. Über das Vorkommen von Salmonellen bei Reptilien gibt es zahlreiche Berichte, wobei die meisten Isolate „exotische“ Serovare sind. Auch diese Serovare müssen als humanpathogen eingestuft werden. Dass es ein grundsätzliches Risiko der Keimübertragung auf den Menschen gibt, und hierbei Kinder ein besonderes Risiko darstellen, ist ebenfalls bekannt und häufig beschrieben, dennoch wird die Thematik unter Tierärzten wie auch unter Haltern sehr kontrovers und nicht immer objektiv diskutiert.

Salmonellen als Krankheitsursache bei Reptilien

Salmonellen werden in einer hohen Prävalenz studienabhängig zwischen 30 % und 90 % bei gesunden Reptilien nachgewiesen(1, 2, 3). Dabei handelt es sich in der Regel um mehr als ein Serovar. Der alleinige Nachweis von Salmonellen im Kot von Reptilien ist ohne klinische Symptomatik diagnostisch nicht aussagekräftig, und es erscheint auch wenig sinnvoll, eine Salmonellenfreiheit bei Reptilien durch antibiotische Behandlungen erreichen zu wollen. Allerdings werden auch bei Reptilien - zumeist in Einzelfällen - Salmonelleninfektionen mit der Entstehung einer klinischen Symptomatik in Zusammenhang gebracht, bzw. aus Lokalisationen isoliert, wo sie eine krankheitsverursachende Bedeutung haben. Weitere klinische Anzeichen, die im Zusammenhang mit Salmonelleninfektionen bei Reptilien beobachtet werden, sind chronische Abmagerung, Septikämie, Osteomyelitis, die Entstehung von Abszessen und plötzliche Todesfälle. Es gilt als wahrscheinlich, dass begünstigende Faktoren wie Haltungfehler oder virale Primärinfektionen eine Rolle bei der Entstehung der klinischen Symptomatik spielen (4).

Reptilien-assoziierte Salmonellose beim Menschen (*Reptile Exotic Pet Associated Salmonellosis*, REPAS)

Die mögliche Verbindung zwischen Reptilien und Erkrankungen durch Salmonellen beim Menschen wurde bereits vor vielen Jahren diskutiert. Insbesondere in den USA wurde in den 1960er Jahren eine Zunahme an solchen Fällen gesehen, woraufhin der Handel mit Schildkröten mit einer Panzerlänge von unter 10 cm verboten wurde, um insbesondere die Problematik der Übertragung auf Kinder zu reduzieren. Verschiedene Veröffentlichungen zeigen anhand von Fallbeispielen, dass das zoonotische Problem nicht nur vorhanden, sondern auch von zunehmender Bedeutung ist.(1,5–12) Während die meisten Berichte über REPAS bei Kleinkindern und Babys vorliegen, gibt es auch Einzelberichte über das Vorkommen bei Erwachsenen.(13) Die klinische Symptomatik umfasst dabei insbesondere gastrointestinale Symptome, aber auch weitergehende Veränderungen wie Septikämie und Meningitis.(7–9,14) Verschiedene Schätzungen nehmen an, dass REPAS-Fälle zwischen 3 und 10 % aller Salmonellenfälle beim Menschen (bezogen auf Nordamerika) ausmachen.(1,15,16)

Aktuelle Daten zu reptilien-assoziierten Salmonellosen in Deutschland

In Zusammenarbeit mit dem Robert Koch-Institut, Bereich Wernigerode, haben Institute der veterinärmedizinischen Fakultät gezielt und bundesweit Reptilien beprobt, die im Haushalt

von an „exotischen“ Salmonellen erkrankten Kleinkindern leben. Die nach Anreicherung nachgewiesenen Salmonellen wurden nicht nur bzgl. des Serovars verglichen, sondern es wurde ein genetischer Vergleich mittels Pulse-Field-Gel-Elektrophorese durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten in der Mehrzahl der Fälle, dass der entsprechende krankheitsverursachende Erreger der Kleinkinder auch bei den in dem Haushalt lebenden Reptilien gefunden wurde. Dabei gab es eine eindeutige Speziesdisposition. Ebenso wurden in den meisten Haushalten mit Übereinstimmungen hygienische Mängel festgestellt, die für die Übertragung verantwortlich sein könnten.

Schlussfolgerungen

Den Zusammenhang zwischen Salmonellen bei Reptilien und Salmonellose bei Kleinkindern und Babys zu leugnen, ist aus human- und veterinärmedizinischer Sicht fahrlässig und gefährlich. In den vergangenen zwei Jahrzehnten wurde aus vielen Ländern und in zunehmendem Maße auch aus Deutschland über Infektionen durch Salmonellen berichtet, die mit dem direkten oder indirekten Kontakt zu Reptilien assoziiert waren (17). Es sind sowohl Einzelfallberichte als auch Fall-Kontrollstudien publiziert worden. Überwiegend erkrankten Säuglinge und Kleinkinder an diesen Infektionen. Die steigende Zahl privat gehaltener Reptilien geht offensichtlich einher mit einer steigenden Zahl von *Salmonella*-Infektionen bei Kindern. Es ist vielen Menschen - auch in Deutschland - nicht bekannt, dass bis zu 90 % der Reptilien Träger und Ausscheider von Salmonellen und damit Infektionsquellen sind. Das macht es notwendig, auf die bestehenden Infektionsrisiken hinzuweisen und an hygienische Verhaltensregeln im Umgang mit Reptilien zu erinnern. Grundsätzlich gelten Kinder unter fünf Jahren, aber auch immunsupprimierte Personen, ältere Menschen und chronisch kranke Personen als besonders gefährdet. Besonders **Pädiater** sollten diese Infektionsmöglichkeit kennen. Die Deutsche Gesellschaft für Pädiatrische Infektiologie (DGPI) vertritt auch die Meinung, dass in Familien mit Säuglingen und Kindern unter fünf Jahren keine Reptilien als Heimtiere gehalten werden sollten (18).

Dem **Tierarzt** kommt dabei zweifelsohne auch eine wichtige Bedeutung zu.

Grundsätzliche Forderungen zur Risikominimierung sind:

- Sachkenntnis der Halter (Eltern) zur Reptilienhaltung, da suboptimale Haltungsbedingungen das Immunsystem der Tiere schwächen und somit eine massive Ausscheidung von Salmonellen stattfinden kann
- Kenntnis einfacher Reinigungs- u. Desinfektionsmaßnahmen
- Trennung der Terrarien bzw. Reinigungseinrichtungen von allgemeinen Hygieneeinrichtungen im Haushalt
- Räumliche Trennung der Terrarien (nicht im Kinderzimmer, Küche, Bad)
- Reptilien sollten so untergebracht werden, dass ein direkter Kontakt zu Babys/Kleinkindern sowie eine Übertragung über Vektoren ausgeschlossen ist

Literatur

1. Woodward DL, Khakhria R, Johnson WM. (1997): Human salmonellosis associated with exotic pets. *J Clin Microbiol.* 1997;35(11):2786-90.
2. Hatt JM, Fruth A, Rabsch W. Aktuelle Informationen zu reptilienassoziierten Salmonellose. *Tierärztl Prax* 2009;37(K):188-193.
3. Pees M, Schmidt V, Marschang RE, Heckers KO, Krautwald-Junghanns ME. Examinations on the prevalence of viral infections in captive collections of boid snakes in Germany, *Vet Rec* 2010;166:422-5.
4. Schmidt V, Marschang RE, Abbas MD, Ball I, Szabo I, Helmuth R, Plenz B, Spersger J, Pees M. Detection of pathogens in Boidae and Pythonidae with and without respiratory disease. *Vet Rec* 2013;DOI 10.1136/vr.100972.
5. Willis C, Wilson T, Greenwood M, Ward L. Pet reptiles associated with a case of salmonellosis in an infant were carrying multiple strains of *Salmonella*. *J Clin Microbiol* 2002;40(12):4802-3.
6. Bertrand S, Rimhanen-Finne R, Weill FX, Rabsch W, Thornton L, Perevoscikovs J, van Pelt W, Heck M. *Salmonella* infections associated with reptiles: The current situation in Europe. *Eurosurveillance* 2008;13:18902.
7. Van Meervenne E, Botteldoorn N, Lokietek S, Vatlet M, Cupa A, Naranjo M, Dierick K, Bertrand S. Turtle-associated *Salmonella* septicaemia and meningitis in a 2-month-old baby. *J Med Microbiol* 2002;58(10):1379-81.

8. Tabarani CM, Bennett NJ, Kiska DL, Riddell SW, Botash AS, Domachowske JB. Empyema of preexisting subdural hemorrhage caused by a rare salmonella species after exposure to bearded dragons in a foster home. *J Pediatr* 2010;156 (2):322-3.
9. Haase R, Beier T, Bernstadt M, Merkel N, Bartnicki J. Neugeborenensepsis durch *Salmonella* apapa nach Reptilienkontakt im Haushalt. *Z Geburtsh Neonatol* 2011;215(2):86–8.
10. Weiss B, Rabsch W, Prager R, Tietze E, Koch J, Mutschmann F, Roggentin P, Frank C. Babies and bearded dragons: sudden increase in reptile-associated *Salmonella enterica* serovar Tennessee infections, Germany 2008. *Vector Borne Zoonot Dis.* 2011;11(9):1299–301.
11. Hernández E, Rodríguez JL, Herrera-León S, García I, de Castro V, Muniozguren N. Salmonella Paratyphi B var Java infections associated with exposure to turtles in Bizkaia, Spain, September 2010 to October 2011. *Eurosurveillance* 2011;17(25), 21 Juni.
12. Center for Disease Control and Prevention. Outbreak of Salmonellosis associated with Pet Turtle Exposures - United States, 2011. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 2012;61(3):79.
13. Stam F, Romkens TEH, Hekker TAM, Smulders YM. Turtle-associated human salmonellosis. *Clin Infect Dis* 2003;37(11):e167-9.
14. Chiodini RJ, Sundberg JP. Salmonellosis in reptiles: a review. *Am J Epidemiol* 1981;113(5):494–9.
15. Mermin J, Hutwagner L, Vugia D, Shallow S, Daily P, Bender J, Koehler J, Marcus R, Angulo FJ. Reptiles, amphibians, and human Salmonella infection: a population-based, case-control study. *Clin Infect Dis* 2004;38 Suppl 3:S253-61.
16. Warwick C, Lambiris AJ, Westwood D, Steedman C. Reptile-related salmonellosis. *J R Soc Med* 2001;94(3):124–6.
17. Robert Koch-Institut: Salmonella-Infektionen bei Säuglingen und Kleinkindern durch exotische Reptilien. *Epidemiologisches Bulletin*, 9 (2013) 71-79.
18. DGPI Handbuch Infektionen bei Kindern und Jugendlichen, 6. Auflage 2013, Georg Thieme Verlag Stuttgart New York.

3.5 Salmonellen in Futtermitteln – Bewertung und Handlungsoptionen

PD Dr. Bert-Andre Zucker

Senatsverwaltung für Justiz und Verbraucherschutz, Berlin

Einleitung

Entsprechend dem wissenschaftlichen Gutachten des Gremiums für biologische Gefahren (BIOHAZ) der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA) bezüglich der mikrobiologischen Risikobewertung von Futtermitteln für zur Nahrungsmittelerzeugung genutzte Tiere (1) stellen Salmonellen die Hauptgefahrenquelle für eine mikrobielle Kontamination von Tierfutter dar. Die an der amtlichen Futtermittelüberwachung der Länder und des Bundes beteiligten Behörden haben eine Handlungsempfehlung zum Umgang mit Salmonellahaltigen Futtermitteln erarbeitet (2), mit dem Ziel eine weitere Verbreitung dieser Erreger entlang der Futtermittel- und Lebensmittelkette effektiv zu unterbinden. Wesentliche Elemente der Handlungsempfehlung sind die rechtliche Bewertung von Salmonella-Kontaminationen in Futtermitteln, die Beschreibung von Maßnahmen, die beim Nachweis einer Salmonella-Kontamination einzuleiten sind, sowie die Darstellung verschiedener Behandlungsmöglichkeiten kontaminierter Futtermittel.

Bewertung von *Salmonella*-Kontaminationen in Futtermitteln

Hinsichtlich der Pathogenität der verschiedenen *Salmonella*-Serovare betont die EFSA in ihrer o.g. Risikoeinschätzung Folgendes: „Obwohl nur ein Teil der in Futtermitteln nachgewiesenen Salmonella-Serovare klinische Erkrankungen bei Tieren hervorruft, können alle diese Serovare pathogen für den Menschen sein“. Da Salmonellen beim Menschen in erster Linie auf die Aufnahme kontaminierter Lebensmittel zurückzuführen sind und in verschiedenen Fällen eine Kontamination von Lebensmitteln tierischer Herkunft mit diesen Krankheitserregern ursächlich auf mit Salmonellen kontaminierte Futtermittel zurückgeführt werden konnte, dürfen Futtermittel für Lebensmittel liefernde Tiere sowohl aus Gründen des Verbraucherschutzes als auch aus Gründen der Erhaltung der Gesundheit und Leistungsfähigkeit der Nutztiere keine Bakterien der Gattung *Salmonella* enthalten. D. h., Futtermittel, in denen Salmonellen nachgewiesen wurden, unabhängig davon, um welche Serovare es sich handelt, dürfen nach Artikel 15 Absatz 1 der Verordnung (EG) Nr. 178/2002 weder in Verkehr gebracht noch an der Lebensmittelgewinnung dienende Tiere verfüttert werden. Es handelt sich hierbei um nicht sichere Futtermittel im Sinne des Artikels 15 Abs. 2 der VO (EG) Nr. 178/2002, da bei diesen Futtermitteln vor dem Hintergrund ihrer *Salmonella*-Belastung davon auszugehen ist, dass sie die Gesundheit von Mensch oder Tier beeinträchtigen können.

Maßnahmen beim Nachweis von *Salmonella*-Kontaminationen

Bei Bekanntwerden eines positiven *Salmonella*-Befundes (z. B. Ergebnis einer amtlichen Probenuntersuchung, Ergebnis der Eigenkontrolle von Unternehmen, RASFF-Meldungen) hat die zuständige Futtermittelüberwachungsbehörde notwendige Anordnungen und Maßnahmen zum Schutz vor Gefahren für die Gesundheit zu treffen. Dieses betrifft insbesondere das Anordnen eines Verbots des Inverkehrbringens der betroffenen Futtermittel sowie das Überwachen bzw. Anordnen von Maßnahmen, die auf die Rücknahme der betroffenen Futtermittel durch den Inverkehrbringer abzielen. Bei Futtermitteln, die nicht in den Verkehr gebracht wurden, aber zur unmittelbaren Verfütterung vorgesehen sind, ist ein Verbot des Verfütterns auszusprechen.

Weiterhin haben die verantwortlichen Futtermittelunternehmer entsprechende Maßnahmen zu treffen, die von der zuständigen Behörde zu überwachen sind. Hierzu zählen insbesondere:

- das Einleiten von Verfahren, um das kontaminierte Futtermittel vom Markt zu nehmen,
- Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen in Produktions-, Lager- und Transporteinrichtungen, die mit kontaminierten Futtermitteln in Kontakt gekommen sein können,
- die Ursachenforschung bezüglich möglicher *Salmonella*-Eintragspfade und anschließende Evaluierung vorhandener Verfahren, die eine Einschleppung von Salmonellen verhindern sollen (z. B. HACCP-Konzepte).

Behandlungsmöglichkeiten kontaminierter Futtermittel

Werden *Salmonella*-haltige Futtermittel einem geeigneten Behandlungsverfahren unterzogen, bei dem die vorhandenen Erreger abgetötet werden, können diese Futtermittel (wieder) in den Verkehr gebracht und verfüttert werden. In der Praxis finden vor allem chemische Verfahren (Zusatz von antimikrobiell wirkenden Substanzen) sowie physikalische Verfahren (insbesondere thermische bzw. hydrothermische sowie thermisch-mechanische Verfahren) für eine Behandlung von mit Salmonellen belasteten Futtermitteln Anwendung.

Nach gegenwärtigem Kenntnisstand führen das Pelletieren in Kombination mit einer Langzeitkonditionierung (Prozessparameter der Konditionierung: Temperatur ≥ 85 °C, Einwirkzeiten ≥ 4 min) und die Druckkonditionierung (Expandieren/Extrudieren mit Prozesstemperaturen von > 110 °C über mehrere Sekunden und einem Druck von > 25 bar) zu einer sicheren Abtötung von Salmonellen in Futtermitteln. Das Pelletieren in Kombination mit einer Kurzzeitkonditionierung (konventionelles Pelletieren) sowie der Einsatz von organischen Säuren können zwar zu einer signifikanten Reduktion einer *Salmonella*-Kontamination in Futtermitteln führen, es kann aber nicht in jedem Fall von einer sicheren Abtötung aller im Futtermittel vorhandenen Salmonellen ausgegangen werden.

Nach einer erfolgreichen Hygienisierung von Futtermitteln ist zu beachten, dass diese anschließend wieder rekontaminiert werden können. Insbesondere Kühlungsprozesse, die sich an den Toastungsprozess bei der Herstellung von Extraktionsschroten oder den Pelletierprozess von Mischfuttern anschließen, bedürfen in diesem Zusammenhang besonderer Aufmerksamkeit.

Literatur

1. Microbiological risk assessment in feedingstuffs for food-producing animals. Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards. The EFSA Journal 2008; 720: 1-84.
2. Handlungsempfehlung zum Umgang mit *Salmonella*-haltigen Futtermitteln der LAV Arbeitsgruppe Futtermittel, Stand November 2015.

3.6 Perspektiven für die Salmonellenbekämpfung in der Schweinemast durch stringendere Überwachung der vorgelagerten Stufen

Dr. Anja Rostalski

Fachabteilung Schweinegesundheitsdienst des TGD Bayern e. V., Poing

Seit 2007 ist in Deutschland die Schweine-Salmonellen-Verordnung in Kraft, nach der alle Betriebe mit mehr als 50 Mastplätzen verpflichtet sind, über regelmäßige serologische Untersuchungen jährlich ihren Salmonellen-Status zu ermitteln. Bereits zuvor in 2002 begann das deutsche Prüfsiegelprogramm „QS“ mit der Salmonellen-Pflichtuntersuchung bei ihren teilnehmenden Betrieben und der Etablierung einer entsprechenden Datenbank (Qualiproof). Ziel dieser Maßnahmen war und ist es, mögliche Salmonellen-Einträge in die Lebensmittelkette über schweinefleischhaltige Produkte zu verhindern. Anhand der Quartalsuntersuchungsergebnisse werden die Betriebe in die Risikokategorien I-III eingeteilt. Betriebe der Kategorie III werden an das Ende eines Schlachttages gestellt und müssen mittlerweile bei einzelnen Schlachtunternehmen mit finanziellen Abschlägen rechnen. Natürlich sind sie darüber hinaus lt. Verordnung verpflichtet, Maßnahmen zur Salmonellen-Reduktion im Bestand zu ergreifen. Wie wenig erfolgreich das bislang war, zeigen die regelmäßigen Auswertungen der Qualiproof-Datenbank. Seit Beginn der Untersuchungspflicht ist der Anteil der Kat.III-Betriebe gleich geblieben bzw. sogar leicht gestiegen. Außerdem verbleiben immer mehr Betriebe dauerhaft in dieser Kategorie, trotz laufender Beratung und Reduktionsmaßnahmen. Parallel dazu hat sich der Anteil der Kat. II-Betriebe vervierfacht.

Eine Fokussierung auf den Bereich der reinen Schweinemast scheint somit nicht ausreichend zu sein. Betrachtet man die Anstrengungen der Geflügelbranche in der Bekämpfung von *S. enteritidis*, so stellte sich hier ein nachhaltiger Erfolg erst nach Inklusion der Brütereien und Elterntierherden in die Sanierungskonzepte ein. Im Bereich der Ferkelerzeugung besteht in Deutschland bislang keine Untersuchungspflicht, daher liegen auch keine flächendeckenden Daten über die Salmonellen-Prävalenz in unseren Sauenbeständen vor. Laut EFSA liegt in Europa die Prävalenz von *S. typhimurium* bei Sauen bei 45 %, von *S. derby* bei 16 % und von *S. enteritidis* bei 3 %. Das große Problem bei gerade diesen Serovaren besteht in den i.d.R. subklinisch verlaufenden Infektionen beim Schwein. In der Praxis wird auf Salmonellen nur bei klinischem Verdacht untersucht, wobei hier eher die primär wirtsspezifischen Serovare wie *S. choleraesuis* oder *typhisuis* nachgewiesen werden. Den oft völlig symptomlosen Infektionen mit *S. typhimurium* kommt man nur durch Zufall auf die Spur, und wenn man sie gezielt sucht, wird man auch nicht immer fündig.

Die verschiedenen in Deutschland tätigen Zuchtunternehmen untersuchen ihre Herdbuchbetriebe oft nach eigenen Kriterien und meist nur serologisch auf Salmonellen. Es ist unrealistisch, davon auszugehen, dass salmonellenfreie Tiere produziert und ausgeliefert werden. Die modernen Vermarktungs-, Management- und Haltungsbedingungen bieten hohes Vermehrungs- und Verteilungspotential bis hinein in die Ferkelaufzucht, sodass im Mastbetrieb nicht selten von einer Boosterung latent infizierter Schweine ausgegangen werden kann. Hier muss national noch eine Menge Aufklärungsarbeit geleistet werden, um Züchter wie Ferkelerzeuger nicht nur vom Sinn regelmäßiger serologischer Salmonellenscreenings zu überzeugen, sondern sie auch zu entsprechenden Sanierungsmaßnahmen zu bringen. Erschwert werden solche Bemühungen dadurch, dass mittlerweile in vielen Ställen Tiere aus dem EU-Ausland gemästet werden, über deren Gesundheitsstatus sich nur selten Konkretes in Erfahrung bringen lässt.

3.7 Eine Vision? Reduzierung von Zoonoseerregern in der Lebensmittelkette als strategisches Ziel des MNKP für die Zukunft

Ursula Müller/Martin Schnabel

Niedersächsisches Ministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz/Sächsisches Staatsministerium für Soziales und Verbraucherschutz, Hannover/Dresden

Gemäß Art. 41 der VO (EG) Nr. 882/2004 erstellt jeder Mitgliedstaat einen einzigen integrierten mehrjährigen nationalen Kontrollplan (MNKP).

Infolge der föderalen Struktur besteht der MNKP der Bundesrepublik Deutschland gemäß Art. 10 der AVV-RÜb aus einem länderübergreifenden Teil I („Rahmenplan“) und den einzelnen integrierten mehrjährigen Kontrollplänen der Länder Teil II. Die Erstellung des MNKP obliegt dem Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft unter Berücksichtigung der jeweiligen Jahresberichte der Länder.

Im MNKP sind für die Periode 2012 bis 2016 **strategische Ziele** formuliert.

Für die Periode 2017 bis 2021 müssen diese Ziele fortgeschrieben werden oder neue strategische Ziele sind zu erarbeiten. Hierzu hat die *Länderarbeitsgemeinschaft Verbraucherschutz* (LAV) ihre Arbeitsgruppe „*Fleisch- und Geflügelfleischhygiene und fachspezifische Fragen von Lebensmitteln tierischer Herkunft*“ (AFFL) beauftragt, für die Periode 2017-2021 zwei **konkrete** strategische Ziele für das ehemalige strategische Ziel unter III (Entwicklung von Konzepten zum frühzeitigen Erkennen und Minimieren von Rückständen, Kontaminanten, unerwünschten Stoffen und Zoonoseerregern in der gesamten Lebensmittel- und Futtermittelkette) im Bereich Minimierung von Zoonoseerregern zu erarbeiten. Es wird erläutert, wie und aus welchen Gründen die beiden folgend aufgeführten strategischen Ziele erarbeitet wurden:

A. Reduktion der Anzahl der *Campylobacter* spp. assoziierten Erkrankungen durch Geflügelfleisch beim Menschen in Deutschland innerhalb von 10 Jahren von 60.000 um 50 % auf 30.000 Erkrankte:

1. Periode (2017–2021) Zielerreichung:

Reduktion der Anzahl der *Campylobacter* spp. assoziierten Erkrankungen durch Geflügelfleisch beim Menschen in Deutschland von ursprünglich 60.000 Erkrankten auf 51.000 (30 % Zielerreichung)

B. Reduktion des Eintrags von Salmonellen über Schweinefleisch in die Lebensmittelkette zur Verminderung von Salmonellose-Erkrankungen beim Menschen

Ferner werden erste operative Ziele, die den strategischen Zielen untergeordnet sind, vorgestellt.

Es wird herausgestellt, dass dies erste Lösungsansätze darstellen, und weitere operative Ziele erarbeitet werden müssen, um letztendlich eine Reduktion der vorig genannten Zoonoseerregere in der Lebensmittelkette bzw. als Folge den gewünschten Rückgang humaner Erkrankungsfälle, die durch die in Rede stehenden Zoonoseerregere verursacht wurden, zu erreichen.

Als Fazit wird festgehalten, dass mit diesen strategischen Zielen ein neuer bundeseinheitlicher Weg beschritten wird, um den Eintrag von Zoonoseerregern in die Lebensmittelkette zu vermindern.

Hinweis: Die vorgeschlagenen strategischen Ziele müssen seitens der LAV noch angenommen werden.

3.8 The use of risk assessment to support control of *Salmonella* in pork

Dr. Maarten Nauta

National Food Institute, Copenhagen (Dänemark)

Introduction

Despite the effectivity of control measures in the past decade, domestic pork was estimated to be the most important food source for salmonellosis in Denmark in 2014 (Anonymous 2015). Therefore, there is a continued focus on the identification of effective intervention measures in the pig and pork production chain. In this paper, an overview will be given of the results of some research projects that have been performed at the National Food Institute to study the potentials of interventions. In these projects, the specific objective was to estimate the effectivity in terms of reduction of the risk of salmonellosis for the Danish population. The results of these projects illustrate how quantitative microbiological risk assessments (QMRAs) can be applied to support the control of *Salmonella* in pork.

DECONT

A Danish project (DECONT) aimed to study carcass contamination and the potential effectivity of decontamination of pig carcasses during slaughter. In this project, a large number of quantitative samples was taken for indicator bacteria and *Salmonella*. First, the hypothesis was tested that *Salmonella* contamination of carcasses could be predicted from the fecal carriage of *Salmonella* and the fecal contamination of carcasses, as predicted from *E. coli* data in animal feces and hygiene performance of the slaughterhouse. This hypothesis could not be confirmed (Nauta *et al.* 2013).

Farm to Fork QMRA

Next, a QMRA model was constructed to assess the effect of decontamination of carcasses on human health risk. Until now, several authors have published QMRAs related to *Salmonella* in pigs and pork, one of these being the recently published “farm to fork” risk assessment performed for EFSA (Snary *et al.*, 2016). Such risk assessments are very useful to evaluate and compare proposed specific interventions in the pork production chain, but may have the disadvantage that they are difficult to use outside the specific scope for which they are developed. A special challenge is these “farm to fork” models is the consumer phase, where the consumers transport, store and prepare their pork products. The transfer, growth and survival of *Salmonella* during this phase is difficult to predict due to a large variation between consumers and a scarcity of data. Yet, it is of crucial importance for the assessment of the risk. Models targeted at specific products and specific populations have been developed (e.g. Møller *et al.* 2015, Swart *et al.* 2016), but may not be generally applicable. Therefore, an alternative generic approach was developed that strongly simplifies the consumer phase and is based on an epidemiological estimate of incidence of salmonellosis in Denmark.

Application of the QMRA model

Using this model, Duarte *et al.* (2016) were able to estimate the effect of different (hypothetical) decontamination scenarios. An interesting finding was that it is important to not only estimate the mean effect of decontamination in terms of log reduction obtained, but that an estimate in the variation of that effect is at least as important. In general, a larger variation in the effect will lead to a reduced efficiency of carcass decontamination. Hence, the most effective decontamination strategy is not only effective in terms of mean log reduction, it also shows little variation in its effect.

The same model was applied by Bollerslev *et al.* (2016a and 2016b), who studied the feasibility of using either enterococci or *E. coli* as an indicator for the presence of higher concentrations of *Salmonella* on pig meat. More specifically the objective of these studies was to develop an approach which could make it possible to define microbiological limits for a bacte-

rial indicator that is associated with an increased risk of salmonellosis, due to bacterial growth or improper hygiene at the slaughterhouse. It was estimated that the majority of salmonellosis cases, caused by the consumption of pork in Denmark, is caused by the small fraction of pork products that has enterococci concentrations above 5 log CFU/g. The results obtained can be used to evaluate the potential effect of different microbiological limits on the risk of salmonellosis and consequently they may be used for the definition of a risk-based microbiological limit for enterococci and development of a process hygiene criterion in cutting plants and retail butcher shops. For the hygiene indicator *E. coli*, the results showed that there was a positive correlation between *E. coli* concentration and prevalence and concentration of *Salmonella*, which suggests a correlation between hygiene performance and the risk of salmonellosis.

Discussion

These results show that quantitative microbiological risk assessment allows an evaluation of the effect of control measures to reduce *Salmonella* in pork in terms of reduced risk of salmonellosis. Hence, it can practically support decision making. Some challenges in the QMRA remain, for example on the effect of the simplifying assumptions about the effects of consumer food handling and preparation.

References

1. Anonymous, 2015. Annual Report on Zoonoses in Denmark 2014, National Food Institute, DTU, Denmark.
2. Bollerslev, A.M., Nauta, M., Hansen, T.B. and Aabo, S. 2016a. A risk modelling approach for setting microbiological limits using enterococci as indicator for growth potential of Salmonella in pork. International Journal of Food Microbiology in press.
3. Bollerslev, A.M., Nauta, M., Hald, T., Hansen, T.B. and Aabo, S. 2016b. A risk-based approach for evaluation of hygiene performance at pig slaughter, submitted
4. Duarte, A.S.R., Nauta M.J. and Aabo, S. 2016 Variation in the effect of carcass decontamination impacts the risk for consumers. Food Control 59:12-19.
5. Møller, C.O.A., Nauta, M.J., Schaffner, D.W., Dalgaard, P., Christensen, B.B. and Hansen, T.B. 2015. Risk assessment of Salmonella in Danish meatballs produced in the catering sector 196:109-125.
6. Nauta, M., Barfod, K., Hald, T., Hay Sørensen, A., Emborg, H.-D., Aabo, S. 2013 Prediction of Salmonella carcass contamination by a comparative quantitative analysis of *E. coli* and *Salmonella* during pig slaughter. International Journal of Food Microbiology 166: 231-237.
7. Snary, E.L., Swart, A.N., Simons, R.R.L., Domingues, A.R.C., Vigre, H., Evers, E.G., Hald, T., Hill, A.A., 2016. A Quantitative Microbiological Risk Assessment for Salmonella in Pigs for the European Union. Risk Anal. 36, 437-449.
8. Swart, A.N., Van Leusden, F. and Nauta, M.J. 2016 A QMRA model for Salmonella in pork products during preparation and consumption. Risk Analysis 36: 516-53.

3.9 Aufklärung eines Listeriose-Ausbruchs durch kontaminierte Wurstwaren

Dr. Ute Messelhäuser

Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Oberschleißheim

Bei *Listeria* spp. handelt es sich um grampositive, aufgrund der Begeißelung bewegliche, fakultativ anaerobe, Stäbchenbakterien. Hinsichtlich einer eventuellen Humanpathogenität hat *Listeria (L.) monocytogenes* von den derzeit bekannten *Listeria* spp. die weitaus größte Bedeutung, *L. seeligeri* und *L. ivanovii* sind bisher nur bei wenigen Erkrankungsfällen als Ursache beschrieben, die übrigen Spezies gelten nach dem derzeitigen Stand der Wissenschaft als apathogen. Die Spezies *L. monocytogenes* umfasst 13 Serovare, wobei die Serovare 4b, 1/2a und 1/2b besonders häufig mit menschlichen Erkrankungsfällen assoziiert sind. Um *L. monocytogenes*-Isolate bestimmten Ausbruchsgeschehen zuordnen zu können, ist eine Serotypisierung allerdings nicht ausreichend. Hierfür greift man auf umfassendere Typisierungsverfahren wie Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) und Next-Generation-Sequencing (NGS) zurück.

Seit November 2012 wurden in Süddeutschland und hier insbesondere in den Bundesländern Baden-Württemberg, Bayern und Hessen gehäuft humane Listeriosefälle mit einem bestimmten Listerien-Feintypmuster (PFGE Typ 13a/54, NGS-Clustertyp 1248) beobachtet. Da die Listeriose als klassische Zoonose gilt und die Übertragung im Wesentlichen durch den Verzehr von mit *L. monocytogenes* kontaminierten Lebensmitteln erfolgt, versuchten die zuständigen Gesundheitsbehörden durch umfangreiche Befragungen, eine gemeinsame Expositionsquelle bei den erkrankten Personen zu ermitteln. Allerdings war es lange Zeit, auch mittels umfangreicher epidemiologischer Untersuchungen nicht möglich, die Ursache der Erkrankungen auf eine bestimmte Lebensmittelkategorie einzugrenzen.

Mitte März 2016 wurde dann bei einer im Rahmen des amtlichen Probenplans auf Einzelhandelsebene entnommenen Probe „Original bayerisches Wacholderwammerl“ am Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL) *L. monocytogenes* in hoher Keimzahl festgestellt. Es erfolgte ein Rückruf der betroffenen Ware, das gewonnene Isolat wurde zur weitergehenden Typisierung an das Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) weitergeleitet. Dort wurde im Rahmen der Typisierung das gleiche NGS-Muster wie bei den Patienten-Isolaten nachgewiesen, so dass sich erstmalig ein Lebensmittel dem humanen Ausbruchsgeschehen zuordnen ließ. Bei weiteren Probenahmen von Wammerl-Produkten der betroffenen Betriebsstätte sowohl im Betrieb selbst als auch im Einzelhandel wurden direkt im Anschluss an den Rückruf ebenfalls *L. monocytogenes*-Stämme mit einem zum Ausbruchstamm identischen PFGE- und NGS-Muster isoliert. Nach Angaben der RKI deuteten auch epidemiologische Erkenntnisse zu dem Produkt des betroffenen Betriebes darauf hin, dass mit hoher Wahrscheinlichkeit ein Zusammenhang der Erkrankungsfälle mit Produkten aus dem betroffenen Betrieb besteht (z. B. Vertriebsgebiet Süddeutschland, Vertrieb über bestimmte Handelsketten).

Bei dem Betrieb handelt es sich um ein handwerklich strukturiertes, mittelständisches Unternehmen. Der Betrieb hatte bereits im Nachgang zu der beanstandeten Probe vom März 2016 eine Reihe von Maßnahmen im Produktionsablauf ergriffen. Trotzdem wurden im Mai 2016 in zwölf weiteren Fällen, allerdings bei einer anderen Produktpalette als zuvor, Keimgehalte von *L. monocytogenes* nachgewiesen (< 100 KbE/g). Die gewonnenen Isolate konnten in der überwiegenden Anzahl der Fälle auf molekularer Ebene ebenfalls dem Ausbruchskluster zugeordnet werden.

Insgesamt bestanden deshalb hinreichende Anhaltspunkte dafür, dass von Erzeugnissen der betroffenen Firma eine Gefährdung für die Gesundheit der Verbraucher ausgehen kann. In der Folge haben die Behörden deshalb in einer Pressemitteilung bis auf weiteres davon abgeraten, Schinken- und Wurstprodukte des betroffenen Betriebes zu konsumieren und der Firma untersagt Ware in den Verkehr zu bringen.

3.10 Listerioseausbruch in Süddeutschland: Molekulares Tracing mittels NGS

Dr. Sylvia Kleta¹, Dr. Jens André Hammerl¹, Dr. Ralf Dieckmann¹, PD Dr. Burkhard Malorny¹, Maria Borowiak¹, Dr. Juliane Bräunig¹, Dr. Sven Halbedel², Dr. Rita Prager², Dr. Eva Trost², Prof. Dr. Antje Flieger², Dr. Hendrik Wilking², Dr. Sabine Vygen-Bonnet², Dr. Ulrich Busch³, Dr. Ute Messelhäuser³, Dr. Katharina Schönberger³, Dr. Sabine Horlacher⁴, Dr. Petra Luber⁵, Prof. Dr. Dr. Andreas Hensel¹, Prof. Dr. Sascha Al Dahouk¹

¹Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin

²Robert Koch Institut, Berlin, Wernigerode

³Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Oberschleißheim

⁴Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt, Stuttgart

⁵Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, Berlin

Hochauflösende molekulare Typisierungsmethoden zur Unterscheidung bakterieller Isolate sind ein wichtiges Werkzeug bei der Überwachung und Aufklärung von Listerioseinfektionen. Lange Inkubationszeiten von bis zu 70 Tagen sowie schwere Krankheitsverläufe machen es häufig unmöglich, anhand von Patientenbefragungen oder Rückstellproben das ursächliche Lebensmittel zu identifizieren. Zudem treten die meisten Listeriosefälle sporadisch und nicht epidemisch auf.

In Süddeutschland gelang es, durch die molekulare Typisierung mittels PFGE und NGS sporadisch innerhalb eines Vierjahreszeitraumes (2012–2016) auftretende Erkrankungen, die durch einen *Listeria monocytogenes*-Stamm des sehr häufig in Mensch und Lebensmitteln vorkommenden Serotyps IIa verursacht wurden, einem gemeinsamen Cluster zuzuordnen. Die epidemiologischen Untersuchungen lieferten zunächst nur vage Hinweise zum möglichen ursächlichen Lebensmittel. Ein breit angelegtes Screening mittels PFGE und Gesamtgenomsequenzierung von ca. 540 Lebensmittelisolaten mit zeitlichem und geografischem Bezug zu den Humanfällen identifizierte den Ausbruchsstamm in mehreren Lebensmittelprodukten desselben Herstellers. Nachfolgende gezielte epidemiologische Untersuchungen erhärteten den Verdacht, dass die identifizierten Lebensmittel Ursache des Ausbruchs waren.

Die Anwendung der Gesamtgenomsequenzierung auf *Listeria monocytogenes* in der Surveillance wird die Aufklärung epidemiologischer Zusammenhänge zukünftig beschleunigen.

3.11 *Clostridium difficile* als Zoonoseerreger? Ein Update

Dr. Sven Maurischat

Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin

Clostridium difficile ist ein weltweit-verbreitetes, sporenbildendes, anaerobes Bakterium, das zu einem der wichtigsten Erreger nosokomialer Infektionen zählt. Während die vegetativen Zellen sich nur unter strikt anaeroben Bedingungen vermehren, sind die Sporen äußerst widerstandsfähig und überleben etwa hohe Temperaturen, Trockenheit, niedrige pH-Werte und die Einwirkung von chemischen Stoffen, die z. B. auch als Desinfektionsmittel Anwendung finden.

Seit Beginn des Jahrtausends ist ein starker Anstieg von *C. difficile* Infektionen (CDI) weltweit zu beobachten, der auf das Auftreten und die Verbreitung von hypervirulenten und multi-resistenten Stämmen wie etwa des Ribotypen (RT) 027 zurückzuführen ist [1]. Die Infektionen werden begleitet von einer besonderen Schwere der Krankheitsverläufe und einer höheren Mortalitätsrate. So verliefen anhand der Meldezahlen an das Robert Koch-Institut für 2013 von 1.122 schweren CDI-Fällen 659 tödlich [2]. Auch die Zahl rezidivierender Fälle ist ansteigend. In Deutschland war der RT027 im Zeitraum 2011–2013 anhand der an das Konsiliarlabor für *C. difficile* übermittelten Isolate der zweithäufigste Ribotyp nach RT001 [3]; beides sind Ribotypen die als Krankenhaus-assoziiert gelten. Allerdings gibt es große regionale, zeitliche und altersbedingte Unterschiede. Während der RT027 sich in Deutschland seit dem ersten Ausbruch im Jahr 2007 vom Südwesten her ausbreitete und im äußersten Norden nur sehr selten isoliert wird, geht man bei anderen Ribotypen wie RT001 und RT078 von einer endemischen Population aus [3, 4]. Zudem betrifft der RT027 vor allem Menschen mit einem Durchschnittsalter von > 65 Jahren, somit die klassische Risikogruppe, wohingegen in der jüngeren Population eine größere Variabilität mit häufigem Auftreten nicht-toxischer Stämme wie dem RT010 zu beobachten ist.

Aber auch im ambulanten Bereich erlangt *C. difficile* immer größere Relevanz [5, 6]. Man schätzt momentan den Anteil ambulant-erworbener Infektionen auf 20–27 % anhand von Studien aus Nord-Amerika und Europa [7], geht jedoch auch von einer großen Dunkelziffer aus [8]. Gerade die Quellen und Infektionswege dieser Fälle sind jedoch bislang vollkommen unklar.

Eine mögliche Erklärung sind zoonotische Übertragungen und eine Verbreitung von Stämmen, die auch in der Umwelt und Tierhaltung endemisch vorkommen. Anhaltspunkt hierfür ist, dass *C. difficile* auch in gesunden, Lebensmittel-liefernden Tieren wie Geflügel, Schweinen und Rindern vorkommt. Die beobachteten Ribotypen unterscheiden sich nicht zu denen im Menschen. Die wenigen deutschen Studien zu *C. difficile* in der Tierhaltung fanden in Korrelation mit seiner endemischen Bedeutung vor allem den RT078 besonders häufig in Kälbern und Ferkeln mit Diarrhoe [9, 10]. Da diese Studien jedoch auf die Tiergesundheit ausgerichtet waren und keine schlachtreifen Tiere untersuchten, lassen sich keine Rückschlüsse auf die Lebensmittelkette ziehen. Studien zur Untersuchung von Lebensmitteln wurden für Deutschland bislang nicht publiziert. Betrachtet man jedoch Publikationen aus anderen Ländern, so konnten auch in Lebensmitteln (Schweine-, Rind- und Geflügelfleisch) beispielsweise die im Menschen und Tier häufig auftretenden Ribotypen RT027 und RT078 nachgewiesen werden, was auf eine mögliche zoonotische Übertragung über Lebensmittel hindeutet [11]. Die Prävalenzen liegen bei bis zu 42 %, allerdings gibt es große Unterschiede in Abhängigkeit des untersuchten Lebensmittels, der betroffenen Region und Studie. Letzteres könnte dadurch begründet sein, dass bislang keine Standardisierung der Nachweisverfahren für Lebensmittel erfolgte und die vorhandenen Studien dementsprechend nicht vergleichbar sind.

Basierend auf einer Methode, die erstmals für den Nachweis von *C. difficile* in Kälberkot angewandt wurde [12], hat das BfR ein Verfahren für die Untersuchung von Hackfleisch validiert. Das dreistufige Verfahren, bestehend aus einer nicht-selektiven und selektiven Anreicherung sowie der Identifikation auf selektiven Nährböden, erreicht ein Detektionslimit von 10 Sporen (gemessen als Koloniebildende Einheiten (KbE)) in 25 g Hackfleisch. Ein Ringversuch mit 14 Landeslaboren aus neun verschiedenen Bundesländern ergab eine durchschnittliche Spezifität von 100 % und Sensitivität von 94,9 % bei einer artifiziellen Probenkontamination mit 10, 20 und 450 Sporen / 25 g Hackfleisch. Ein parallel entwickelter real-time PCR Assay kann dazu genutzt werden, Anreicherungen bereits in einer frühen Inkubationsphase auf das Vorkommen von *C. difficile* zu untersuchen und verdächtige Kolonien zu bestätigen. Das BfR hat angeregt, mit Hilfe dieses Untersuchungsverfahrens im Rahmen des Zoonosenmonitorings nach AVV Zoonosen Lebensmittelkette Daten zur Kontamination von Schweinehackfleisch mit *C. difficile* zu erheben. Außerdem plant das BfR, die Eignung des Untersuchungsverfahrens für weitere Lebensmittelmatrices zu prüfen.

Aufgrund mangelnder diskriminativer Fähigkeiten der bislang genutzten Typisierungsmethoden wie der Multi Lokus Sequenz Typisierung (MLST), Ribo- oder Toxintypisierung war es bislang kaum möglich, Verwandtschaften von humanen, tierischen und Lebensmittel-Isolaten aufzuklären. Einige wenige Studien ergaben jedoch erste Indizien für eine zoonotische Übertragung von RT078 Stämmen mittels multilocus variable-number of tandem-repeat Analyse (MLVA) [13, 14] oder repetitiver Sequenz-basierter PCR (Rep-PCR) [15]. In der Zukunft wird jedoch vor allem die Genomsequenzierung hierzu einen wichtigen Beitrag leisten. Eine erste Studie wies bereits eine potentielle Übertragung von *C. difficile* Stämmen zwischen Schweinen und ihren Haltern mittels whole genome single-nucleotide polymorphism (SNP) Analyse nach [16].

Um die Frage der zoonotischen Übertragung von *C. difficile* zu klären, muss insbesondere auch den ambulanten CDI verstärkte Aufmerksamkeit gewidmet werden. Die Änderung der Meldepflicht bei humanen Erkrankungen ist ein erster Schritt in diese Richtung. Aber auch die Prävalenzen von *C. difficile* in Lebensmitteln, Tierbeständen und insbesondere von lebensmittelliefernden Tieren im schlachtreifen Alter müssen ermittelt werden, um Rückschlüsse auf mögliche Infektionsquellen ziehen zu können. Letztlich wird jedoch erst die Untersuchung kompletter Lebensmittelketten unter Einsatz hoch diskriminativer Technologien ermöglichen, Verwandtschaften zwischen verschiedenen Isolaten aufzuklären und Übertragungswege aufzudecken. Dies ist notwendig, um das Risiko von Infektionen mit *C. difficile* durch Verzehr von Lebensmitteln bewerten zu können.

Literatur

1. He M, Miyajima F, Roberts P, Ellison L, Pickard DJ, Martin MJ, Connor TR, Harris SR, Fairley D, Bamford KB et al: Emergence and global spread of epidemic healthcare-associated *Clostridium difficile*. *Nat Genet* 2013, 45(1):109-113.
2. Robert Koch-Institut (RKI): Epidemiologisches Bulletin 27/2014. Berlin, Germany.
3. von Müller L, Mock M, Halfmann A, Stahlmann J, Simon A, Herrmann M: Epidemiology of *Clostridium difficile* in Germany based on a single center long-term surveillance and German-wide genotyping of recent isolates provided to the advisory laboratory for diagnostic reasons. *Int J Med Microbiol* 2015, 305(7):807-13.
4. Steglich M, Nitsche A, von Müller L, Herrmann M, Kohl TA, Niemann S, Nübel U: Tracing the Spread of *Clostridium difficile* Ribotype 027 in Germany Based on Bacterial Genome Sequences. *PLoS ONE* 2015, 10(10):e0139811.
5. Khanna S, Pardi DS, Aronson SL, Kammer PP, Orenstein R, St Sauver JL, Harmsen WS, Zinsmeister AR: The epidemiology of community-acquired *Clostridium difficile* infection: a population-based study. *Am J Gastroenterol* 2012, 107(1):89-95.
6. Centers for Disease Control and Prevention (CDC): Severe *Clostridium difficile*-associated disease in populations previously at low risk—four states, 2005. *MMWR CDC Surveill Summ* 2005, 54:1201-1205.
7. Lessa FC, Gould CV, McDonald LC: Current status of *Clostridium difficile* infection epidemiology. *Clin Infect Dis* 2012, 55 Suppl 2:S65-70.
8. Penit A, Berner P, Besson J, Cazet L, Bourigault C, Juvin ME, Fix MH, Bruley des Varannes S, Boutoille D, Batard E et al: Community-acquired *Clostridium difficile* infections. *Med Mal Infect* 2016, 46(3):131-9.

9. Schneeberg A, Neubauer H, Schmoock G, Baier S, Harlizius J, Nienhoff H, Brase K, Zimmermann S, Seyboldt C: *Clostridium difficile* Genotypes in Piglet Populations in Germany. J Clin Microbiol 2013, 51(11):3796-3803.
10. Schneeberg A, Neubauer H, Schmoock G, Grossmann E, Seyboldt C: Presence of *Clostridium difficile* PCR ribotype clusters related to 033, 078 and 045 in diarrhoeic calves in Germany. J Med Microbiol 2013, 62(Pt 8):1190-1198.
11. Rodriguez-Palacios A, Borgmann S, Kline TR, LeJeune JT: *Clostridium difficile* in foods and animals: history and measures to reduce exposure. Anim Health Res Rev 2013, 14(1):11-29.
12. Schmid A, Messelhausser U, Hormansdorfer S, Sauter-Louis C, Mansfeld R: Occurrence of zoonotic clostridia and Yersinia in healthy cattle. J Food Prot 2013, 76(10):1697-1703.
13. Bakker D, Corver J, Harmanus C, Goorhuis A, Keessen EC, Fawley WN, Wilcox MH, Kuijper EJ: Relatedness of human and animal *Clostridium difficile* PCR ribotype 078 isolates determined on the basis of multilocus variable-number tandem-repeat analysis and tetracycline resistance. J Clin Microbiol 2010, 48(10):3744-3749.
14. Debast SB, van Leengoed LAMG, Goorhuis A, Harmanus C, Kuijper EJ, Bergwerff AA: *Clostridium difficile* PCR ribotype 078 toxinotype V found in diarrhoeal pigs identical to isolates from affected humans. Environ Microbiol 2009, 11(2):505-511.
15. Tsai BY, Ko WC, Chen TH, Wu YC, Lan PH, Chen YH, Hung YP, Tsai PJ: Zoonotic potential of the *Clostridium difficile* RT078 family in Taiwan. Anaerobe 2016.
16. Knetsch CW, Connor TR, Mutreja A, van Dorp SM, Sanders IM, Browne HP, Harris D, Lipman L, Keessen EC, Corver J et al: Whole genome sequencing reveals potential spread of *Clostridium difficile* between humans and farm animals in the Netherlands, 2002 to 2011. Euro Surveill 2014, 19(45):20954.

3.12 Monitoring of foodborne outbreaks caused by toxin-producing bacteria in the European Union

Dr. Giusi Amore

European Food Safety Authority, Parma (Italien)

The reporting of investigated food-borne outbreaks has been mandatory for EU Member States since 2003 and it is based on the Zoonoses Directive 2003/99/EC (1), which obliges EU Member States to collect relevant and, where applicable, comparable data on zoonoses, zoonotic agents, antimicrobial resistance and food-borne outbreaks. In addition, Member States are required to assess trends and sources of these agents, as well as food-borne outbreaks in their territory, submitting an annual report to the European Commission covering the data collected. The European Food Safety Authority (EFSA) is assigned the tasks of collecting, examining these data and publishing the EU annual Summary Reports on the trends and sources of zoonoses, foodborne outbreaks and antimicrobial resistance in the EU.

Starting in 2007, harmonised specifications on the reporting of food-borne outbreaks have been progressively applied in the EU. The current system for reporting food-borne outbreak is known as European Union Food-borne reporting System (EU-FORS) and was implemented for the first time in the reporting of 2010 data. Since then, the outbreaks reported have been classified as having 'strong evidence' or 'weak evidence' based on the strength of evidence implicating a suspected food vehicle as cause of the outbreak (2). The evaluation of the strength of evidence implicating a suspected food vehicle in food-borne outbreaks as being strong or weak is based on the assessment of all available type of evidence (i.e. microbiological, epidemiological, descriptive environmental, based in tracing-back of the investigated foodstuffs) according with the indications included in the EU-FORS guidance (2) and the last published manual for reporting on food-borne outbreaks (3).

The most recent data on the monitoring of food-borne outbreaks in the EU are from 2014 and have been included in the EU Summary Report on the trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks, which was prepared by EFSA in collaboration with the European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) and published in December 2015 (4). EFSA is responsible of collecting and analysing the data on foodborne outbreaks, as well as of drafting all the related sections in the EU Summary Report.

It is important to note that the food-borne outbreak investigation systems at the national level are not harmonised among Member States. Therefore, the differences in the number and type of reported outbreaks, as well as in the causative agents, may not necessarily reflect the level of food safety among Member States; rather they may indicate differences in the sensitivity of the surveillance systems for food-borne outbreaks in the different countries. In addition, some Member States have implemented changes in national systems over time, which may have had an impact on the number of outbreaks reported by the same country in different years (4). These aspects and limitations are to be considered when interpreting the results on the monitoring of foodborne outbreaks in the EU.

In 2014, a total of 5,251 food-borne outbreaks, including both weak- and strong-evidence outbreaks, were reported by 26 Member States, compared with 5,196 outbreaks reported by 24 Member States in 2013. The overall reporting rate in 2014 at the EU level was 1.04 outbreaks per 100,000 population, which was a decrease compared to the rate observed in 2013 (1.19 outbreaks per 100,000 population). A total of 592 strong-evidence outbreaks were reported by 21 Member States, representing 11.3 % of the total number of food-borne outbreaks recorded in 2014. This was 29.4 % less than the number of strong-evidence outbreaks reported in 2013 (839 outbreaks) (4).

Within the EU, the causative agent was known in 70.9 % of the reported outbreaks. In 2014, food-borne viruses were, for the first time, identified as the most commonly detected causative agent in the reported food-borne outbreaks (20.4 % of all outbreaks), followed by *Salmonella* (20 % of all outbreaks), bacterial toxins (16.1 % of all outbreaks) and *Campylobacter* (8.5 % of all outbreaks). Other agents each accounted for 2.7 % or less of the food-borne outbreaks (4).

Shiga-toxin producing *Escherichia coli* (STEC) was the only toxin-producing bacteria reported as causative agent of foodborne outbreaks in 2014. In addition, outbreaks caused by bacterial toxins produced by *Bacillus*, *Clostridium* and *Staphylococcus* were also reported.

In 2014, 38 foodborne outbreaks caused by STEC were reported by 13 Member States. Overall, 270 human cases were involved, of which 34 were reported to be hospitalised. Only 5 strong-evidence outbreaks were reported out of 38 total outbreaks: 3 outbreaks were associated with the consumption of milk (mainly raw milk) and 2 outbreaks were associated with vegetables (bagged ready to eat salad and bagged rocket leaves). In addition, 3 STEC waterborne outbreaks involving 15 human cases were reported by 3 Member States (4).

In 2014, 12 Member States reported 287 outbreaks caused by *Bacillus* toxins (all *B. cereus*, but 1 unspecified *Bacillus*), representing 5.5 % of all outbreaks reported within the EU. Overall, these outbreaks involved 3,210 human cases, with 267 hospitalisations and no deaths. In the 35 strong-evidence *Bacillus* toxin outbreaks, 'mixed food' was the most commonly implicated food vehicle, followed by 'cereal products', 'broiler meat', 'crustaceans, shellfish and molluscs' and 'vegetables and juices' (4).

Thirteen Member States reported 160 food-borne outbreaks caused by *Clostridium* toxins: *C. perfringens* (124 outbreaks), *C. botulinum* (9 outbreaks) or unspecified *Clostridia* (27 outbreaks). In total, 3,285 cases, 65 hospitalisations and three deaths were reported. Overall, 42 foodborne *Clostridium* toxins outbreaks were reported as strong-evidence outbreaks. The most common food vehicles reported for the strong-evidence *Clostridium* toxin outbreaks were reported as 'other foods' (8 outbreaks) and 'bovine meat and products thereof' (6 outbreaks). In addition, one strong-evidence outbreak due to *C. perfringens* was reported (4).

In 2014, 12 Member States reported 393 food-borne outbreaks caused by staphylococcal toxins. In addition, Switzerland reported two strong-evidence outbreaks caused by staphylococcal enterotoxins. In 2014, the number of strong-evidence outbreaks caused by staphylococcal toxins was very low (31 outbreaks) compared with 2013, where 94 strong-evidence outbreaks were reported. The most commonly reported single food category in the 31 strong-evidence outbreaks in 2014 was 'mixed foods', followed by 'pig meat and products thereof' and 'broiler meat and products thereof' (4).

As in previous years, the data reported on food-borne outbreaks demonstrate that reporting by a single or a small number of Member States can have a strong influence on the apparent distribution of causative agents and food vehicles at the EU level. It also appears that, within the Member States, there may be large differences with regard to the reported causative agents and implicated food vehicles between years.

References

1. Directive 2003/99/EC of the European Parliament and of the Council of 17 November 2003 on the monitoring of zoonoses and zoonotic agents, amending Council Decision 90/424/EEC and repealing Council Directive 92/117/EEC. OJ L 325, 12.12.2003 pp. 31–40.
2. EFSA (European Food Safety Authority), 2014. Update of the technical specifications for harmonised reporting of food-borne outbreaks through the European Union reporting system in accordance with Directive 2003/99/EC. EFSA Journal 2014;12(3):3598, 25 pp. doi:10.2903/j.efsa.2014.3598.

3. EFSA (European Food Safety Authority), 2016a. Manual for reporting on food-borne outbreaks in accordance with Directive 2003/99/EC for information deriving from the year 2015. EFSA supporting publication 2016:EN-989. 43 pp.
4. EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), 2015. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014. EFSA Journal 2015;13(12):4329, 63 pp. doi:10.2903/j.efsa.2015.4329.

3.13 *Bacillus thuringiensis* – ein bedeutender Mikroorganismus für den biologischen Pflanzenschutz

Dr. Dietrich Stephan

Julius Kühn-Institut, Darmstadt

Unter biologischem Pflanzenschutz im engeren Sinne wird die Nutzung von Lebewesen und Viren zur Regulierung und Bekämpfung von Schaderregern (Krankheiten und tierische Schädlinge) an Kulturpflanzen verstanden. Der Begriff Lebewesen impliziert, dass lebende Organismen wie Mikroorganismen und Makroorganismen genutzt werden; der Nutzen wird im Schutz der Kulturpflanze gesehen. Der biologische Pflanzenschutz im weiteren Sinne schließt die Anwendung von Semiochemicals und Naturstoffen ein. Der biologische Pflanzenschutz im engeren wie weiteren Sinne ist ein Baustein des integrierten Pflanzenschutzes, der auf der Einbindung verschiedener Maßnahmen wie z. B. mechanischer/physikalischer, biotechnischer oder chemischer Pflanzenschutzmaßnahmen beruht. Auch die Resistenzzüchtung ist ein wesentlicher Baustein des integrierten Pflanzenschutzes.

Entsprechend der EU-Richtlinie 2009/128/EC zielt der integrierte Pflanzenschutz auf das Wachstum gesunder Nutzpflanzen bei möglichst geringer Störung der landwirtschaftlichen Ökosysteme ab und fördert natürliche Mechanismen zur Bekämpfung von Schädlingen. Ergänzend ist im deutschen Pflanzenschutzgesetz im § 2 geregelt, dass im integrierten Pflanzenschutz eine Kombination von Verfahren, bei denen unter vorrangiger Berücksichtigung biologischer, biotechnischer, pflanzenzüchterischer sowie anbau- und kulturtechnischer Maßnahmen die Anwendung chemischer Pflanzenschutzmittel auf das notwendige Maß beschränkt werden soll.

Eilenberg *et al.* (2001) unterscheiden verschiedene Formen des biologischen Pflanzenschutzes (BPS): So wird unter konservativem BPS die Erhaltung und Förderung natürlicher Feinde, unter klassischem BPS die absichtliche Einführung eines exotischen Organismus zur permanenten Etablierung und langfristigen Bekämpfung, unter inokulativem BPS die absichtliche Freisetzung eines lebenden Organismus (oder Virus) mit der Erwartung, dass sich dieser vermehrt und den Schaderreger für eine gewisse Zeit aber nicht dauerhaft unterdrückt und unter inundativem BPS die Verwendung lebender Organismen zur Bekämpfung eines Schaderregers durch Freisetzen von Organismen (Viren) verstanden. Der inokulative wie inundative BPS setzt eine wiederholte Ausbringung der Organismen voraus, da keine langfristige Etablierung der ausgebrachten Organismen erfolgt. Die Anwendung von *Bacillus thuringiensis* (*B.t.*) ist dem biologischen Pflanzenschutz zuzuordnen. Eine Zuordnung dem BPS im engeren oder weiterem Sinne fällt allerdings schwer, da für die Wirksamkeit maßgeblich insektenspezifische Kristalltoxine und nicht die lebende Endosporen verantwortlich sind. Für eine effektive Regulierung von Schaderregern muss *B. t.* wiederholt ausgebracht werden und somit ist diese dem inundativen BPS zuzuordnen.

Werden Mikroorganismen entsprechend des Pflanzenschutzgesetzes ausgebracht, so müssen diese wie chemische Pflanzenschutzmittel zugelassen werden. Dies stellt gerade für Produkte mit geringem Marktvolumen eine beachtliche Hürde dar. Dennoch hat die weltweite Bedeutung biologischer Pflanzenschutzmittel in den letzten Jahren stark zugenommen und das Marktvolumen für das Jahr 2020 wird mit 6 Mrd. US\$ beziffert.

Einer der bedeutendsten Mikroorganismen für den biologischen Pflanzenschutz ist *B. t.*. Dieser erhielt seinen Namen von Dr. Berliner um 1910. Er konnte in Mehlmottenraupen aus einer Mühle in Thüringen dieses Bakterium isolieren. *B. t.*-Stämme kommen natürlicherweise in Deutschland vor und können insbesondere im Boden nachgewiesen werden. Genetisch unterscheidet sich *B. t.* von *B. cereus* durch Plasmide, welche insektenspezifische Toxine kodieren. Bei diesen Toxinen handelt es sich um sogenannte Delta-Endotoxine, dies sind

Proteinkristalle die neben der Endospore nach der Lyse der vegetativen *B. t.*-Zelle freigesetzt werden. *B. t.* wird industriell in Flüssigfermentern produziert und Produkte enthalten i. d. R. lebensfähige Sporen und das insektenspezifische Delta-Endotoxin. *B. t.* fließt aber auch in die grünen Gentechnik ein. Zum Beispiel sind so genannte *B.t.*-Baumwolle, *B. t.*-Mais oder *B. t.*-Kartoffeln entwickelt worden. Diese Sorten finden in Deutschland aber keine Anwendung.

B. t.-Produkte müssen, um ihre Wirkung zu entfalten, oral vom Zielinsekt aufgenommen werden. Im Darm eines Zielinsektes lösen sich die Toxinkristalle auf und werden durch körpereigene Enzyme aktiviert. Anschließend wird die Darmwand durch die aktivierten Toxine zerstört. Das befallene Insekt hört nach kurzer Zeit auf zu fressen. In manchen Fällen können Sporen auskeimen, in die Leibeshöhle eindringen und Stoffwechselgifte produzieren. Inzwischen sind eine Vielzahl von Toxinen mit spezifischer Wirkung gegen Coleopteren, Lepidopteren, Dipteren, Hymenopteren und Nematoden identifiziert worden. Neben den kristallinen Cry-Toxinen kann *B. t.* auch zytolytische Cyt-Proteine und vegetative insektizide Proteine (VIP) mit insektizider Wirkung bilden. Welche Toxine gebildet werden, sind sehr vom verwendeten *B. t.*-Stamm abhängig. Dies gilt auch für die Bildung anderer Toxine, wie z.B. emetischer und Diarroetoxine, die auch von *B.t.*-Stämmen in unterschiedlicher Stärke gebildet werden können. Derzeit sind in Deutschland vier *B. t.*-Stämme zur Anwendung gegen bestimmte Schadlepidopteren und -coleopteren in festgelegten Kulturen als Pflanzenschutzmittel zugelassen, zwei *B. t.* subspecies *aizawai* Stämme, und jeweils ein *B. t.* subspecies *kurstaki* und *tenebrionis* Stamm. Je nach Produkt und Indikation sind bei einer *B. t.* -Anwendung bis zu neun Tage Wartezeiten einzuhalten. *B. t.*-Produkte stellen gerade wegen ihrer Wirtsspezifität und insbesondere wegen ihrer Nützlingsschonung einen wichtigen Baustein im integrierten Pflanzenschutz dar. So wird beispielsweise wegen ihrer Nützlingsschonung im intensiven Unterglasanbau von Tomaten *B. t.* eingesetzt. Der inundative Einsatz von *B. t.* legt nahe, dass *B. t.* sich nicht im Anbausystem etabliert oder ausbreitet.

B. t.-Produkte werden bereits seit Jahrzehnten erfolgreich und teils großflächig eingesetzt. Durch die Verwandtschaft mit dem humanpathogenen Bakterium *B. cereus* und die Einordnung in die *Bacillus cereus*-Gruppe, wird immer wieder diskutiert, ob Gefahren für Anwender und vor allem Konsumenten von mit *B. t.*-Produkten behandelter Ware bestehen. Für viele Bakterien gibt es Grenz- oder Richtwerte, die in Nahrungsmitteln nicht überschritten werden sollen. Dieser Wert liegt für *B. cereus* bei 10^5 KbE/g Lebensmittel und konnte in ersten eigenen Rückstandsuntersuchungen an Salat, Tomate und Paprika teils erreicht werden.

Diese Werte sagen allerdings nicht aus, ob diese *B. t.*-Konzentration ausreicht, um relevante Toxinmengen zu produzieren. Es gilt auch zu hinterfragen, ob zugelassene kommerzielle *B. t.*-Stämme mit humanpathogenen *B. cereus*-Stämmen hinsichtlich ihrer Grenz- bzw. Richtwerten gleichzusetzen sind.

3.14 Tenazität von Clostridien

Dr. Christian Seyboldt

Friedrich-Loeffler-Institut, Jena

In der Gattung *Clostridium* sind Gram-positive, stäbchenförmige, anaerobe, Sporen bildende Bakterien der Familie der *Clostridiaceae* zusammengefasst. Die Gattung besteht aus rund 200 Spezies, von denen etwa 15 Arten als Krankheitserreger bekannt sind und eine Reihe weiterer Spezies am Verderb von Lebensmitteln beteiligt sein können. Clostridien kommen ubiquitär in der Umwelt vor und werden insbesondere in Böden und im Verdauungstrakt von Tieren gefunden. Pathogene Clostridien sind in der Lage Toxine zu produzieren, die für die Entstehung und Entwicklung von Clostridien-Erkrankungen ausschlaggebend sind. Neben der Fähigkeit Toxine zu bilden spielt die Widerstandsfähigkeit (Tenazität) von Clostridien-Sporen eine wichtige Rolle beim Lebensmittelverderb und bei der Krankheitsentstehung. Die umfassende Widerstandsfähigkeit der bakteriellen Sporen ist dabei eine grundlegende Voraussetzung für das verbreitete Auftreten von Clostridien in Lebensmitteln, Futtermitteln und als Krankheitserreger. Aufbau und Zusammensetzung der Sporen sind weitgehend genetisch determiniert, jedoch wirken sich auch Umwelteinflüsse während der Sporulation auf die Stabilität und Germinationsfähigkeit der Sporen aus. Im Fall von *Clostridium botulinum* ist neben der Tenazität der Sporen auch die Stabilität des Neurotoxins in Lebens- und Futtermitteln von Bedeutung. In dem Vortrag soll ein aktueller Überblick zum Stand des Wissens in Bezug auf die Stabilität von Sporen und Toxinen ausgewählter Clostridienspezies gegeben werden.

3.15 Targeting *S. aureus* toxin production – for improved food safety and animal health

Dr. Jenny Schelin

Dr. Jenny Schelin, Lund University, Lund (Schweden)

Food safety is on my mind almost every day. A never-ending flow of new knowledge, based on sound fundamental and applied research, is one important part of reaching the goal to ensure safe food to everyone. Occasionally however, the question arises if food is not safe enough by now? In Europe our food has probably never been safer according to EFSA but still WHO reports that diarrhea caused by contaminated food and water kills 2.2 million people globally every year. Thus the answer depends very much on where you live, emphasizing that global efforts are still most needed to fight and prevent bacterial foodborne diseases especially in the developing countries. Furthermore our eating habits are changing rapidly. We demand a wider variety of food choices, including foods that are not in season, or are minimally processed. Food is often grown or processed halfway across the world before being consumed. The trends in global food consumption, production, processing, distribution and preparation are new challenges to food safety. Changing patterns of food production and distribution create an environment in which both known and new foodborne diseases can become prevalent. As modern food production chains evolve to complex systems, they provide greater opportunities for contamination, growth of pathogens and expression of virulence factors such as toxins. As a direct consequence, preventing foodborne diseases is indeed an ongoing global and challenging task where classical microbiological tools need to be supported with additional strategies and further knowledge on how the environment affects microbial behavior.

Our team at Applied Microbiology, Lund University, is studying the regulation, expression and function of *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) toxins in relation to food safety and animal health. In this abstract and the accompanying presentation an overview of our research activities is presented along with selected examples described in some more detail.

S. aureus is a highly adaptive Gram positive pathogen with a considerable impact on both human and animal health. It is a challenge all along the food supply chain starting at farm level as a major etiological agent of mastitis [1]. *S. aureus* is also a robust food-borne pathogen and a common cause of staphylococcal food-poisoning (SFP) due to its production and secretion of enterotoxins into various food products that finally reaches the consumers. Considering its ability to grow and express virulence under a wide range of temperatures, pH, water activities and sodium chloride concentrations it enables the presence in a broad range of food from ready-to-eat meals, fresh produce to fermented foods. To date 24 different staphylococcal enterotoxins (SEs) and enterotoxin like (SEIs) proteins have been identified. SEs are resistant towards proteases, low pH and heat and have two distinct modes of actions including superantigenic and emetic activity. The majority of reported SFP outbreaks have been associated with the five classical SEs, SEA to SEE. A fascinating variety is displayed in terms of genetic backbones and regulatory mechanisms. The enterotoxin genes (*se*) are encoded by a number of different mobile genetic elements such as plasmids, bacteriophages and pathogenicity islands (SaPIs). This localization permits dissemination of the *se* genes between *S. aureus* strains through horizontal gene transfer. In addition, both common global regulatory mechanisms, such the accessory gene regulator (Agr) quorum sensing system, and unique modes of regulation of SE expression and formation exist. [Reviewed in 2–4]

Considering this impressive flexibility and variation in physiological characteristics and virulence properties it is of no surprise that SFP is one of the most common food-borne diseases

worldwide and that continual surveillance of *S. aureus* along with research of behaviour and virulence expression in food have to be pursued.

The focus in our research is to (i) identify critical food factors involved in down- and up-regulating staphylococcal enterotoxin formation; (ii) study virulence regulation, expression and formation of enterotoxins in food (e.g. boiled ham, salami, sausage, milk and cheese) and (iii) investigate the function of toxins during the infection process in bovine mastitis. Staphylococcal enterotoxin A (SEA) is the toxin most often implicated in SFP outbreaks worldwide [2]. A key characteristic of SEA is that the *sea* gene is located on the genome of a polymorphic family of temperate bacteriophages (*Siphoviridae*) [5-6]. These phages are able to enhance the virulence of the host bacterial cell by altering its life cycle and express virulence factors such the *sea* gene when conditions in the environment diverge from optimal. In our team we explore the relationship between the phage life cycle, expression of the *sea* gene and formation of SEA both in broth and in different meat products. The impact of food composition and preservatives, such as salt and weak acids, have been assessed on the phage and the SEA produced, to highlight food processing treatments that could potentially increase the risk of SFP through the formation of high levels of SEA. In summary, we have found that the life cycle of the *sea*-carrying phages has a critical role in *sea* expression and levels of SEA produced by the *S. aureus* strains and it is further affected by the conditions of the cell environment and food preservation [7–12].

Staphylococcal enterotoxin D (SED) is the second most commonly associated classical staphylococcal enterotoxin to SFP. SED is encoded on a penicillinase pIB485 plasmid and is partially regulated by the Agr regulatory system [3]. To better understand SED expression and formation in food, our team has studied *S. aureus* in different pork meat products (boiled ham, hot-smoked ham, dry-cured Serrano ham, and black pepper salami). The intrinsic nature of the meat products greatly affected the growth and expression patterns and the number of *S. aureus* increased rapidly on boiled and smoked ham. In both products, active *sed* expression was detected throughout the one-week experiment, in contrast to *sed* expression in broth that peaked after only a few hours of cultivation and then decreased to low levels during the rest of the study. SED accumulated in all the meat products tested, except in boiled ham where SED levels surprisingly started to decrease after five days of incubation [13]. The effect of sodium nitrite and regulatory mutations Δagr , $\Delta sarA$, and $\Delta sigB$ on SED expression and formation has been explored in broth along with the effect of Δagr on SED expression and formation on boiled ham in collaboration with a research group at the Institute for Food Safety and Hygiene, University of Zurich. The obtained results so far demonstrate strain-specific variation with regard to the effect of regulatory mutations and that SED regulation may not be as tightly dependent on Agr as previously described [14].

Besides being a major player in food poisoning *S. aureus* is also the most common bacteria causing bovine mastitis - an infection that damages the udder tissue of the cow and causes suffering for the animal and a decreased milk production for long periods. Each year, more than 60 % of all Swedish dairy cows are affected by mastitis and it is estimated to cost the Swedish dairy farmers approximately 200 million SEK per year [15]. A contributing factor to the high cost is the risk of *S. aureus* to establish a chronic infection and persist for long periods intracellularly where the bacteria become very resistant to antibiotics treatment and evade the host immune defense [16]. In collaboration with the National veterinary institute (SVA) our team has investigated the function of Staphylococcal enterotoxin C (SEC) and Toxic shock syndrome toxin (TSST) during the establishment of intracellular infection in a bovine mammary epithelial cell line (BME cells). In three *S. aureus* strains isolated from acute clinical cases of mastitis, the *sec* and *tst-1* genes were deleted respectively. We found that the Δsec deletion mutants infected BME cells to a significantly lower degree compared to the isogenic wildtype strains. Regarding $\Delta tst-1$ mutants, there were also significant effects on the infection capability, but the results were more difficult to interpret. In conclusion, both

SEC and TSST appear to be involved in the infection process, though their role has to be further investigated [17, unpublished data].

Without doubt, food safety must be addressed along the entire food chain. A farm to fork approach is however more complex in an experimental point of view and strongly benefits from a collaborative network where joint forces and expertise can contribute at different levels. Further knowledge about virulence behavior of foodborne pathogens accompanied by the development of more rapid, sensitive, accurate and harmonized detection and quantification methods is not only essential to ensure and improve safe food. It will also enable advances in quantitative microbial risk assessment and enhance the possibilities of predicting emerging pathogens and new conditions that may be favorable of supporting the risk of foodborne illness.

References

1. Le Maréchal C, Thiéry R, Vautor R, Le Loir Y (2011) *Dairy sci & Technol* **91**:247-282.
2. Hennekinne J-A, De Buyser M-L, Dragacci S (2012) *FEMS Microbiol Rev* **36**:815-836.
3. Schelin J, Wallin-Carlquist N, Cohn MT, Lindqvist R, Barker GC, Rådström P (2011) *Virulence* **2**:580-92.
4. Le Loir Y, Baron F, Gautier M (2003) *Genet Mol Res* **2**:63-76.
5. Betley MJ, Mekalanos JJ (1985) *Science* **229**:185-187.
6. Borst DW, Betley MJ (1994) *Infect Immun* **62**:113-118.
7. Zeaki N, Rådström P, Schelin J (2015) *Microorganisms* **3**:551-566.
8. Zeaki N, Susilo YB, Pregiel A, Rådström P, Schelin J (2015) *Toxins* **12**:5359-76.
9. Zeaki N, Cao R, Skandamis PN, Rådström P, Schelin J (2014) *Int J Food Microbiol* **182-183**:44-50.
10. Cao R, Zeaki N, Wallin-Carlquist N, Skandamis PN, Schelin J, Rådström P (2012) *Appl Environ Microbiol* **78**:4942-8.
11. Wallin-Carlquist N, Cao R, Márta D, da Silva AS, Schelin J, Rådström P (2010) *BMC Microbiol* **10**:147.
12. Wallin-Carlquist N, Márta D, Borch E, Rådström P (2010) *Int J Food Microbiol* **141** Suppl 1:S69-74.
13. Márta D, Wallin-Carlquist N, Schelin J, Borch E, Rådström P (2011) *Food Microbiol* **28**:617-20.
14. Sihto HM, Susilo YB, Tasara T, Rådström P, Stephan R, Schelin J, Jöhler S (2016) *Food Control* **65**:37-45.
15. Nielsen C (2009) Economic impact of mastitis in dairy cows. Doctoral Thesis. *Acta Universitatis Agriculturae Sueciae* vol. 2009:29.
16. Löffler B, Tuchscher L, Niemann S, Peters G (2014) *Int J Med Microbiol* **304**:170-6.
17. Artursson K, Söderlund R, Liu L, Monecke S, Schelin J (2016) *Vet Microbiol* **193**:156-61.

3.16 How to manage and characterize staphylococcal food poisoning outbreaks: from food vehicle to incriminated source

Dr. Jacques-Antoine Hennekinne

Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, Maisons-Alfort (Frankreich)

Staphylococcal food poisoning is one of the most common food-borne diseases and results from the ingestion of staphylococcal enterotoxins (SEs) preformed in food by enterotoxigenic strains of coagulase positive staphylococci mainly *Staphylococcus aureus*. To date, more than 20 SEs have been described: SEA to SEIY. All SEs have superantigenic activity whereas only a few have been proved to be emetic, representing a potential hazard for consumers. Characterization of staphylococcal food poisoning outbreaks (SFPOs) has considerably progressed compared to 50 years ago, when staphylococci were simply enumerated and only five enterotoxins were known for qualitative detection. Today, SFPOs can be characterized by a tool box including the identification of *S. aureus* biovars, the use of molecular based-methods to identify pathogenic factors, the specific immune-detection for SEs, and the absolute quantification by mass spectrometry based-methods [1].

After an introduction dealing with the state of art on *S. aureus* and its toxins including characteristics and properties, the presentation will focus on the European Union food poisoning reporting scheme and the associated data [2]. The presentation will also focus on the needs to properly characterize such events combining relevant laboratory tools and consistent epidemiological data. Finally, an integrated bacteria-to-protein approach for characterizing staphylococcal food poisoning events will be presented using outbreaks received in the laboratory at both French and European levels.

References

1. Hennekinne et al, 2012. FEMS Microbiol Rev, 36, 815-836.
2. EFSA Journal 2015;13(12):4329 [191 pp.]. doi: 10.2903/j.efsa.2015.4329.
http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific_output/files/main_documents/4329.pdf

3.17 Lebensmittelbedingte Ausbrüche durch bakterielle Toxinbildner in Bayern (2005–2015)

Dr. Ute Messelhäuser

Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Oberschleißheim

Bakterien der *B. cereus*-Gruppe zählen zusammen mit *Staphylococcus (S.) aureus* und *Clostridium (C.) perfringens* zu den wichtigsten lebensmittelassoziierten, bakteriellen Toxinbildnern. Im Jahr 2014 wurden EU-weit 840 lebensmittelbedingte Ausbrüche registriert, die auf bakterielle Toxine (gebildet durch *Bacillus* spp., *Clostridium* spp. und *S. aureus*) zurückzuführen waren. Verglichen mit den Daten aus dem Jahr 2013 war somit ein leichter Anstieg an der lebensmittelbedingten Ausbrüche, ausgelöst durch bakterielle Toxinbildner zu verzeichnen. Ausbruchsgeschehen, die in Verbindung mit Staphylokokken- Enterotoxin (SET) standen, stellten dabei 7,5 % aller in der EU gemeldeten lebensmittelbedingten Ausbrüche dar, durch Toxine von Bakterien der *B. cereus*-Gruppe wurden 5,5 % aller in der EU registrierten lebensmittelbedingten Ausbrüche ausgelöst. Ausbrüche, die auf Toxine der unterschiedlichen *Clostridium* spp. (*C. perfringens* und Botulinum-Neurotoxin (BoNT)-produzierende *Clostridium* spp.) zurückzuführen waren, bildeten mit 3,1 % aller Ausbruchsgeschehen das Schlusslicht bei den bakteriellen Intoxikationen bzw. Toxi-Infektionen (EFSA, 2015). Wie zu erwarten, wurde der größte Anteil dieser Ausbrüche in Einrichtungen zur Außer-Haus-Verpflegung beobachtet, mit etwas Abstand folgt als Ausbruchsort der Privathaushalt. In einer großen Anzahl der Fälle konnten bei der Ausbruchsauflärung die klassischen Fehler im Temperaturmanagement beim Warmhalten oder Abkühlen der Speisen als Ausbruchsursache festgestellt werden (EFSA, 2015).

Die genannten Daten zeigen, dass es sich bei bakteriellen Toxinbildnern um Keime handelt, mit denen in den nächsten Jahren im Bereich der Lebensmittelhygiene verstärkt gerechnet werden muss. Ein Grund hierfür sind die sich europaweit ändernden Verzehrsgewohnheiten. Bedingt durch die moderne Berufs- und Freizeitgestaltung tritt der Bereich der Außer-Haus-Verpflegung in Restaurants, Kantinen und dem Imbiss immer mehr in den Vordergrund. Und auch dort werden Speisen aus Zeitgründen nur noch selten bei Bestellung frisch zubereitet, sondern zumeist vorgekocht und im Bedarfsfall kurz erwärmt oder gleich in Buffetform angeboten. Dies alles sind Faktoren, die das Risiko für eine lebensmittelbedingte Erkrankung durch bakterielle Toxinbildner fördern. Im Hinblick auf diese Entwicklung ist es notwendig sich im Lebensmittelbereich verstärkt mit diesen Erregern, sowohl unter hygienischen als auch unter diagnostischen Aspekten, zu befassen.

Das Bayerische Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL) hat zum Nachweis und zur weitergehenden Differenzierung bakterieller Toxinbildner in relevanten Lebensmittelmatrizes unterschiedliche diagnostische Verfahren etabliert und (in-house-) validiert. Hierzu gehören sowohl klassisch-kulturelle als auch molekulare Untersuchungsmethoden. Mit diesen Verfahren werden jährlich zwischen 800 und 1.000 Proben aus vermuteten, lebensmittelbedingten Erkrankungsfällen mit der Leitsymptomatik „Erbrechen“ und/oder „Durchfall“ auf das Vorkommen bakterieller Toxinbildner (*Bacillus* spp., *Clostridium* spp.) bzw. im konkreten Verdachtsfall auch auf das Vorkommen von SET untersucht. Um eine Datengrundlage für eine entsprechende Risikobewertung schaffen zu können, erfolgt regelmäßig die qualitative und quantitative Untersuchung von amtlichen Proben auf bakterielle Toxinbildner im Rahmen von Monitoring-Programmen. Daten aus Ausbruchsuntersuchungen sowie konkrete Fallbeispiele für entsprechende lebensmittelbedingte Ausbrüche werden vorgestellt und kritisch beleuchtet.

3.18 Dose-response modelling of staphylococcal enterotoxins using outbreak data: which model, which precision?

Dr. Laurent Guillier

Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, Maisons-Alfort (Frankreich)

Although staphylococcal food poisoning (SFP) is one of the most common food-borne diseases and results from the ingestion of staphylococcal enterotoxins (SEs), small amount of data are available for establishing a dose response. Up to now the main source of information is the data collected during outbreaks [1].

The concept of dose-response modelling and the data necessary for its establishment will be presented. A focus will be done on the different possible effects and the time of onset of symptoms that were reported in a set of French SFP outbreaks. The recent example of dose-response modelling for SEA and benchmark dose assessment [1] will be then detailed.

New insights will be finally presented on how uncertainty could be better taken into account and on how should be tackled mixture of SEs.

References

1. Guillier, L., Bergis, H., Guillier, F., Noel, V., Auvray, F., & Hennekinne, J. A. (2016). Dose-response Modelling of Staphylococcal Enterotoxins Using Outbreak Data. *Procedia Food Science*, 7, 129-132.

3.19 Von der Taxonomie zum Risiko – Differenzielle *Bacillus cereus* Diagnostik

Prof. Dr. Monika Ehling-Schulz

Veterinärmedizinische Universität Wien, Wien (Österreich)

Der Text lag bei Redaktionsschluss noch nicht vor.

3.20 Botulismus: Eine altbekannte Erkrankung stellt uns vor neue Herausforderungen

Dr. Brigitte Dorner

Robert Koch-Institut, Berlin

Die Erkrankung Botulismus ist in der europäischen Zoonose-Richtlinie 2003/99/EG (17.11.2003) erfasst und stellt in Deutschland eine seltene Erkrankung dar, bei der jedoch immer wieder schwerwiegende oder fatale Verläufe beobachtet werden. In der Praxis wird die Diagnose Botulismus vielfach anamnestisch und klinisch gestellt, denn die Diagnostik von Botulismus ist aufgrund der Komplexität der verursachenden Botulinum Neurotoxine (BoNT) außerordentlich schwierig. Botulinum Neurotoxine sind die giftigsten bekannten Substanzen überhaupt und zählen zu den bioterroristisch relevanten Agenzien.

Klassischer Botulismus beim Menschen wird hervorgerufen durch von *C. botulinum*, *C. baratii* oder *C. butyricum* produzierte Botulinum Neurotoxine der Serotypen A, B, E oder F. Bei Tieren wird akuter Botulismus hauptsächlich durch die Serotypen C, D und ihren Mosaikvarianten CD und DC verursacht. Akuter Botulismus im Menschen wird in Deutschland im Wesentlichen über Sporen- und/oder Toxin-kontaminierte Lebensmittel ausgelöst (Lebensmittel-Botulismus). Daneben kommen der Wundbotulismus (durch Besiedelung von Wunden mit paralleler Toxinproduktion) und der Säuglingsbotulismus (durch Kolonisierung des Darms von Neugeborenen mit paralleler Toxinproduktion) vor.

In den letzten 30 Jahren wurde erkannt, dass BoNT zwar einerseits eine Bedrohung für die menschliche Gesundheit darstellt, dass es aber andererseits sehr erfolgreich für gezielte medizinische Applikationen eingesetzt werden kann, darunter eine Vielzahl neuromuskulärer Erkrankungen (Strabismus; diverse spastische Erkrankungen; Hyperhidrose; diverse Schmerzkrankungen). Seit 1993 ist BoNT auch für die kosmetische Nutzung zugelassen. Im Zusammenhang mit der medizinischen und kosmetischen Nutzung von BoNT sind iatrogene Botulismusfälle beschrieben. Ein anderer Aspekt des Toxins ist, dass es aufgrund seiner außerordentlichen Toxizität in verschiedenen staatlichen B-Waffenprogrammen untersucht wurde und seit dieser Zeit unter das Biologiewaffenübereinkommen sowie das Kriegswaffenkontrollgesetz fällt. BoNT ist daher insgesamt eine klassische *dual-use*-Substanz.

Die molekulare Wirkungsweise der BoNTs ist gut beschrieben: nach Bindung an spezifische Oberflächenrezeptoren an der neuromuskulären Endplatte werden die Toxine internalisiert und blockieren die neuronale Reizweiterleitung cholinergischer Neuronen, indem sie die synaptischen Proteine SNAP-25 (BoNT/A, /C, /E), VAMP-2 (BoNT /B, /D, /F, /G) oder Syntaxin (BoNT/C) spalten.

Seit 2014 ist das Konsiliarlabor für *C. botulinum* am Robert Koch-Institut angesiedelt. Die Herausforderung im Bereich der Botulismus-Diagnostik liegt darin, dass sich die BoNT-Serotypen in derzeit mehr als 40 Subtypen aufgliedern lassen, die sich in ihrer Aminosäuresequenz, in ihren antigenen Eigenschaften und ihrer funktionellen Aktivität unterscheiden. Da die Neurotoxine verpackt in Hüllproteine produziert werden, müssen sowohl die freien Neurotoxine, als auch die Neurotoxin-Komplexe und darüber hinaus alle Subtypen der Serotypen sicher erfasst werden. Die hohe Toxizität der BoNT stellt *per se* höchste Anforderungen an die Sensitivität diagnostischer Verfahren bis in den unteren pg/mL-Bereich.

Im Vortrag wird ein Überblick über am RKI etablierte Nachweisverfahren zur BoNT-Diagnostik auf der Basis von immunologischen, funktionellen, spektrometrischen und molekularbiologischen Methoden gegeben. Aktuelle Aktivitäten im Bereich der Standardisierung von BoNT-Nachweisverfahren werden dargestellt.

3.21 Die Tücke steckt im Detail! Herausforderungen und Grenzen des Nachweises von Staphylokokken-Enterotoxinen im Lebensmittel

Dr. Alexandra Fetsch

Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin

In der EU-weiten Statistik über Lebensmittel-bedingte Ausbrüche kommt den von Staphylokokken und insbesondere *Staphylococcus (S.) aureus* gebildeten bakteriellen Toxinen eine herausragende Bedeutung zu. So wurden in 2014 bei insgesamt 393 Lebensmittel-bedingten Ausbrüchen Staphylokokken-Toxine als ursächliches Agens identifiziert; dies entspricht einem Anteil von 7,5 % an allen Lebensmittel-bedingten Ausbrüchen in der EU. Seit 2011 wird zudem ein ansteigender Trend beobachtet (EFSA and ECDC, 2015).

Bei einer durch Staphylokokken-Toxine ausgelösten Lebensmittel-bedingten Erkrankung handelt es sich um eine klassische Intoxikation. So liegen die Toxine bereits im Lebensmittel vor und werden beim Verzehr aufgenommen. Zudem treten die Symptome schnell ein (unmittelbar bis maximal 7 Stunden nach Verzehr des kontaminierten Lebensmittels). Auslöser für Staphylokokken-bedingte Intoxikationen sind die Staphylokokken-Enterotoxine (SE), die als Superantigene fungieren (d. h. direkt mit dem Immunsystem interagieren können). SE sind hitzestabil und können die Magen-Darm-Passage überstehen. Damit es zur Bildung der Toxine kommt muss sich das Bakterium im Lebensmittel ausreichend vermehrt haben. Hierfür müssen günstige Bedingungen vorherrschen, die in erster Linie von den Eigenschaften des Bakteriums und der Beschaffenheit der Lebensmittelmatrix (Gehalt an Proteinen) sowie von der Kombination aus Temperatur/Zeit abhängt. Im Falle von *S. aureus* wird zudem postuliert, dass sich das Bakterium auf Keimlevel von log 5–6 KBE/g vermehren muss, damit es zur Exprimierung von (nachweisbarem) Toxin kommt (Bryan *et al.*, 1997). Die typischen Erkrankungssymptome einer Staphylokokken-Intoxikation sind Übelkeit, Erbrechen, Bauchkrämpfe, ggf. Durchfall und Kreislaufsymptome. Die Erkrankung ist in der Regel selbstlimitierend, aber auch schwere Verlaufsformen und vereinzelt Todesfälle werden beobachtet.

Anhand serologischer Kriterien unterscheidet man bis dato mindestens 23 verschiedene Staphylokokken-Enterotoxintypen (SE bzw. SE-like A bis E und G bis Y). Die größte Bedeutung als Verursacher von Lebensmittelintoxikationen haben die fünf klassischen Toxintypen SE-A bis –E, was allerdings auch in methodischen Limitationen begründet ist (Fetsch *et al.*, 2016). Denn trotz der Vorgaben durch die EU-Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 über mikrobiologische Kriterien, in der für bestimmte Produkte (verschiedene Käsearten) Lebensmittelsicherheitskriterien für SE erlassen wurden, ist der Nachweis und die Quantifizierung von SE nach wie vor eine große Herausforderung. So gibt es aktuell nur für die SE-Typen A-E für die (amtliche) Routine geeignete, rein qualitative immunologische Nachweismethoden auf der Basis der ELISA- (*Enzyme-Linked Immunosorbent-Assay*) Technik. Dies ist besonders deshalb unbefriedigend, da anhand epidemiologischer Daten eine Zunahme von Ausbruchsfällen aufgezeigt wurde, bei denen *S. aureus* aus Lebensmitteln und/oder von erkrankten Personen isoliert wurde, die keine der für die fünf „klassischen“ Toxintypen SEA-SEE codierenden Gene trugen, stattdessen aber Toxingene die für SEG, SEH und SEI codierten.

Neben den Limitationen hinsichtlich des Nachweises der verschiedenen SE-Typen bedingt auch die Vielfalt und Komplexität der Lebensmittelmatrizes selbst, dass der Nachweis von SE nicht immer zuverlässig gelingt und dass Neuentwicklungen von Nachweismethoden eine Herausforderung darstellen. Hier können Produkt-eigene Komponenten leicht zu falsch-positiven Ergebnissen führen, insbesondere beim Einsatz immunologischer Methoden.

Auch die Aufklärung von Lebensmittel-bedingten Ausbrüchen gestaltet sich oftmals schwierig. Hier sind durch SE-ausgelöste Ausbrüche von denen durch andere Toxinbildner, wie bspw. *Bacillus cereus*, sicher abzugrenzen, obwohl sich die Intoxikationssymptomatiken bei

beiden sehr ähneln. Der oftmals milde und selbstlimitierende Verlauf der Erkrankung erschwert das Erkennen von durch SE-ausgelösten Lebensmittel-bedingten Ausbrüchen zusätzlich.

Im Vortrag sollen zum einen die derzeit verfügbaren methodischen Möglichkeiten und Grenzen zum Nachweis von Staphylokokken-Enterotoxinen im Lebensmittel sowie aktuelle Entwicklungen aufgezeigt werden. Dies schließt auch die Bemühungen auf internationaler Ebene zur Einführung eines CEN/ISO- Methodenstandards zum qualitativen Nachweis von SE im Lebensmittel ein; bis dato handelt es sich bei dem in der Routine eingesetzten Verfahren nämlich lediglich um ein Screeningverfahren, das vom Europäischen Referenzlabor für Koagulase-positive Staphylokokken einschließlich *S. aureus* (ANSES, Maisons-Alfort, Frankreich) entwickelt wurde. Gleichzeitig soll im Vortrag auf die Herausforderungen die im Zusammenhang mit der Aufklärung von durch Staphylokokken-Enterotoxinen ausgelösten Lebensmittel-bedingten Ausbrüchen zu meistern sind fokussiert werden, da sich auch hierbei die Folgen der begrenzten Nachweismöglichkeiten von SE widerspiegeln. Schließlich werden die (Forschungs-)Aktivitäten des NRL-Staph auf nationaler, und internationaler Ebene aufgezeigt.

Literatur

1. Bryan, F.L., Guzewich, J.J., Todd, E.C.D., 1997. Surveillance of foodborne disease II. Summary and presentation of descriptive data and epidemiological patterns; their value and limitations. *Journal of Food Protection* 60, 567-578.
2. EFSA and ECDC, 2015. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014. *EFSA Journal* 2015;13(12):4329, 191 pp.
3. Fetsch, A., Steege, K., Leeser, D., Krause, G., 2016. Interlaboratory Proficiency Testing trial on the Detection of Staphylococcal Enterotoxins types SEA to SEE in food in Germany 2013. *Berliner und Muenchener Tierärztliche Wochenschrift* 129: 290-295.

4 Autorenverzeichnis

- Al Dahouk, Sascha 33
Alt, Katja 11
Amore, Giusi 39
Borowiak, Maria 33
Bräunig, Juliane 33
Busch, Ulrich 33
Dieckmann, Ralf 33
Dorner, Brigitte 59
Ehling-Schulz, Monika 57
Fetsch, Alexandra 11, 61
Flieger, Antje 33
Frank, Christina 15
Guillier, Laurent 55
Halbedel, Sven 33
Hammerl, Jens André 33
Hauser, Elisabeth 11
Hennekinne, Jacques-Antoine 51
Hensel, Andreas 33
Horlacher, Sabine 33
Käsbohrer, Annemarie 11
Kleta, Sylvia 11, 33
Luber, Petra 33
Malorny, Burkhard 33
Maurischat, Sven 35
Messelhäußer, Ute 31, 33, 53
Miko, Angelika 11
Müller, Ursula 27
Nauta, Maarten 29
Prager, Rita 33
Rabsch, Wolfgang 19
Rostalski, Anja 25
Schelin, Jenny 47
Schnabel, Martin 27
Schönberger, Katharina 33
Seyboldt, Christian 45
Stephan, Dietrich 43
Stingl, Kerstin 11
Szabo, Istvan 11, 17
Tenhagen, Bernd-Alois 11
Trost, Eva 33
Vygen-Bonnet, Sabine 33
Wilking, Hendrik 33
Zucker, Bert-Andre 23