

Lehrstuhl für Tierhygiene
Technische Universität München
(Univ.-Prof. Dr. Johann Bauer)

Zum Nachweis von *Salmonella* spp. mit Immunomagne- tischer Separation-Real-time PCR in Lebensmitteln tieri- schen Ursprungs

Angelika Christiane Notzon

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernäh-
rung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des
akademischen Grades eines

Doktors der Haushalts- und Ernährungswissenschaften (Dr. oec. troph.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Gerhard Cerny

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. Johann Bauer
2. Univ.-Prof. Dr. Siegfried Scherer

Die Dissertation wurde am 28.07.2005 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung
und Umwelt am 17.10.2005 angenommen.

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

A	Einleitung	5
B	Literatur	6
1	Taxonomie und Eigenschaften von <i>Salmonella</i> spp.	6
2	Verankerung von <i>Salmonella</i> spp. in der Umwelt	12
3	Vorkommen von <i>Salmonella</i> spp. während des Schlachtprozesses	14
4	Vorkommen <i>Salmonella</i> spp. im Lebensmittel Fleisch	16
5	<i>Salmonella</i> spp. als Zoonoseerreger des Menschen	17
6	Nachweisverfahren	18
6.1	Kulturelles Referenzverfahren nach § 35 LMBG	18
6.2	Möglichkeiten zur Reduktion der Versuchsdauer	22
6.2.1	Reduktion der Voranreicherungszeit durch Wachstumsstimulantien	23
6.2.2	Reduktion der Zeitdauer für die selektive Anreicherung	27
6.2.3	Reduktion der Zeitdauer für die Identifizierung und Bestätigung	29
7	Bestimmung der bakteriellen Lebensfähigkeit durch molekularbiologische Methoden .	35
C	Material und Methoden	38
1	Material	38
1.1	Gebrauchslösungen	38
1.2	Gebrauchsmaterial	39
1.3	Verbrauchsmaterial	39
1.4	Chemikalien	40
1.5	Nährmedien	41
1.6	Biologisches Material	42
1.6.1	Referenzkeim	42
1.6.2	Probenmaterial und –lagerung	42
2	Methoden	43
2.1	Allgemeine mikrobiologische Methoden	43
2.1.1	Kontrollstamm und dessen Anzucht	43
2.1.2	Ermittlung der Keimkonzentration von <i>Salmonella</i> -Suspensionskulturen	43
2.1.3	Artefizielle Kontamination von Probenmaterial	44
2.2	Real-time PCR-Einstellungen	44
2.3	Untersuchungen zum Wachstumsverhalten von <i>S. Enteritidis</i> DSM 9898	46
2.3.1	Untersuchungen zur Wachstumskinetik und –stimulation von <i>S. Enteritidis</i> DSM 9898 ..	46
2.3.2	Untersuchungen zur Unterscheidung von lebenden und toten <i>S. Enteritidis</i> DSM 9898..	47
2.4	Anpassung und Optimierung der IMS-real-time PCR-Methode an die Vorgaben des amtlichen Verfahrens nach §35 LMBG	48
2.4.1	Probenaufbereitung vor IMS	49
2.4.2	DNA-Aufreinigung	52
2.5	In house-Validierung der IMS-real-time PCR-Methode anhand des kulturellen Referenzverfahrens nach §35 LMBG durch artefiziell kontaminierte Fleischproben	53
2.5.1	Überprüfung der Leistungsfähigkeit der IMS-real-time PCR-Methode im Vergleich zum amtlichen Verfahren nach §35 LMBG an artefiziell kontaminiertem Fleisch	53
2.5.2	Darstellung der Validierungsparameter beider Methoden	57
2.5.3	Unterscheidung einer Kontamination von lebenden und toten Salmonellen mittels IMS-real-time PCR aus Fleisch	58
2.6	Überprüfung der Leistungsfähigkeit der IMS-real-time PCR-Methode anhand nativ kontaminierter Feldproben – ein Vergleich mit dem amtlichen Verfahren nach §35 LMBG .	60
2.6.1	Methodisches Vorgehen	60
2.6.2	Vergleich beider Methoden	62

D	Ergebnisse	63
1	Untersuchungen zum Wachstumsverhalten von <i>S. Enteritidis</i> DSM 9898	63
1.1	Untersuchungen zur Wachstumskinetik und –stimulation von <i>S. Enteritidis</i> DSM 9898	63
1.2	Untersuchungen zur Unterscheidung von lebenden und toten <i>S. Enteritidis</i> DSM 9898	65
2	Anpassung und Optimierung der IMS-real-time PCR-Methode an die Vorgaben des amtlichen Verfahrens nach §35 LMBG	72
2.1	Probenaufbereitung vor IMS	72
2.2	DNA-Aufreinigung	77
3	In house-Validierung der IMS-real-time PCR-Methode anhand des kulturellen Referenzverfahrens nach §35 LMBG durch artefiziell kontaminierte Fleischproben	80
3.1	Überprüfung der IMS-real-time PCR-Methode im Vergleich zum amtlichen Verfahren nach §35 LMBG an artefiziell kontaminiertem Fleisch	80
3.1.1	IMS-real-time PCR-Verfahren	80
3.1.2	Vergleich der Wiederfindungsraten beider Methoden	81
3.1.3	Darstellung der Validierungsparameter der IMS-real-time PCR-Methode	82
3.2	Unterscheidung einer Kontamination von lebenden und toten <i>Salmonella</i> spp. mittels IMS-real-time PCR aus Fleisch	83
4	Überprüfung der IMS-real-time PCR-Methode anhand nativ kontaminierter Feldproben – ein Vergleich mit dem amtlichen Verfahren nach §35 LMBG	84
4.1	Auswertung des Probenmaterials	85
4.1.1	Probenumfang	85
4.1.2	Anteil positiver Proben und deren Serovarverteilung im kulturellen Referenzverfahren nach §35 LMBG	85
4.2	Vergleich der IMS-real-time PCR-Methode mit dem kulturellen Referenzverfahren nach §35 LMBG	87
4.2.1	Darstellung der Übereinstimmung beider Methoden	87
4.2.2	Darstellung der Abweichungen beider Methoden	90
E	Diskussion	93
1	Reduktion der Voranreicherungszeit durch Wachstumsstimulantien	93
2	Unterscheidung von lebenden und toten <i>Salmonella</i> spp.	96
3	Anpassung und Optimierung der IMS-real-time PCR-Methode an das amtliche Referenzverfahren nach §35 LMBG	100
4	Vergleich der IMS-real-time PCR-Methode mit dem kulturellen Referenzverfahren nach §35 LMBG	102
4.1	Artefiziell kontaminiertes Probenmaterial	102
4.2	Nativ kontaminiertes Probenmaterial	104
4.3	Zeitbedarf	107
5	Diagnostische PCR	108
F	Zusammenfassung	112
G	Summary	114
H	Literaturverzeichnis	116
I	Abbildungsverzeichnis	154
K	Tabellenverzeichnis	155
L	Anhang	158

Abkürzungsverzeichnis

BSeuchG	<u>B</u> undes <u>s</u> euchengesetz
bzw.	<u>b</u> eziehu <u>n</u> gs <u>w</u> eise
ca.	<u>c</u> ir <u>c</u> a
cAMP	<u>c</u> yclic <u>A</u> denosine <u>M</u> onophosphate
CEN	<u>C</u> omité <u>E</u> uropéen de <u>n</u> ormalisation
DNA	<u>D</u> esoxyribo <u>n</u> ucleic <u>A</u> cid
dNTP	<u>d</u> esoxy <u>n</u> ukleotide <u>t</u> riphosphat
dsDNA	<u>d</u> ouble <u>s</u> tranded DNA
<i>E.</i>	<u>E</u> scherichia
ELISA	<u>E</u> nzyme- <u>L</u> inked- <u>I</u> mmuno <u>s</u> orbent- <u>A</u> ssay
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
<i>h</i>	Stunde
HFIV	<u>H</u> ack <u>f</u> leisch <u>v</u> erordnung
IMS	<u>I</u> mmuno <u>m</u> agnetische <u>S</u> eparation
ISO	<u>I</u> nternational <u>S</u> tandard <u>O</u> rganization
KBE	<u>K</u> olonie <u>b</u> ildende <u>E</u> inheit
LMBG	<u>L</u> ebens <u>m</u> ittel- und <u>B</u> edarfsge <u>g</u> enstände <u>g</u> esetz
LPS	<u>L</u> ipopolysaccharid
mRNA	<u>m</u> essenger RNA
MSRV	<u>M</u> odified <u>S</u> emi-solid <u>R</u> appaport <u>V</u> assiliadis Medium
MW	arithmetischer <u>M</u> ittel <u>w</u> ert
NASBA	<u>N</u> ucleic <u>A</u> cid <u>S</u> equence- <u>B</u> ased <u>A</u> mplification
NRZ	<u>N</u> ationales <u>R</u> eferenzlaboratorium für die Epidemiologie der <u>Z</u> oonosen
PBS	<u>P</u> hosphate <u>B</u> uffered <u>S</u> aline
PCR	<u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction
RNA	<u>R</u> ibonucleic <u>A</u> cid
rRNA	<u>r</u> ibosomale RNA
RT-PCR	<u>R</u> everse- <u>T</u> ranscriptase <u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction
<i>S.</i>	<u>S</u> almonella
SDA	<u>S</u> trand <u>D</u> isplacement <u>A</u> mplification
SPI-1	<u>S</u> almonella <u>P</u> athogenicity <u>I</u> sland 1
SPI-2	<u>S</u> almonella <u>P</u> athogenicity <u>I</u> sland 2
spp.	Spezies
STAW	<u>S</u> tandard <u>a</u> b <u>w</u> eichung

tRNA	<u>t</u> ransfer RNA
TTSS	<u>T</u> yp <u>III</u> <u>S</u> ekretionssystem
Upm	<u>U</u> mdrehungen <u>p</u> ro <u>M</u> inute
VBNC	<u>V</u> iable <u>b</u> ut <u>n</u> on <u>c</u> ulturable
WHO	<u>W</u> orld <u>H</u> ealth <u>O</u> rganisation
z.B.	<u>z</u> um <u>B</u> eispiel
α	Irrtumswahrscheinlichkeit (Fehler 1. Art)

A Einleitung

Lebensmittel tierischer Herkunft sind häufig mit Salmonellen kontaminiert. Aufgrund mangelnder Hygiene in der Lebensmittelverarbeitung und –lagerung führen solche Lebensmittel über den Verzehr zu Salmonelleninfektionen. Aktuelle Zahlen des Robert-Koch-Instituts belegen, dass diese Infektionskrankheit auch in Industrieländern eine wichtige Rolle spielt. So wurden im Jahr 2004 etwa 57.000 Salmonellosen gemeldet. Die Vergleichszahl für das Vorjahr 2003 lag bei etwa 63.000 gemeldeten Infektionen (ANONYMUS, 2005a). Zwar ist ein rückläufiger Trend bei den Salmonellosen erkennbar, dennoch bleibt sie eine bedeutende Infektionskrankheit. Wie hoch nämlich die tatsächliche Zahl der Salmonellenerkrankungen liegt, kann nur geschätzt werden. Das Nationale Referenzlaboratorium für die Epidemiologie der Zoonosen (NRZ) geht davon aus, dass die gemeldeten Fälle nur 10 % der tatsächlich vorkommenden Erkrankungsfälle darstellen (MEHNERT ET AL., 2001). Dies zeigt die Notwendigkeit eines selektiven, sensitiven und schnellen Nachweises von Salmonellen im Hinblick auf die Lebensmittelsicherheit und einen präventiven Verbraucherschutz an. Konventionelle kulturelle Verfahren liefern jedoch erst nach 5-7 Tagen ein bestätigtes Ergebnis, so dass Interventionen im Sinne eines vorsorgenden Verbraucherschutzes kaum zu realisieren sind. Deshalb sind Screeningmethoden notwendig, die innerhalb eines Tages ein Ergebnis liefern und gleichzeitig die Qualität der erzielten Resultate denen des Referenzverfahrens entspricht.

Ziel dieser Arbeit war es, die von SCHMID (2002) entwickelte IMS-real-time PCR-Methode zunächst an die Vorgaben des Referenzverfahrens nach §35 LMBG anzupassen und zu optimieren. Anschließend wurde die Leistungsfähigkeit der Schnellmethode anhand des kulturellen Referenzverfahrens nach §35 LMBG mit artefiziell sowie nativ kontaminierten Fleischproben validiert.

Da eine Gefährdung des Verbrauchers nur von lebenden pathogenen Keimen ausgeht, muß ein Nachweisverfahren auch in der Lage sein, zwischen lebenden und toten Zellen zu differenzieren. Deshalb wurde auch die Fähigkeit der IMS-real-time PCR-Methode auf ihre Fähigkeit zur Unterscheidung von lebenden und toten *Salmonella* spp. hin überprüft.

B Literatur

1 Taxonomie und Eigenschaften von *Salmonella* spp.

Die Gattung *Salmonella* gehört zur Familie der *Enterobacteriaceae* (BRENNER, 1984). Sie sind gram-negative, fakultativ anaerobe, nicht-sporenbildende Stäbchen, von denen die Mehrzahl durch eine peritriche Begeißelung beweglich ist (Ausnahme *S. Gallinarum* sowie *S. Pullorum*) (LE MINOR, 1984; BELL UND KYRIAKIDES, 2002). Das Genus besteht aus zwei Spezies – *S. enterica* und *S. bongori*. Die Spezies *S. enterica* wird dabei in sechs Subspezies unterteilt (Tabelle 1). Zu dieser Subspezies zählen die meisten Serovare. Sie gelten als obligat pathogen für homoiotherme Tiere und den Menschen. Die Serovare der Subspezies *salamae*, *arizonae* und *diarizonae* gelten selten als pathogen für Warmblüter und treten vor allem bei poikilothermen Tieren auf. Die Subspezies *houtenae* und *indica* sowie die Spezies *S. bongori* haben ihren Standort primär in der Umwelt (GAREIS, 1995).

Tabelle 1: Taxonomie der Gattung *Salmonella* (verändert nach POPOFF ET AL., 2004).

Familie	Genus	Spezies	Subspezies	Anzahl der Serovare je Spezies und Subspezies
<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	subsp. <i>enterica</i>	1504
			subsp. <i>salamae</i>	504
			subsp. <i>arizonae</i>	95
			subsp. <i>diarizonae</i>	333
			subsp. <i>houtenae</i>	72
			subsp. <i>indica</i>	13
	<i>bongori</i>	22		
Gesamtzahl				2541

Die in Tabelle 1 angegebene Einteilung stellt die gegenwärtig gültige Nomenklatur der Gattung *Salmonella* dar (LE MINOR UND POPOFF, 1987). Die Gliederung des Genus erfolgt auf Basis der O- und H-Antigene und wird durch das Kauffmann-White Schema zusammengefasst. Dieses Schema stellt die international verbindliche Grundlage für die Ordnung der Salmonellen dar. Für die Aktualisierung dieses Schemas ist das WHO Collaborating Centre

for Reference and Research on *Salmonella* (Institut Pasteur, Paris) verantwortlich (BRENNER ET AL., 2000; ROLLE UND MAYR, 2002).

Für epidemiologische Betrachtungen werden Salmonellen nach serologischen, biochemischen und molekularbiologischen Eigenschaften eingeteilt.

Die Antigenformeln der serologischen Einteilung in das Kauffmann-White-Schema beinhalten die O-Antigene sowie H-Antigene der 1. und 2. Phase (LE MINOR, 1984). Das thermostabile O-(somatische) Antigen ist Bestandteil des LPS-Komplexes der äußeren Membran. Dessen O-spezifische Polysaccharidkette wird dabei als O-Antigen bezeichnet. Aufgrund der chemischen Feinstruktur resultiert eine große Zahl von Antigenvarianten, die schließlich zur Typisierung der Salmonellen verwendet wird (KAYSER ET AL., 1998). Die O-Antigene werden weiter in Haupt- und Minor-O-Antigene eingeteilt. Sogenannte S-(Smooth)-Formen stellen Serovare mit vollständig ausgeprägtem LPS-Antigen dar. Sie agglutinieren mit *Salmonella*-spezifischen Antikörpern. Im Gegensatz dazu existieren R-(Rough)-Formen. Dies sind Varianten, die unvollständiges LPS-Antigen in die Agglutinationsreaktion einbringen. Daraus resultiert eine schwache oder gar keine Agglutination mit *Salmonella*-spezifischen Antikörpern (D'AOUST, 1997). Die H-Antigene sind thermolabile, aus Proteinen bestehende Geißelantigene (Flagellin) (KAYSER ET AL., 1998). Die einzelnen *Salmonella* Stämme können ein (monophasisch) oder zwei (diphasisch) H-Antigene bilden. Häufig liegen sie in zwei Phasen vor, wobei die Kultur einer diphasischen Serovar sowohl aus Zellen mit der 1. als auch Zellen mit der 2. Phase besteht. Die einzelne Zelle exprimiert jeweils nur H-Antigen einer Phase. Dies liegt darin begründet, dass H-Antigene aus zwei genetisch unterschiedlichen Strukturen vorkommen. Die Primärstruktur des Flagellins ist durch zwei Gene auf dem Chromosom festgelegt, von denen immer nur eines abgelesen wird. Durch spontane Inversion einer DNA-Sequenz vor dem Gen H2 wird dieses abgelesen oder nicht. Ausschließlich monophasisch sind z.B. *S. Typhi* und *S. Dublin* (D'AOUST, 1997; KAYSER ET AL., 1998; ROLLE UND MAYR, 2002). Der Nachweis der O- und H-Antigene erfolgt durch Objektträgeragglutination mittels *Salmonella*-spezifischen Antiseren.

Neben der serologischen Einteilung bedient man sich zur Identifizierung von *Salmonella* spp. ihrer biochemischen Eigenschaften. Die charakteristischen Stoffwechseleigenschaften fasst Tabelle 2 zusammen.

Tabelle 2: Charakteristische Stoffwechseleigenschaften des Genus *Salmonella* (basierend auf BRENNER, 1984; LE MINOR, 1984; ROLLE UND MAYR, 2002).

Stoffwechselreaktion	allgemeine Reaktion
Katalase	+
Oxidase	-
Urease	-
Lysin Decarboxylase	+
Ornithin Decarboxylase	+
Säureproduktion von Laktose ¹	-
Gasproduktion aus Glukose ²	+
Nutzung von Citrat als alleinige Kohlenstoffquelle ²	+
Bildung von H ₂ S aus Dreizucker-Eisen-Agar	+
Reduktion von Nitrat zu Nitrit	+
Indol	-
oxidative Deaminierung von Phenylalanin und Tryptophan	-

+: positive Reaktion
 -: negative Reaktion
 1: Eine Ausnahme bilden die Subspezies *arizonae* und *diarizonae*.
 2: Eine Ausnahme bildet *S. Typhi*.

Serovare können im weiteren durch Bakteriophagen kategorisiert werden. Es erfolgt eine Unterteilung der *Salmonella*-Serovare in Lysotypen. Ein Phagentyp ist determiniert durch die Sensitivität der Zelle gegenüber der lytischen Aktivität eines selektierten Bakteriophagen. Zur Bestimmung der Lysotypen von *S. Typhimurium* wird häufig das erweiterte Schema nach ANDERSON ET AL. (1977) genutzt. Für *S. Enteritidis* hat sich das Schema von WARD ET AL. (1987) durchgesetzt (BELL UND KYRIAKIDES, 2002; ROLLE UND MAYR, 2002). Zur Typisierung von *Salmonella* spp. verwendet man auch molekularbiologische Methoden, die sich auf die Festsetzung von DNA-Mustern auf Basis von Plasmid-DNA oder chromosomaler DNA stützen (ROLLE UND MAYR, 2002).

Eine weitere epidemiologische Klassifikation von *Salmonella* spp. erfolgt aufgrund ihrer Wirtsanpassung und Virulenz in vier Gruppen. Zum einen unterscheidet man wirtsspezifische Serovare, die sich zum einen an den Menschen adaptiert (z.B. *S. Typhi* oder *S. Paratyphi*) oder an das Tier angepasst haben (*S. Dublin* (Rind), *S. Choleraesuis* (Schwein)). Zur dritten Gruppe zählen Serovare ohne spezielle Wirtsanpassung und geringer Virulenz. Sie bilden die größte Gruppe und spielen als Erreger von Enteritiden und Lebensmittelvergiftungen eine bedeutende Rolle. In die vierte Gruppe fallen Serovare ohne Wirtsspezifität aber hoher Virulenz (*S. Enteritidis* und *S. Typhimurium*). Sie verursachen bei Risikogruppen lebensbedrohliche Infektionen (GRAY UND FEDORKA-CRAY, 2002; ROLLE UND MAYR, 2002).

Beide *Salmonella*-Spezies gelten als pathogen für Mensch und Tier. Erst nach entsprechender Prüfung dürfen Serovare oder Stämme als avirulent eingestuft werden (ROLLE UND MAYR, 2002). Das Adhäsionsvermögen, die Fähigkeit zur systemischen Ausbreitung im Wirt sowie das Toxinbildungsvermögen bestimmen die Virulenz von Salmonellen (VARNAM UND EVANS, 1991).

Wirkung auf den Darm

Bakterielle Virulenz ist abhängig von Virulenzgenen, die speziell für die Auslösung einer Infektion verantwortlich sind (COTTER UND DIRITA, 2000; CLEMENTS ET AL., 2001). So sind *S. Typhimurium* Virulenzgene oft in Clustern beinhaltet (HANSEN-WESTER UND HENSEL, 2001; ZHOU UND GALÁN, 2001). Der initiale Pathogeneseschritt von nicht-tyhpiden *Salmonella* spp. besteht in der Fähigkeit, intestinales Epithel zu penetrieren. Der Prozeß der Invasion ist sowohl für die auf das Intestinum begrenzte Form der Salmonellose als auch für die systemische Form erforderlich. Dabei ist die Invasion keine passive Konsequenz aus einem Kontakt des Bakteriums mit der Epithelzelle, sondern vielmehr eine aktive Beteiligung mit der Expression zahlreicher bakterieller Virulenzgene (ALTIER, 2005). Folglich ist diese Invasion assoziiert mit der Induktion einer Vielzahl von Genen (COLLAZO UND GALÁN, 1997). Zwei Virulenz-assoziierte Typ III Proteinsekretionssysteme in *Salmonella* spp. sind durch sogenannte *Salmonella* pathogenicity islands, SPI-1 und SPI-2, auf dem bakteriellen Chromosom kodiert (GALÁN, 2001). Die SPI-1 Gene kodieren für ein Typ III Proteinsekretionsystem (TTSS). Das TTSS ist von supramolekularer, Organell-ähnlichen Struktur, das für den Transport bakterieller Virulenzfaktoren in die Wirtszelle verantwortlich ist (KIMBROUGH UND MILLER, 2002). Der Apparat umspannt die innere und äußere Membran des Bakteriums (KUBORI ET AL., 1998). Das SPI-1 kodierte Typ III Sekretionssystem ist spezialisiert auf die Invasion von Epithelialzellen, die durch die Abgabe von bakteriellen Effektor-(Virulenz)-Proteinen direkt in das Cytoplasma der Wirtszelle erreicht wird. Dadurch werden biochemische Funktionen der Wirtszelle, wie z.B. Signaltransduktion, Zytokinproduktion oder die Struktur des Aktin-Cytoskeletts manipuliert (LILIC UND STEBBINS, 2004). Diese Veränderung des Cytoskeletts der Eukaryontenzelle beinhaltet eine Umordnung der Aktinfilamente und ein Umschließen des in die Zelle eingedrungenen Bakteriums, das innerhalb der Vakuolen bleibt (GALÁN, 2001). Innerhalb dieser Vakuole können Salmonellen überleben und in tieferes Gewebe vordringen. Dieser Vorgang induziert eine starke Entzündungsantwort. Eine intestinale Salmonellose endet an dieser Stelle und wird durch das regionale Lymphgewebe im Intestinaltrakt begrenzt (ALTIER, 2005).

Die Kontrolle der Invasion beinhaltet eine Zahl an genetischen Regulatoren und Umweltstimuli, die miteinander in einer komplexen Beziehung stehen (ALTIER, 2005). So ist der Code

für die Regulationsproteine HilA, HilC, HilD und invF auf dem SPI-1 lokalisiert (LOSTROH UND LEE, 2001). Zu den Umweltbedingungen, die die Invasion regulieren, zählen pH-Wert, Osmolarität, Galle, Mg^{2+} -Konzentration sowie kurzkettige Fettsäuren (ALTIER, 2005).

Im Falle der Septikämie vermehren sich die Salmonellen in lymphatischem Gewebe und verbreiten sich über die Blut- und Lymphbahnen in größere Organe (ALTIER, 2005).

Eine der Hauptfunktionen der SPI-1 Pathogenitätsinsel ist folglich, die bakterielle Translokation vom intestinalen Lumen zur basolateralen Seite der intestinalen Mukosamembran zu ermöglichen. In dieser intrazellulären Infektionsphase wird die Transkription spezieller Virulenzgene wichtig, die die Ingestion durch phagozytische Zellen verhindern (RHEN UND DORMAN, 2005).

Dies schließt die zweite große Pathogenitätsinsel, SPI-2, ein, die für ein Typ III Proteinsekretionssystem und Effektorproteine kodiert (HANSEN-WESTER UND HENSEL, 2001; WATERMANN UND HOLDEN, 2003), die das Überleben und die Replikation der Salmonellen im Inneren der Vakuole ermöglichen. Dies ist erforderlich für die Entwicklung einer systemischen Infektion (GALÁN, 2001). Parallel dazu aktiviert das intrazelluläre Milieu auch die Transkription des *spv* (*Salmonella* plasmid virulence)-Virulenzgen-Clusters (RHEN ET AL., 1993; ROLLE UND MAYR, 2002; ERIKSSON ET AL., 2003). Beide, das SPI-2 und das *spv*-Gen-Cluster sind wichtig für die Induktion der bakteriellen Proliferation in phagozytischen Zellen, und beide Determinanten sind notwendig für die vollständige Virulenz in Mäusen (GULIG ET AL., 1993; LUCAS UND LEE, 2000; HANSEN-WESTER UND HENSEL, 2001).

Wirkung von Toxinen

Die invasive Fähigkeit der Salmonellen ist verantwortlich für die Diarrhoe und Enteritis, verbunden mit einer hohen Flüssigkeitssekretion. Die Invasivität kann aber nicht allein für die Symptomatik verantwortlich sein (VARNAM UND EVANS, 1991).

Zum einen wird ein Diarrhoe-erzeugendes Enterotoxin (thermolabiles Protein) gebildet, das in das Cytoplasma der Wirtszelle abgegeben wird und die normale Funktion des Enterozyten stört. Es stimuliert die Adenylatcyclase, wodurch die Konzentration an cAMP erhöht wird. Der massive Elektrolyt- und Wasserverlust resultiert aus einer Nettosekretion von Cl^- -Ionen in der kryptischen Region der intestinalen Mukosa und einer unterdrückten Na^+ -Absorption im Bereich der intestinalen Villi (FROMM ET AL., 1974). Im weiteren produzieren *Salmonella*-Spezies ein thermolabiles Enterotoxin, das funktionell und immunologisch dem Cholera toxin und den thermolabilen *E. coli* (LT) Enterotoxinen ähnelt. Es wird leicht durch das Cholera Antitoxin neutralisiert (PETERSON UND SANDEFUR, 1979). Das *Salmonella* Enterotoxin wird von dem chromosomalen Gen *stx* kodiert (CHOPRA ET AL., 1987).

Zudem bilden Salmonellen ein thermolabiles Cytotoxin, das an der äußeren Membran lokalisiert ist (ASHKENAZI ET AL., 1988; D'AOUST, 1991a). Es hemmt die Proteinbiosynthese und veranlasst damit verbunden die Lyse der Wirtszelle. Dadurch wird die Verbreitung von lebenden Salmonellen in das Gewebe bewerkstelligt (KOO ET AL., 1984; D'AOUST, 1991a; KAYSER ET AL., 1998).

Endotoxine kommen wie bei allen Enterobakterien auch bei Salmonellen vor. Die toxische Wirkung wird durch das Lipoid A (Region III des LPS) des LPS-Komplexes verursacht. Endotoxin entfaltet seine Wirkung nach der Lyse der Bakterienzelle. Die Bedeutung des LPS als Virulenzfaktor sollte allerdings nicht nur auf das Endotoxin beschränkt bleiben. Denn Defekte in den Regionen I und II führen zur Ausbildung von sogenannten R-Formen (Rauformen), die einen unterschiedlich starken Virulenzverlust verursachen. Außerdem schützt das Zellwand-LPS vor der antibakteriellen Wirkung der lysosomalen Enzyme im phagozytierenden Leukozyten (KAYSER ET AL., 1998; ROLLE UND MAYR, 2002). Die Salmonellen-Resistenz gegen die lytische Aktivität der Komplementkaskade variiert direkt mit der Länge der serotypischen (O) Seitenkette des LPS-Moleküls (D'AOUST, 1991a). S-(Smooth) Phänotypen sind resistenter gegen die Lyse als isogenetische Varianten, weil ein dauerhafter Einschub des C5b-9 Komplementkomplexes sterisch verhindert ist. Deshalb erfolgt bei S-Phänotypen im Gegensatz zu R-(Rough)-Phänotypen keine durch den Komplementfaktor vermittelte Bakterienlyse (JOINER, 1985; GROSSMANN ET AL., 1987).

Infektionsdosis

Bei Neugeborenen, Kleinkindern, alten und immunsupprimierten Menschen kann eine durch *Salmonella* spp. ausgelöste Gastroenteritis eine lebensbedrohliche Septikämie auslösen (ALTIER, 2005). Durch das unreife bzw. schwache Immunsystem dieser Personengruppen reagieren sie empfindlicher auf diese Krankheitserreger als gesunde Erwachsene (D'AOUST, 1989). Die determinierenden Faktoren für eine Salmonellose sind jedoch nicht nur limitiert durch die immunologische Heterogenität der Menschen und der Virulenz der infizierenden Stämme, sondern beinhalten auch die chemische Zusammensetzung des Lebensmittels. So führen fetthaltige Lebensmittel bereits bei einer Infektionsdosis von 10^1 bis 10^2 Erregerzellen zu einer Salmonellose (MÜLLER, 2002). Durch das lebensmitteleigene Fett werden die Salmonellen von einer hydrophoben Mizelle umschlossen, die verhindert, dass die Bakterien mit der bakterioziden Magensäure in Berührung kommen. Dadurch erreichen sie unbeschadet das Intestinum, wo sie nach einer Galle-vermittelten Dispersion der Mizellen frei werden und am Darmlumen adhären können (BLASER UND NEWMAN, 1982). Dagegen steigt die Infektionsdosis bei Speisen mit nachweislich langer Verweildauer im Magen auf 10^5 bis 10^7 KBE (MÜLLER, 2002).

2 Verankerung von *Salmonella* spp. in der Umwelt

Umwelt

Salmonellen zeigen eine komplexe Verankerung in der Biozönose (BAUER UND HÖRMANS-DORFER, 1995). Sie bewohnen den Intestinaltrakt einer großen Zahl von Tieren, Vögeln und Reptilien (VARNAM UND EVANS, 1991).

Um diese Verankerung weiter verstehen zu können, muß man den Charakter des Erregers und sein Lebensmilieu betrachten. So wachsen Salmonellen unter aeroben und anaeroben Bedingungen in einem Temperaturbereich von 5 °C bis 47 °C (Optimum: 37 °C); gegenüber Hitze sind sie relativ empfindlich; der D₆₅-Wert liegt bei 0,02 min bis 0,25 min. Sie tolerieren aber speziesabhängig pH-Werte im Bereich von 4 bis 9 (Optimum: 6,5 bis 7,5) (LE MINOR, 1984; KRÄMER, 1992).

Diese Eigenschaften tragen mit dazu bei, dass Salmonellen eine große Tenazität aufweisen. Aufgrund der Unempfindlichkeit und Widerstandskraft gegenüber äußeren Faktoren, die auch durch die hohe genetische Variabilität gegeben ist, können Salmonellen an den verschiedensten Standorten siedeln und kommen somit ubiquitär vor (BAUER UND HÖRMANS-DORFER, 1995; GAREIS, 1995; ALTIER, 2005).

Futtermittel

Die Rolle der Futtermittel bei der Verbreitung von Salmonellen wird immer wieder diskutiert (BAUER UND HÖRMANS-DORFER, 1995).

Neben Fischmehl spielen vor allem andere eiweißreiche Mehle tierischen Ursprungs, wie z.B. Tiermehl, aber auch Futtermittel pflanzlicher Herkunft, wie z.B. Pressrückstände ölhaltiger Samen und Sojamehl eine besondere Rolle. Das Vorkommen von Salmonellen in Futtermitteln ist fast immer die Folge einer Rekontamination, z.B. während des Transports, der Lagerung und der Verarbeitung zu Mischfuttermitteln (BISPING, 1993).

Im Futtermittel selbst kommen die das derzeitige Seuchengeschehen beim Menschen dominierenden Serovare *S. Typhimurium* und *S. Enteritidis* selten vor (BISPING, 1993; HARTUNG, 2004). Die 2003 am häufigsten aus Futtermitteln, v.a. aus Fischmehl, isolierten Serovare waren *S. Anatum*, *S. Senftenberg*, *S. Tennessee* sowie *S. Havanna* (SCHROETER ET AL., 2004).

Trotzdem kommt den Futtermitteln für die Verbreitung der Salmonellen Bedeutung zu. Auch wenn die aus Futtermitteln isolierten Serovare epidemiologisch nicht relevant erscheinen, kann eine von ihnen und damit vom Futtermittel ausgehende, über das Tier zum Menschen führende Infektkette in Gang gesetzt werden (BISPING, 1993). Untersuchungen von DANIELS ET AL. (2003) zeigten, dass in gelagerten Futtermitteln sowohl Nager- als auch Vogelfäces gefunden werden konnten. Daraus ergibt sich eine potenzielle Infektion des Tierbestandes,

da auch im Jahre 2003 in Wildtieren hauptsächlich *S. Enteritidis* und *S. Typhimurium* nachgewiesen wurde, und Wildtiere ein Reservoir für die beiden genannten Serovare darstellen. (HARTUNG, 2004).

Neben den Futtermitteln stellt auch das Tränkwasser eine Kontaminationquelle für die Nutztiere dar. So konnten nach HARTUNG (2004) in 125 untersuchten Tränkwasserproben 4,00 % *Salmonella* spp. nachgewiesen werden, wovon 1,60 % dem Serovar *S. Typhimurium* zugerechnet werden konnten.

Nutztier

Salmonellen sind in Beständen landwirtschaftlicher Nutztiere weit verbreitet (GAREIS, 1995). Während bei den Säuger-Nutztieren Rind und Schwein der dominierende Serovar *S. Typhimurium* war, konnte bei den Legehennen 2003 mit 0,81 % häufiger *S. Enteritidis* als *S. Typhimurium* (0,23 %) nachgewiesen werden (HARTUNG, 2004). Daraus wird ersichtlich, dass landwirtschaftliche Nutztiere ein Erregerreservoir darstellen, von dem aus sich die Salmonellen verbreiten können.

Von besonderer Bedeutung sind klinisch inapparent verlaufende Salmonellen-Infektionen beim Nutztier. Diese Tiere zeigen keine klinischen Symptome, scheiden jedoch Salmonellen aus und stellen dadurch eine ständige Infektionsquelle für Tier und Mensch dar (BAUER UND HÖRMANSDORFER, 1995).

Die Verbreitung der Salmonellen findet auf vielfältige Weise statt. So scheiden akut und latent infizierte Tiere Salmonellen mit dem Kot sowie Harn aus und übertragen auf diese Weise den Erreger direkt auf gesunde Tiere oder kontaminieren ihre Umwelt, wie z.B. Futter, Wasser, Ställe oder Weiden. So konnten im Jahr 2003 aus Stallungen und Gehegen in 5,15 % der 2600 untersuchten Proben Salmonellen nachgewiesen werden. In 0,23 % der Fälle konnte *S. Typhimurium* und in 0,15 % der Fälle *S. Enteritidis* isoliert werden. Die restlichen 4,77 % gehörten anderen *Salmonella*-Serovaren an (HARTUNG, 2004). Weitere Kontaminationsquellen stellen Schadnager, Siedlungswässer und importierte Futtermittel dar (BAUER UND HÖRMANSDORFER, 1995). Auch 2003 dominierte bei *S. Typhimurium* der Phagentyp DT 104, wobei die Nutztiere Rind (57 %) sowie Schwein (56 %) und in geringerem Maße das Geflügel (36 %) die Hauptherkunftsquellen darstellten. Bei den *S. Enteritidis*-Isolaten gehörten 2003 53 % der Isolate zum Phagentyp PT4, der zu 48 % aus Lebensmitteln (Geflügelfleisch) und 40 % vom Tier (Huhn) stammte (SCHROETER ET AL., 2004).

3 Vorkommen von *Salmonella* spp. während des Schlachtprozesses

Dem aktuellen Bericht zur epidemiologischen Situation der Zoonosen kann entnommen werden, dass Schlachttierkörper mit *Salmonella* spp. kontaminiert sein können. Auch bei Untersuchungen von Fleischsaft-ELISA bei Schweinen während der Schlachtung wurden bei 6,59 % der Schlachtschweine im Jahr 2003 *Salmonella*-Titer festgestellt (HARTUNG, 2004). Die Ergebnisse des Fleischsaft-ELISA zeigen, dass die Tiere bereits vor der Schlachtung mit Salmonellen infiziert sein mussten.

Es gibt vielfältige Möglichkeiten einer Kontamination der Schlachttiere sowie der Schlachtkörper. So kann ein Schlachtkörper primär kontaminiert sein, weil das Tier bereits Salmonellenträger war sowie sekundär durch Kreuzkontamination infiziert werden. Bereits im Vorstadium des Schlachtens kann eine Infektion oder Kontamination der Schlachttiere gegeben sein (GISSEL, 1993). Diesen Sachverhalt belegt auch BERENDS ET AL. (1997), die herausgefunden haben, dass lebende Tiere, die Salmonellen tragen, eine drei- bis viermal höhere Wahrscheinlichkeit haben, als positive Schlachtkörper zu enden als Salmonellen-freie Tiere. Nach diesen Untersuchungen resultieren 70 % aller Schlachtkörperkontaminationen vom Tier selbst, weil es Salmonellenträger war, und nur 30 % durch Kreuzkontamination, weil andere Tiere Träger waren. Bestimmte Bedingungen im Vorfeld des Schlachtens können zur Kontamination des Schlachtkörpers beitragen.

So untersuchten SEIDLER ET AL. (2001) die Konsequenz von Transportstreß für die bakterielle Translokation, endogene Kontamination und die bakterizide Aktivität im Serum von Schlachtschweinen. Dabei wurden in den Untersuchungen verschiedene Streßsituationen, wie z.B. Transportdauer, Temperatur, Luftfeuchtigkeit sowie intensives Treiben berücksichtigt. Es zeigte sich, dass intensive Streßsituationen nicht nur die Translokationsrate von Bakterien durch die Darmwand steigern und dadurch die Gehalte an freien Endotoxin erhöhen, sondern gleichzeitig die Immunabwehr im Serum schwächen. Dies wiederum führte zu einer höheren Kontaminationsrate unterschiedlicher Organe.

Auch von den Warteställen der Schlachthöfe geht eine Kontamination der angelieferten Tiere aus (HURD ET AL., 2001). So besitzen Tiere von Salmonellen-freien Herden ein Risiko mit Salmonellen kontaminiert zu werden, wenn sie in Kontakt mit Faeces oder anderen Tieren kommen, die Salmonellen tragen (BOES ET AL., 2001). Dies bestätigen auch SWANENBURG ET AL. (2001), indem sie mit ihren Untersuchungen nachweisen konnten, dass Schweine in Warteställen über Aerosole oder Wassertropfen mit *Salmonella*-Serovaren infizierter Tiere kontaminiert wurden, ohne dass ein direkter Kontakt bestanden hätte.

Aber nicht nur das Schlachttier selbst, sondern auch die Schlachthofumgebung birgt ein Risiko der Keimübertragung. VON ALTROCK ET AL. (1999) konnten in ihren Untersuchungen zeigen, dass der Salmonellennachweis in der Schlachtumgebung am häufigsten von Tupferproben, die von den Abflüssen genommen wurden, gelang. Im Vergleich zum Produktionsabschnitt „Eviszeration“ (22,2 %) kamen auf dem Abfluß im Bereich der Kühlung (8,3 %) weniger Salmonellen vor. Da bei der Eviszeration, insbesondere bei nicht abgebundenem Darm, Intestinalinhalt nach außen tritt, können in diesem Bereich am Abfluß mehr Salmonellen nachgewiesen werden. Während der Zwischensäuberung mit Hochdruckreinigern legen sich keimhaltige Aerosole und Wasserspritzer auf den Schlachtkörper nieder (GISSEL, 1993).

Auch vom Schlachtprozeß selbst geht ein Kontaminationsrisiko aus (BOES ET AL., 2001). So stellten BERENDS ET AL. (1997) fest, dass 5-15 % der Schlachtkörperkontamination auf die Entborstung zurückzuführen ist und 55-90 % der Kontamination auf die Eviszerationspraxis zurückgehen. Auch HALD ET AL. (2003) wiesen nach, dass die Bereiche Entborstung und Eviszeration signifikant zur Kontamination des Schlachtkörpers beitragen. Die Varianz der Serovare an den verschiedenen Untersuchungstagen unterstützt die Annahme von VON ALTROCK ET AL. (1999), dass der Eintrag von Salmonellen in den Schlachthof vom Tier ausgeht und ein sogenannter „Hauskeim“ ausgeschlossen werden kann.

Auch die Betriebsgröße scheint einen Einfluß auf die Kontamination der Schlachtkörper zu haben. WICHMANN-SCHAUER ET AL. (2000) verglichen den Kontaminationsgrad von Masthähnchen aus selbstschlachtenden Kleinbetrieben und großen Geflügelmast- und -schlachtenanlagen. Bei 14,5 % der untersuchten Herden aus Kleinbetrieben und 28,1 % der Herden aus großen Geflügelmastbetrieben wurden Salmonellen aus Gazekotproben isoliert. Bei der Untersuchung von Halshautproben waren lediglich 9,7 % der Herden aus Kleinbetrieben sowie 74,3 % der Herden aus großen Geflügelschlachtbetrieben *Salmonella*-positiv. Diese hohe Anzahl deutet weiterhin darauf hin, dass ein großer Anteil der in diesen Betrieben geschlachteten Herden mit Salmonellen kontaminiert war, auch wenn in deren Gazekotproben keine Salmonellen gefunden wurden.

4 Vorkommen *Salmonella* spp. im Lebensmittel Fleisch

Die Kontamination von Fleisch und Fleischprodukten erfolgt bereits während der Erzeugung, am Schlachthof sowie der weiterverarbeitenden Industrie oder durch mangelnde Küchenhygiene (GISSEL, 1993).

Die im Verkehr befindlichen Lebensmittel werden regelmäßig über von Lebensmittelkontrolleuren gezogene Planproben auf Salmonellen nach der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §35 des Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetzes (LMBG, L-00.00.20) oder vergleichbaren Methoden untersucht (HARTUNG, 2004). Ein Teil der Untersuchungsergebnisse für das Jahr 2003 fasst Tabelle 3 zusammen.

Tabelle 3: Vorkommen von *Salmonella* spp. in Fleisch (Auszug aus HARTUNG, 2004).

Fleischart	untersuchte Proben n	<i>Salmonella</i> -positiv [%]	<i>S. Typhimurium</i> [%]	<i>S. Entertidis</i> [%]	sonstige <i>Salmonella</i> -Serovare [%]
Rind	494	1,01	1,01	n.n.	n.n.
Schwein	1734	3,00	1,73	0,06	1,21
Rohfleisch, zerkleinert (HFIV)	2868	3,59	1,78	n.n.	1,60
Geflügel	2132	16,46	3,56	4,22	5,35

n.n.: nicht nachweisbar

Mit Ausnahme von Geflügel wurden im Jahr 2003 aus Fleisch vor allem *S. Typhimurium* isoliert (HARTUNG, 2004).

Es werden nicht nur im Verkehr befindliche Lebensmittelproben (Planproben) gezogen, sondern auch amtliche Hygieneproben untersucht. In Abhängigkeit von der Betriebshygiene können sich bei der Herstellung von Lebensmitteln durch die Lagerung bzw. während der weiteren Verarbeitung bis zur Fertigstellung höhere Keimbelastungen entwickeln. Ein Teil der Vor- und Zwischenprodukte wird während der Verarbeitung Prozessen unterzogen (z.B. Hitze), wodurch auch eine Verminderung der Keimzahlen erreicht werden kann. Dennoch wurden auch in hitzebehandelten Lebensmitteln im Jahr 2003 bei 0,1 % der untersuchten Proben Salmonellen nachgewiesen. Bei anders stabilisierten Fleischerzeugnissen konnten sogar in 1,44 % der untersuchten Proben Salmonellen detektiert werden (HARTUNG, 2004). Das Risiko einer Kontamination vergrößert sich mit der steigenden Zahl von Produktions- und Bearbeitungsschritten (GAREIS, 1995).

Der Mensch stellt das schwächste Glied der Hygienekette dar. Im Lebensmittel kommt es oft durch ungenügende Kühlung, eine inkonsequente Trennung von reinem und unreinem Bereich oder mangelnder Personalhygiene zur Keimkontamination bzw. -vermehrung (GISSEL, 1993). Um eine Unterbrechung der Infektkette zu erreichen, müssen die Bedingungen im Lebensmittel von den Ansprüchen der Salmonellen an optimales Wachstum abweichen. So tötet eine 5-minütige Erhitzung bei 74 °C Salmonellen ab. Eine Keimreduktion bzw. Wachstumshemmung kann durch Temperaturen um -2 bis -5 °C, einem pH-Wert von 4,5 und einem a_w -Wert unter 0,93 erreicht werden. Durch die Anwendung von Kälte fällt die Keimabnahme bei niedrigeren Temperaturen (-20 °C) weniger deutlich aus als bei Temperaturen um den Gefrierpunkt (VARNAM UND EVANS, 1991). Verpackung mit CO₂-Atmosphäre hat nur einen bakteriostatischen Effekt und hemmt damit zwar das Wachstum, übt aber keinen Effekt auf das Überleben der Keime aus (D'AOUST, 1991b).

5 *Salmonella* spp. als Zoonoseerreger des Menschen

Eine Salmonellen-Infektion des Menschen kann ausgelöst werden durch typhoide und nicht-typhoide Salmonellen der Spezies und Subspezies *enterica*. Zu den typhoiden Salmonellen zählen *S. Typhi* und *S. Paratyphi*. Diese Art der Salmonellose ist charakterisiert durch eine systemische Ausbreitung und Invasion von extraintestinalem Gewebe (D'AOUST, 1991a). Eine Infektion des Menschen mit nicht-typhoiden Salmonellen wird ausgelöst durch Enteritidis-Salmonellen. Dies sind Salmonellen der Spezies und Subspezies *enterica* mit der Ausnahme der Serovare *Typhi* und *Paratyphi*. Die Enteritidis-Salmonellen zählen zu den Zoonoseerregern, das heißt sie werden vom Tier auf den Menschen übertragen (ROLLE UND MAYR, 2002). Den Status als Zoonoseerreger unterstreichen Untersuchungen aus dem Jahr 2003, wonach bei den Herkunftsarten Tier und Lebensmittel die Serovare *S. Typhimurium* und *S. Enteritidis* dominierten (SCHROETER ET AL., 2004).

Das Reservoir dieses Zoonoseerregers sind u.a. Haus- und Wildtiere, besonders Geflügel, Schweine und Rinder. Eine direkte Übertragung von Mensch zu Mensch spielen bei den Enteritis-Salmonellen nur eine sehr untergeordnete Rolle und sind vor allem im Kleinkindesalter von Bedeutung (MEHNERT ET AL., 2001). Als besonders gefährdet gelten Fleisch, Fleischprodukte, Ei und Eiprodukte (RABSCH ET AL., 2001). Als Ursache für eine Infektion des Menschen gilt das Vorkommen von Salmonellen bei Nutztieren und die Kontamination von Lebensmitteln tierischen Ursprungs (D'AOUST, 1989).

Im allgemeinen beschränkt sich eine nicht-typhoide Salmonellose auf den Intestinaltrakt, in welchem sie Entzündungsreaktionen hervorrufen kann. Diese Form der Salmonellose stellt eine selbst-limitierende Enterocolitis dar (D'AOUST, 1991a). Eine systemische Infektion ist bei

wirtsadaptierten Serovaren die Regel, kann aber bei nicht-typhoiden Salmonellen nicht gänzlich ausgeschlossen werden (VARNAM UND EVANS, 1991).

Beim Krankheitsbild steht Durchfall im Vordergrund. Daneben sind Bauchschmerzen, Übelkeit, Erbrechen und Fieber möglich. Die Symptome dauern in der Regel nur wenige Stunden oder Tage an. Infektionen mit Salmonellen häufen sich typischerweise in den wärmeren Monaten des Jahres (Spätsommer/Herbst). Auch im Jahr 2003 war die Salmonellose die am häufigsten an das Robert-Koch-Institut übermittelte Krankheit (ALPERS UND JANSEN, 2004).

Das die Salmonellose beim Menschen dominierende Serovar ist *S. Enteritidis* (67 % der Fälle), gefolgt von *S. Typhimurium* mit 19 % der Fälle (HARTUNG, 2004).

Die nicht-typhoide Salmonellose wird bisweilen durch seltene Serovare ausgelöst (ALPERS UND JANSEN, 2004). Im Jahr 2003 war eine mit *S. Agona* assoziierte bundesweite Häufung von Erkrankungen von Säuglingen und Kleinkindern auffällig. Als Ursache dieses Ausbruchs konnte durch eine Fall-Kontroll-Studie sowie durch mikrobiologischen Nachweis eine Kontamination von Kräutertee bzw. Teezusätzen (Anis) durch *S. Agona* ermittelt werden (ANONYMUS, 2003a). Eine ungewöhnliche Zunahme der Inzidenz eines ansonsten seltenen Salmonellen-Serovars zeigte sich hinsichtlich von Infektionen mit *S. Anatum*, wobei der Grund dafür unklar blieb (ANONYMUS, 2004). Seit Ende des Jahres 2004 wird ein gegenüber den Vorjahren verstärktes Auftreten von Durchfallerkrankungen durch den seltenen Serovar *S. Bovismorbificans* beobachtet. Dabei stehen Produkte aus rohem Schweinefleisch als Vehikel unter Verdacht. Dies muß jedoch in weiteren Untersuchungen geklärt werden (ANONYMUS, 2005b).

6 Nachweisverfahren

6.1 Kulturelles Referenzverfahren nach § 35 LMBG

Für den Nachweis von Salmonellen wurden standardisierte Verfahren entwickelt, mit denen neue alternative Methoden verglichen werden müssen. Diese standardisierten Verfahren zum Nachweis von *Salmonella* spp. aus Lebensmitteln findet man z.B. in der Amtlichen Sammlung für Untersuchungsverfahren des §35 LMBG oder der International Organization for Standardization (ISO 6579). Standardverfahren sind traditionell kulturelle Verfahren, die aus den vier Stufen nicht selektive Voranreicherung, selektive Anreicherung, Isolation bzw. Identifizierung und Bestätigung bestehen (BLACKBURN, 1993; VAN DER ZEH, 1994).

Die Voranreicherung findet in der Regel in nicht selektivem Medium statt (D'AOUST ET AL., 1992b). Salmonellen sind im Lebensmittelherstellungsprozeß bzw. durch intrinsische Faktoren des Lebensmittels subletal geschädigt (BAYLIS ET AL., 2000a). Deshalb wird ein Voranrei-

cherungsschritt notwendig, um die Resuszipation von gestressten Zellen sowie das Wachstum von ungestressten Keimen vor der Selektivanreicherung zu ermöglichen. Weitere Aufgaben des Voranreicherungsmediums liegen in der Abpufferung von pH-Veränderungen durch Wachstum und Metabolismus von Mikroorganismen während der Anreicherung (BAYLIS ET AL., 2000a).

Gepuffertes Peptonwasser ist das gebräuchlichste Voranreicherungsmedium. Manche Lebensmittel benötigen jedoch spezifische Medien oder Zusätze. Dies wird in den jeweiligen Standardverfahren angegeben (ANONYMUS, 1998; DE BOER, 1998).

Die unterschiedliche Zusammensetzung der nutritiven Komponenten der Voranreicherungsmedien hat weniger Einfluß auf die Wiedergewinnung der Salmonellen (VAN SCHOTHORST UND VAN LEUDSEN, 1975; D'AOUST UND MAISHMENT, 1979; D'AOUST, 1981). Bedeutenderen Einfluß auf die Methodensensitivität haben die Inkubationszeit sowie die Bebrütung des Voranreicherungsmediums bei erhöhten Temperaturen (41-43 °C) (MULINDWA UND PIETSCH, 1979; WILSON ET AL., 1980; D'AOUST, 1981; ANDREWS, 1986). So wurden Untersuchungen zur Verkürzung der Voranreicherungszeit durchgeführt (D'AOUST ET AL., 1990a), wobei sich jedoch herausstellte, dass für eine befriedigende Resuszipation eine Voranreicherung von 16-20 h erforderlich ist (D'AOUST ET AL., 1992b).

Der nicht selektiven Voranreicherung folgt ein selektiver Anreicherungsschritt. Für die erfolgreiche Wiederherstellung von Salmonellen im Lebensmittel ist es wichtig, die Anreicherungsbedingungen so zu wählen, dass das Verhältnis von Nicht-Salmonellen zu Salmonellen, das sich während der nicht selektiven Voranreicherung etabliert hat, reduziert wird. In der Regel werden bei Standardverfahren zwei Selektivmedien verwendet (D'AOUST ET AL., 1992b). Die Selektivität von Anreicherungsmedien bei erhöhten Temperaturen (42-43 °C) ist größer als bei niedrigeren Temperaturen (35-37 °C) (DE BOER, 1998). Eine Verlängerung der Voranreicherung (48 h) führt in der Regel nicht zu einer substantiellen Erhöhung der Wiederfindung von Salmonellen (D'AOUST ET AL., 1992a).

In der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §35 LMBG sind die Rappaport-Vassiliadis-Bouillon sowie die Selenit-Cystin-Bouillon vorgeschrieben. Andere standardisierte Verfahren schreiben die Verwendung von Tetrathionat-Bouillon nach Müller-Kauffman vor (ANONYMUS, 2003b).

Die Rapapport-Vassiliadis-(RV)-Bouillon wurde ursprünglich von RAPPAPORT ET AL. (1956) entwickelt und von VASSILIADIS ET AL. (1976) modifiziert. Die selektive Wirkung des Mediums beruht auf seiner hohen Osmolarität ($MgCl_2$), dem niedrigen pH-Wert sowie der Anwesenheit von Malachitgrün, an welches sich Salmonellen besser adaptieren können als die kompetitive Begleitflora (RAPPAPORT ET AL., 1956). Auch die Inkubation bei 43 °C statt 37 °C wirkt sich hemmend auf die Begleitflora aus (OBOEGBULEM, 1993)

Die bessere Leistungsfähigkeit des RV-Mediums im Vergleich zu anderen Selektivmedium ist in zahlreichen Studien belegt worden (ALLEN ET AL., 1991; MAIJALA ET AL., 1992; JUNE ET AL., 1996). Selbst geringe Mengen an *S. Enteritidis* konnten in Anwesenheit einer großen Zahl an kompetitiver Begleitflora mittels RV-Medium nachgewiesen werden (FRIES UND STEINHOF, 1997). Signifikante Unterschiede in der Leistungsfähigkeit kommerzieller RV-Medien liegen in der $MgCl_2$ -Konzentration und der Peptonart begründet. Um eine optimale Leistungsfähigkeit des Medium zu erzielen, wird eine standardisierte $MgCl_2$ -Konzentration, sowie die Verwendung von Sojapepton anstelle von Trypton empfohlen (VAN SCHOTHORST UND RENAUD, 1983; MAIJALA ET AL., 1992).

Das zweite vorgeschriebene Selektivmedium ist die Selenit-Cystin-(SC)-Bouillon. Das dem Medium zugesetzte Cystin fördert das Wachstum der Salmonellen, während das Selenit die Begleitflora hemmt (NORTH UND BARTRAM 1953; VARNAM UND EVANS, 1991). Die Hemmwirkung des Selenits in Bezug auf das Wachstum coliformer Bakterien und Enterokokken ist in den ersten 6 bis 12 h nach Beginn der Bebrütung am effektivsten. Danach nimmt sie langsam ab. *Salmonella* spp., *Proteus* spp. und *Pseudomonas* spp. werden dagegen kaum gehemmt (ANONYMUS, 1996). So resultiert der zusätzliche Gebrauch des SC-Mediums oft nicht in mehr positiven Ergebnissen (O'DONOGHUE UND WINN, 1993). Aufgrund der hohen toxischen Wirkung des Selenits wird der Gebrauch des Mediums kritisiert (DE BOER, 1998). Deshalb versucht man, dieses durch weniger toxische Medien zu ersetzen. Häufig wird dann auf Tetrathionat-(TT)-Bouillon nach Müller-Kauffmann zurückgegriffen. KAUFFMANN (1930; 1935) entwickelte das Nährmedium durch Kombination der Tetrathionat-Bouillon nach MÜLLER (1923) mit Brilliantgrün-Galle-Bouillon. Die selektiven Komponenten stellen das Tetrathionat dar, das Coliforme und andere Darmbakterien im Wachstum unterdrückt. *Salmonella* spp., aber auch *Proteus* spp., reduzieren Tetrathionat und werden dadurch nicht gehemmt. Galle wirkt auf Salmonellen wachstumsfördernd, hemmt jedoch die Begleitkeime. Brilliantgrün unterdrückt vor allem Gram-positive Keimarten (ANONYMUS, 1996). Durch die Zugabe von Novobiocin kann nach JEFFRIES (1959) *Proteus* spp. unterdrückt werden.

In zahlreichen Studien wurde die Leistungsfähigkeit der verschiedenen Selektivmedien miteinander verglichen. In diesen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass bei der Isolation von Salmonellen aus Faeces oder natürlich kontaminierten Fleischprodukten oder Abwasserproben das RV-Medium eine höhere Zahl an positiven Ergebnissen erzielte als SC-Medium oder TT-Bouillon nach Müller-Kauffmann (VASSILIADIS ET AL., 1979; VASSILIADIS, 1983; HARVEY UND PRICE, 1981; VAN SCHOTHORST UND RENAUD, 1983). OBOEGBULEM (1993) stellte nach der Untersuchung von 477 Hähnchenproben eine Sensitivität von 96 % für das RV-Medium und von 29 % für das SC-Medium fest und unterstreicht damit das Ergebnis der vorangegangenen Studien.

Wichtig für die Isolation (Identifizierung) ist es, die Salmonellen-Kolonien inmitten von Kolonien der Begleitflora, z.B. *Proteus* spp., *Citrobacter* spp. oder *E. coli*. zu erkennen (DE BOER, 1998). Zu diesem Zweck verwendet man feste Selektivnährböden, die verdächtige Kolonien erkennbar machen. (VAN DER ZEH, 1994). Für die Identifizierung von *Salmonella* spp. bedient man sich charakteristischer StoffwechsellLeistungen. Im Referenzverfahren nach §35 LMBG ist der Brilliantgrün-Phenolrot-Laktose-Saccharose-Agar (BPLS-Agar) vorgeschrieben. Zusätzlich ist ein Medium freier Wahl verpflichtend.

Konventionelle Medien zur Isolation von Salmonellen haben meist eine geringe Spezifität, so dass sie eine hohe Falsch-Positiv-Rate generieren (v.a. durch *Citrobacter* spp. und *Proteus* spp.). Daraus ergibt sich für die Isolation von *Salmonella* spp. ein hoher Arbeitsaufwand. Deshalb wurden in den letzten Jahren neue chromogene und fluorogene Medien entwickelt, die die Salmonellendiagnostik einfacher und schneller machen (MANAFI, 2000). Die Schlüsselreaktionen des vorgeschriebenen BPLS-Agars und eine Auswahl neuerer Medien sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

Tabelle 4: Feste Selektivmedien zur Isolation von *Salmonella* spp. (nach VARNAM UND EVANS, 1991; DE BOER, 1998; MANAFI, 2000; SCHÖNENBRÜCHER ET AL., 2004).

Bezeichnung	Selektive bzw. diagnostische Charakteristik	Salmonellentypische Reaktion	Referenz
herkömmliche Nährmedien			
BS	Reduktion von Sulfit zu Sulfid	schwarz	WILSON UND BLAIR, 1927
BPLS	Fermentation von Laktose und Saccharose	rot	EDEL UND KAMPELMACHER, 1969
XLT4	Fermentation von Laktose, Xylose und Saccharose; Decarboxylierung von Lysin (Alkalisierung durch Cadaverin); H ₂ S-Produktion	rot mit schwarzem Zentrum	MÜLLER UND TATE, 1991

Fortsetzung Tabelle 4: Feste Selektivmedien zur Isolation von *Salmonella* spp. (nach VARNAM UND EVANS, 1991; DE BOER, 1998; MANAFI, 2000; SCHÖNENBRÜCHER ET AL., 2004).

Bezeichnung	Selektive bzw. diagnostische Charakteristik	Salmonellen-typische Reaktion	Referenz
chromogene Nährmedien			
Rambach	Säurebildung aus Propylenglycol; chromogener Nachweis der Abwesenheit von β -Galaktosidase	rot	RAMBACH, 1990
CSE	Fermentation von Laktose; Chromogen (Ester aus C ₈ -Fettsäure und phenolischer Chromophore)	rot	COOK ET AL., 1999
MM	H ₂ S-Produktion; chromogener Nachweis der Abwesenheit der β -Galaktosidase	schwarz	MILLER UND MALLISON, 2000

BS: Bismuth-Sulfit-Agar; BPLS: Brilliantgrün-Phenolrot-Laktose-Saccharose-Agar; XLT4: Xylose-Lysin-Tergitol 4; CSE: Chromogener-Salmonellen-Esterase-Agar; MM: Miller-Mallison-Agar

Man nimmt an, dass ca. 1 % der *Salmonella* Subspezies I Laktose-positiv ist (DEVENISH ET AL., 1986). Infektionen des Menschen durch diese Stämme wurden beschrieben (POISSON, ET AL., 1988; RUIZ ET AL., 1995). Um diese Laktose-positiven Salmonellen zu detektieren, sollte auf ein Laktose-unabhängiges Medium zurückgegriffen werden (FAGERBERG UND AVENS, 1976; D'AOUST ET AL., 1992b; RUIZ ET AL., 1996).

Salmonellen-verdächtige Kolonien werden im vierten Schritt der serologischen und biochemischen Bestätigung zugeführt. Zur serologischen Bestätigung und endgültigen Identifizierung verwendet man polyvalente Seren (D'AOUST ET AL., 1992b). Für die biochemische Bestätigung werden konventionelle Röhrchenmedien oder kommerzielle Diagnostik-Kits (COX ET AL., 1984) verwendet.

6.2 Möglichkeiten zur Reduktion der Versuchsdauer

Konventionelle kulturelle Verfahren sind arbeits- und zeitintensiv. Es vergehen 4 bis 5 Tage bis zur präsumptiven Diagnostik (D'AOUST, 1984; VERMUNT ET AL., 1992). Es herrscht ein Bedarf an Salmonellennachweismethoden, die schneller sind, mit einer ähnlichen oder größeren Sensitivität als die konventionellen Methoden. Die Schnellverfahren müssen robust

und reliabel sein und eine hohe Spezifität besitzen, um falsch-positive Ergebnisse zu minimieren und Kosten zu sparen (BLACKBURN, 1993).

So haben sich mehrere Schnellmethoden entwickelt, die die Versuchszeit reduzieren. Dies schließt mit ein die Enzym-Immunoassay-Technik (ECKNER ET AL., 1987; BECKERS ET AL., 1988; LEE ET AL., 1990; BAILEY ET AL., 1991; JUNE ET AL., 1992), die Impezanzmessung (EASTER, 1985; DONAGHY UND MADDEN, 1993; JOOSTEN ET AL., 1994; BLIVET ET AL., 1998), „Motility enrichment“ Technik (DE SMEDT ET AL., 1986), Immunodiffusion (D'AOUST UND SEWELL, 1988b; FLOWERS UND KLATT, 1989) sowie DNA-Hybridisierungstechniken (FITTS ET AL., 1983; FLOWERS ET AL., 1987; HILL UND KEASLER, 1991; WOLLCOTT, 1991).

Die in den vergangenen Jahren in besonderer Weise weiterentwickelten Möglichkeiten der Reduktion der Versuchszeit werden nachfolgend dargestellt.

6.2.1 Reduktion der Voranreicherungszeit durch Wachstumsstimulantien

In der Vergangenheit wurden bereits Versuche unternommen, um die Wachstumshemmung der Eisenlimitierung im Lebensmittel aufzuheben (GARIBALDI, 1960; CLAY UND BOARD, 1991). Eingesetzt wurden Eisensulfat bzw. Eisenammonium-Citrat beim Nachweis von *Salmonella* spp. aus Hühnerei, um den bakteriostatischen Effekt des Ovotransferrins im Eiweiß auszugleichen (CUDJOE ET AL., 1994a). Der Nachteil in der Verwendung von Eisensalzen liegt in ihrer Unselektivität begründet, weil sie auch das Wachstum der Konkurrenzflora begünstigen. (REISSBRODT ET AL., 1996). Außerdem wirken die Hydroxylradikal- oder Superoxidationen dieser Salze hemmend auf geschädigte Zellen (REISSBRODT, persönliche Mitteilung).

Ferrioxamin E

Eisen ist für die meisten Organismen essentiell. Es fungiert als Katalysator bei Elektronentransportprozessen, beim Transport von Sauerstoff sowie als Enzymkomponente (z.B. Ribonukleotid-Reduktase), die für die Biosynthese von Makromolekülen (z.B. DNA) benötigt werden (KINGSLEY ET AL., 1994; RABSCH ET AL., 1999). Unter aeroben Bedingungen und einem neutralen bis alkalischen pH-Wert liegt Eisen in schwer löslicher Form vor oder ist extrazellulär an Transferrin und Laktoferrin sowie intrazellulär an Hämosiderin und Ferritin gebunden (KINGSLEY ET AL., 1995; FINLAY UND FALKOW, 1997). Somit liegt Eisen für Mikroorganismen als limitierter Faktor vor. Deshalb bilden Salmonellen und andere pathogene Bakterien Siderophore, um ihren Eisenbedarf zu decken. Durch spezifische Aufnahme- und Verwertungsmechanismen können sie dreiwertiges Eisen in die Zelle aufnehmen und ihrem Stoffwechsel

zugänglich machen. Die intrazelluläre Eisenkonzentration steuert die Expression des Aufnahmesystems, das neben anderen Komponenten aus eisenregulierten Außenmembranproteinen (IROMPs), dem TonB-Protein zwischen äußerer und zytoplasmatischer Membran sowie Eisen spaltenden Enzymen besteht. Die Gene, die diese Proteine kodieren, sind durch das Fur-(ferric iron uptake regulation) Protein reguliert (KINGSLEY ET AL., 1994). Das Phenolatsiderophor Enterobactin bilden ca. 99 % der Salmonellen-Isolaten. Einige *Salmonella*-Stämme exprimieren das plasmidkodierte Hydroxamatsiderophor Aerobactin (KINGSLEY ET AL., 1994). Im Gegensatz zu *E. coli* und der *Proteus-Providencia-Morganella*-Gruppe besitzen Salmonellen (nur die Subspezies I, II und IIIb) durch das *foxA*-Gen die Fähigkeit, das Fremdsiderophor Ferrioxamin E zu nutzen (KINGSLEY ET AL., 1994; KINGSLEY ET AL., 1999). Etwa 99 % der klinisch relevanten Isolate gehören diesen Subspezies an (KINGSLEY ET AL., 1999). In Bezug auf die genannten Bakterien wirkt Ferrioxamin E als selektiver Wachstumsfaktor, der die lag-Phase auch geschwächter Salmonellen reduziert, dadurch die Sensitivität vor allem geringer Zahlen an Salmonellen erhöht und somit eine schnelle Isolation zulässt (REISSBRODT UND RABSCH, 1993; REISSBRODT, 1995; REISSBRODT ET AL., 1996).

Die Zugabe von Ferrioxamin E zum Voranreicherungsmedium (gepuffertes Peptonwasser) erhöht die Sensitivität und ermöglicht das Wachstum von weniger als 10 Zellen *S. Typhimurium* in 10 ml Albumin auf 2×10^3 Zellen/ml bereits nach 6 h Inkubation aus Hühnereiweiß. Auch die Supplementierung von Selektivmedien, wie z.B. SC, TT, RVS oder MSRV mit Ferrioxamin E führten innerhalb von 6 h zu einer nachweisbaren Zahl an Salmonellen. Jedoch sind Schüttelkulturen Standkulturen vorzuziehen (PLESS UND REISSBRODT, 1995; REISSBRODT ET AL., 1996).

Bei dem Einsatz von Ferrioxamin E sollte bedacht werden, dass *Citrobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Pseudomonas* spp., *Enterobacter* spp. und *Yersinia enterocolitica* ebenfalls Ferrioxamin E als Eisenquelle nutzen können. Deshalb sollte man einen zusätzlichen selektiven Schritt, durch Kultivierung oder neuere Schnellmethoden, in Betracht ziehen, um diese Konkurrenzflora zu unterdrücken (REISSBRODT, 1995).

Bereits KINGSLEY ET AL. (1994) stellten fest, dass der Einsatz von selektiven Siderophorwachstumssupplementen in Kombination mit Konzentrationsmethoden (IMS) einen entscheidenden Fortschritt in der Salmonellen-Diagnostik ermöglichen würde. Weitere Studien sind allerdings notwendig, um die Effektivität der Ferrioxamin E Supplementierung in Verbindung mit Schnellmethoden zu bestätigen (PLESS UND REISSBRODT, 1995).

Autoinducer

Bakterien sind einer Vielzahl von sich ändernden Umweltbedingungen ausgesetzt, an die sie sich anpassen müssen, wenn sie überleben möchten. Da Bakterien auch nicht allein vor-

kommen, sondern in Gemeinschaften leben (WHITEHEAD ET AL., 2001), kommunizieren sie miteinander über chemische Signalmoleküle, sogenannten „Autoinducern“ (SCHAUDER UND BASSLER, 2001).

Die Detektion von „Autoinducern“ erlaubt Bakterien zwischen niedriger und hoher Zellpopulationsdichte zu unterscheiden und in Abhängigkeit dieser die Genexpression einer ganzen Bakteriengemeinschaft koordinativ zu kontrollieren. Dieser Prozeß der interzellulären Kommunikation wird „quorum sensing“ genannt. Viele bakterielle Verhaltensweisen werden durch „quorum sensing“ reguliert, einschließlich Symbiose, Virulenz, Antibiotika-Produktion und die Bildung von Biofilmen (SCHAUDER UND BASSLER, 2001).

Gegenwärtige Studien zeigen, dass hoch spezifische genauso wie universelle „quorum sensing“ Sprachen existieren, die es Bakterien ermöglichen, innerhalb und zwischen den Spezies zu kommunizieren (SCHAUDER UND BASSLER, 2001). Es werden zwei Hauptkategorien von Signalmolekülen unterschieden. Gram-negative Bakterien verwenden vor allem N-Acyl Derivate der Homoserin-Laktone, während sich Gram-positive Bakterien hauptsächlich über Aminosäuren bzw. Peptide miteinander „unterhalten“ (WHITEHEAD ET AL., 2001).

Die Regulierung von physiologischen Prozessen, die durch N-Acyl Homoserin-Lactone kontrolliert werden, vollzieht sich in einer Zelldichte- und Wachstumsphasen abhängigen Weise. Deshalb wurde die Bezeichnung „quorum sensing“ geprägt, um diese Fähigkeit von Bakterien zu bezeichnen, die Zelldichte vor der Expression eines Phänotyps zu kontrollieren (WHITEHEAD ET AL., 2001). Aber nicht nur die Zelldichte, sondern auch Umweltbedingungen, wie die Lebensmittelart, Inkubations- oder atmosphärische Bedingungen haben einen Einfluß auf die Bildung von Autoinducern (CLOAK ET AL., 2002).

Auch die Kultivierung von Gram-negativen Bakterien mit physiologisch relevanten Konzentrationen von Noradrenalin hat gezeigt, dass ein Anstieg des bakteriellen Wachstums resultiert, der nicht nutritiv-vermittelt war (LYTE UND ERNST, 1992; LYTE UND ERNST, 1993). RAHMAN ET AL. (2000) zeigten in ihren Untersuchungen, dass *S. Typhimurium* in Anwesenheit von Noradrenalin in Serum basiertem Medium ein 10-fach stärkeres Wachstum in Vergleich zur Kontrolle aufwies. Im Falle vieler Gram-negativer Bakterien ist ein solches Wachstum durch die Bildung eines Autoinducers begleitet, der selbst bakterielles Wachstum unter Streßbedingungen in Abwesenheit von Noradrenalin stimulieren kann (LYTE ET AL., 1996; FREESTONE ET AL., 2000).

LYTE ET AL. (1996) konnten in ihren Untersuchungen eine Noradrenalin-vermittelte Produktion eines „Autoinducers of Growth“ nachweisen, der von *E. coli* O157:H7 gebildet wurde. Die Charakterisierung dieses Autoinducers, der von mehreren Enterobakterienspezies gebildet wird, deutet auf eine Familie von strukturell nah verwandten, aber funktionell identischen Molekülen hin (FREESTONE ET AL., 2000). Zusammengefasst werden diese Substanzen unter dem Namen „enterobacterial Autoinducer of Growth“ (REISSBRODT ET AL., 2002). Die Struktur

des gefundenen „enterobacterial Autoinducer of Growth“ (AI) weicht von den bisher charakterisierten Autoinducern ab. Während die Homoserin-Laktone optimal in der stationären Phase des Wachstums produziert werden (SWIFT ET AL., 1994), wird der AI in der exponentiellen Wachstumsphase bzw. frühen logarithmischen Phase gebildet (LYTE ET AL., 1996; FREESTONE ET AL., 1999). Ebenso wie die Produktion von Homoserin-Laktonen vor allem in nährstoffreichen Medien erfolgt, wird der AI hauptsächlich in nährstoffarmen Medien gebildet (SWIFT ET AL., 1994).

AI ist fähig, schwer gestresste Populationen von *S. Typhimurium* und *E. coli* O157:H7 sowie von anderen pathogenen Mikroorganismen wiederzubeleben. Im Vergleich zu Ferrioxamin E und Oxyrase war AI effektiver, das Wachstum zu stimulieren. Er veranlasst bakterielles Wachstum auch in nährstoffarmem SAPI-Medium. Der Mechanismus ist noch ungeklärt, scheint aber höchstwahrscheinlich unterschiedlich von dem der Katecholamine zu sein (REISSBRODT ET AL., 2002).

Außerdem besitzt AI eine semiselektive Wirkung, da nicht alle Bakterienspezies mit einer Wachstumsstimulierung reagieren. REISSBRODT ET AL., (2002) belegten die Fähigkeit des AI, dass die Resusztation von gestressten Populationen auf *S. Typhimurium*, *E. coli* O157:H7, *C. freundii* und *E. agglomerans* begrenzt ist. Der AI zeigte keinen messbaren Effekt in der Wachstumsstimulierung von 8 getesteten Gram-negativen (*P. vulgaris*, *P. mirabilis*, *P. rettgeri*, *P. stuartii*, *M. morgani*, *A. hydrophila*, *P. aeruginosa*, *B. cepacia*) und 4 Gram-positiven Spezies (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. faecalis*, *L. monocytogenes*).

Oxyrase

Ein wachstumsfördernder Effekt wird auch dem kommerziell erhältlichen Antioxidans Oxyrase zugeschrieben (STEPHENS ET AL., 2000). Oxyrase besitzt die Fähigkeit, Sauerstoffradikale zu zerstören und anaerobe Bedingungen im Medium zu schaffen. Gestresste Bakterien stellen Energie vor allem aus einem anaeroben Metabolismus bereit, um das Risiko einer endogenen Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies zu vermeiden. Deshalb ist es wichtig, aggressive Sauerstoffradikale in der Voranreicherung zu eliminieren, um eine Resusztation von gestressten Populationen zu erreichen (STEPHENS ET AL., 2000). Oxyrase wurde bereits erfolgreich in der Resusztation von gestressten (Hitzestreß) *Salmonella* spp. angewendet (BAILEY ET AL., 2000; STEPHENS ET AL., 2000). Bei einem Vergleich der Effektivität von Ferrioxamin E, AI und Oxyrase war letztgenannte Substanz ähnlich fähig wie Ferrioxamin E, gestresste *S. Typhimurium* Zellen wiederherzustellen (REISSBRODT ET AL., 2002). Oxyrase zeigte gute Eigenschaften als effektives Wachstumssupplement in der schnellen Resusztation von gestressten Zellen. Im Gegensatz zu Ferrioxamin E ist es aber nicht selektiv bei einer Mischflora aus sowohl pathogenen als auch nicht pathogenen Bakterien. Somit würde sie in

Situationen, in denen die Detektion eines bestimmten Bakteriums erforderlich ist, nicht brauchbar sein (REISSBRODT ET AL., 2002).

6.2.2 Reduktion der Zeitdauer für die selektive Anreicherung

Zur Verkürzung der selektiven Voranreicherung wurden Separations- und Konzentrations-techniken angewendet. Dabei wird die Selektivanreicherungsstufe mit einer nicht wachstumsbezogenen Technik ersetzt. Dies kann erreicht werden durch spezifische Magnetseparation aus dem Voranreicherungsmedium (SAFARIK ET AL., 1995).

Immunomagnetische Separation (IMS) wurde als Methode zur selektiven Anreicherung vorgeschlagen (LUK UND LINDBERG, 1991; SKJERVE UND OLSVIK, 1991). Sie stellt eine Alternative zur kulturellen selektiven Anreicherung von *Salmonella* spp. dar (MANSFIELD UND FORSYTHE, 1993).

In den letzten Jahren hat sich zur Immunomagnetischen Separation der Gebrauch von Dynabeads[®] anti-*Salmonella* zur Konzentrierung und Separierung von *Salmonella* spp. aus Lebensmitteln durchgesetzt. Dynabeads[®] anti-*Salmonella* sind uniforme, aus magnetisierbarem Material (γ -Fe₂O₃ und Fe₃O₄) bestehende und von einer Polymerschale (Polystyrol) überzogene monodisperse Partikel. Sie besitzen superparamagnetische Eigenschaften, d.h. sie zeigen nur dann magnetische Eigenschaften, wenn sie einem Magnetfeld ausgesetzt sind und haben keine Remanenz, wenn sie vom magnetischen Feld entfernt werden. Ein Gemisch aus affinitätsaufgereinigten mono- und polyvalenten Antikörpern gegen *Salmonella* spp. ist kovalent an der Oberfläche der Beads gebunden (HENSIEK, 1994; ANONYMUS, 2005c). Die Antikörper reagieren mit mehr als 1.400 Serovaren. Die untersuchten Teststämme decken 99,4 % aller menschlichen und tierischen Isolate in Europa und den USA über die letzten 10 Jahre ab (HENSIEK, 1994).

Die IMS-Methode mit Dynabeads[®] beruht auf der Kombination zweier Trennprinzipien. Zum einen ermöglichen die Antikörper die spezifische Bindung der Zielzellen und zum anderen kann der Zielorganismus physikalisch aus einer Mischkultur durch ein äußeres Magnetfeld abgetrennt werden. Dadurch wird dieser von anderen Mikroorganismen und/oder inhibierenden Stoffen befreit (HENSIEK, 1994).

Zudem besteht durch IMS die Möglichkeit, subletal geschädigte Keime zu detektieren, die im kulturellen Verfahren nicht wachsen können (MANSFIELD UND FORSYTHE, 1993).

Der Grad der selektiven Anreicherung ist mit dem konventioneller Methoden gleichzusetzen (HENSIEK, 1994). Dynabeads[®] anti-*Salmonella* erhöhen die Sensitivität und Spezifität der Salmonellen-Detektion im Vergleich mit konventionellen kulturellen Methoden (MANSFIELD UND FORSYTHE, 1993; CUDJOE ET AL., 1994a,b; CUDJOE ET AL., 1995; CUDJOE UND KRONA,

1997; COLEMAN ET AL., 1995a,b; MANSFIELD UND FORSYTHE, 1996; MOLLA ET AL., 1996). Zudem separieren die Beads Salmonellen-Zellen aus einer gemischten Suspension ohne Verlust der Lebensfähigkeit. Dadurch bleibt ein vitales Isolat zur weiteren Bestätigung erhalten (FAVRIN ET AL., 2001).

Im Vergleich zur konventionellen Anreicherung wird durch die IMS mindestens ein Untersuchungstag eingespart (MANSFIELD UND FROTHYSE, 1993).

Die Anwendung von IMS zur Separation von lebensmittelrelevanten Keimen fasst Tabelle 5 zusammen.

Tabelle 5: Einsatz der IMS zum Nachweis von lebensmittelrelevanten Keimen.

Keimart	Referenz
<i>Campylobacter</i> spp.	DOCHERTY ET AL., 1996; YU ET AL., 2001
<i>Escherichia coli</i>	LUND ET AL., 1988; WRIGHT ET AL., 1994
<i>Listeria monocytogenes</i>	SKJERVE ET AL., 1990
<i>Salmonella</i> spp.	LUK UND LINDBERG, 1991; SKJERVE UND OLSVIK, 1991; WIDJOJOATMODJO ET AL., 1991; VERMUNT ET AL., 1992; DZIADKOVIEC ET AL., 1995
<i>Staphylococcus aureus</i>	JOHNE UND JARP, 1988

Mit Hilfe von IMS separierte und konzentrierte Keime können unterschiedlichen Detektionsmöglichkeiten zugeführt werden. Eine Übersicht gibt Tabelle 6.

Tabelle 6: Detektionssysteme in Verbindung mit IMS.

Detektionssystem	Referenz
Kulturelle Verfahren	
Kultivierung	CUDJOE ET AL., 1994b; COLEMAN ET AL., 1995a,b; CUDJOE UND KRONA, 1997
MSRV	POPPE ET AL., 1996
Immunologische Verfahren	
ELISA	CUDJOE ET AL., 1991; CUDJOE ET AL., 1995; HOLT ET AL., 1995; MOLLA ET AL., 1996; MANSFIELD UND FORSYTHE, 2000
Nukleinsäureverfahren	
PCR	WIDJOATMODJO ET AL., 1991; FLUIT ET AL., 1993; BÄUMLER ET AL., 1997; EROL ET AL., 1999; RIJPENS ET AL., 1999; JENIKOVA ET AL., 2000; JENIKOVA ET AL., 2001; SPANOVA ET AL., 2001; DE MEDICI ET AL., 2003; MERCANOGLU UND GRIFFITHS, 2005
Sonstige Verfahren	
Mikroskopie	JOHNE ET AL., 1989; VERMUNT ET AL., 1992; MOLLA ET AL., 1994;
Leitfähigkeitsmessung	BIRD ET AL., 1989; PATEL UND BLACKBURN, 1991; PARMAR ET AL., 1992
Biolumineszenz	BLACKBURN ET AL., 1991
Bakteriophage/optische Dichte	FAVRIN ET AL., 2001

Die Separation und Konzentration von *Salmonella* spp. wurde auch durch mit Lektinen beschichteten Partikeln aus Reinkulturen und Ei durchgeführt (PAYNE ET AL., 1992). Da Lektinen die genus- sowie speziesspezifischen Eigenschaften fehlen, können sie nicht die Zielzellen-Anreicherung erreichen, die mit Antikörper-basierten Systemen möglich ist (BLACKBURN, 1993).

6.2.3 Reduktion der Zeitdauer für die Identifizierung und Bestätigung

Vielen Schnellmethoden fehlt es an Spezifität (D'AOUST UND SEWELL, 1988a,b; D'AOUST ET AL., 1990b; ST. CLAIR UND KLENK, 1990), woraus sich auch ihre begrenzte Akzeptanz erklärt. So gewann unter den Schnellmethoden die PCR für den Nachweis von *Salmonella* spp. an Bedeutung. Die PCR verkürzt konventionelle kulturelle Methoden sowohl durch den Ersatz

der konventionellen biochemischen und serologischen Identifizierung als auch ihre direkte Anwendung aus dem Voranreicherungsmedium oder Lebensmittel (RIJPENS UND HERMAN, 2002). Die Spezifität der PCR ist durch die Einzigartigkeit der DNA-Zielsequenz für den nachzuweisenden Keim festgelegt (RAHN ET AL., 1992). Die Hauptunterschiede der für den Nachweis von *Salmonella* spp. entwickelten PCR-Systeme liegen in der Spezifität der ausgewählten Zielsequenzen (BÄUMLER ET AL., 1997). So sind manche Gensequenzen spezifisch für den Nachweis von *S. enterica* und *S. bongori* (RAHN ET AL., 1992), während manche nur spezifisch für *S. enterica* (BÄUMLER ET AL., 1997) oder für bestimmte Serotypen von *S. enterica* Subspezies I (MAHON UND LAX, 1993; REXACH ET AL., 1994; CHEVRIER ET AL., 1995; HASHIMOTO ET AL., 1995; LIN UND TSEN, 1999) kodieren (gekürzt nach BÄUMLER ET AL., 1997). Das Ziel der PCR ist es, die spezifische DNA-Sequenz des gesuchten Mikroorganismus auf eine detektierbare Menge zu vermehren. Sie läuft als ein sich wiederholender Prozeß ab, in welchem je Zyklus drei Reaktionen zu unterschiedlichen Temperaturen ablaufen (WITTE, 2001). Zuerst wird der DNA-Doppelstrang durch eine Temperatur von 95 °C in seine beiden komplementären Einzelstränge getrennt (Denaturierung). Während der Annealingphase wird den für die DNA-Sequenz spezifischen Primern durch die Absenkung der Temperatur auf ca. 52-54 °C ermöglicht, sich an die Einzelstränge, deren Basensequenz ihnen komplementär ist, anzulagern. Im Elongationsschritt vervollständigt die *Taq* Polymerase, beginnend an den Primern, durch die dem Reaktionsgemisch zugegebenen dNTPs die Einzelstränge wieder zu Doppelsträngen. Anschließend kann ein neuer Zyklus beginnen. Durch die exponentielle Vervielfältigung der Zielsequenz erreicht diese Methode neben der Spezifität auch eine hohe Sensitivität und ein Ergebnis liegt in kurzer Zeit vor.

Das Endprodukt oder Amplikon wird in der traditionellen PCR durch Agarose-Gel-Elektrophorese aufgetrennt, durch Ethidiumbromid-Färbung sichtbar gemacht und mittels Sondenhybridisierung bestätigt (RIRIE ET AL., 1997; MCKILLIP UND DRAKE, 2004; PERELLE ET AL., 2004). Die Amplifikation der Zielsequenz und die PCR-Produktanalyse laufen in zwei getrennten Arbeitsgängen ab (DE SILVA ET AL., 1998). Da diese Art der Auswertung zeitaufwendig ist, haben sich real-time PCR-Verfahren entwickelt, bei denen die amplifizierte DNA Fluoreszenz-markiert wird. Durch dieses Fluoreszenz-basierte Verfahren wird die real-time Detektion des Ziel-Templates erlaubt (MCKILLIP UND DRAKE, 2000). Die Menge des erzeugten PCR-Produktes ist proportional zur Intensität des Fluoreszenzsignals (RASMUSSEN, 2001). Die Zunahme des Signals wird von Zyklus zu Zyklus aufgezeichnet und real-time, d.h. noch während die Reaktion abläuft, am Bildschirm (online) sichtbar gemacht. Im Gegensatz zur Endpunktanalyse der traditionellen PCR, in der nur die Plateau-Phase ausgewertet werden kann, erlaubt die real-time PCR die Aufzeichnung der exponentiellen Phase. Diese quantitative Information der PCR kommt nur von ein paar Zyklen, in welchen die DNA-Menge

logarithmisch zunimmt. Oft fallen nur 4-5 Zyklen von 40 Gesamtzyklen in diese „log linear“ Phase der Kurve (RASMUSSEN ET AL., 1998).

Da die Amplifizierung und Fluoreszenzmarkierung bzw. Sondenhybridisierung innerhalb des gleichen Reaktionsgefäßes stattfinden, ist die Amplikon-Visualisierung durch Agarose-Gel-Elektrophorese und Bestätigung durch Southern Blotting unnötig. Dies ermöglicht die Messung großer Probenmengen und reduziert zugleich das Kontaminationsrisiko der Proben durch den Wegfall von post-PCR Analyseschritten (MCKILLIP UND DRAKE, 2000).

Für die Fluoreszenzmarkierung der DNA stehen verschiedene Techniken zur Verfügung. Allgemein unterscheidet man Sequenz-unspezifische von Sequenz-spezifischen Detektionsmöglichkeiten (MCKILLIP UND DRAKE, 2004).

Sequenz-unspezifische Detektion

Dazu zählt der Fluoreszenzfarbstoff SYBR[®] Green, der sequenz-unspezifisch an dsDNA bindet. Im ungebundenen Zustand besitzt SYBR[®] Green eine relativ niedrige Fluoreszenz, die umso heller wird, wenn er an dsDNA gebunden hat. Da die DNA-Menge während der PCR ansteigt, nimmt auch die Fluoreszenzintensität durch den Farbstoff proportional zu. Dadurch ist die Quantifizierung der DNA-Menge möglich (RASMUSSEN ET AL., 1998). Die Bestätigung des amplifizierten Produktes erfolgt durch Schmelzkurvenanalyse im Anschluß an die PCR (RIJPENS UND HERMANN, 2002). In Abhängigkeit der Länge und des Guanin/Cytosin-Gehaltes des Amplikons erfolgt der Schmelzvorgang in einem für dieses charakteristischen Temperaturbereich. Die spezifische Schmelztemperatur wird durch den abrupten Fluoreszenzabfall angezeigt (WITTWER ET AL., 1997; MCKILLIP UND DRAKE, 2004).

Sequenz-spezifische Detektion

Zur Sequenz-spezifischen Detektion der DNA werden fluoreszenzmarkierte Sonden verwendet. Dabei kommt es zum sogenannten Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) zwischen einer spezifischen Fluorophore und einem Quencher oder Donor, wenn die Bindung der Sonde an den spezifischen DNA-Abschnitt der Zielsequenz erfolgt ist. Die FRET-Sonden, die in der real-time PCR benutzt werden, um die DNA-Amplifizierung aufzuzeichnen, werden entweder während der Reaktion hydrolysiert (durch die 5' nach 3' Nuklease-Aktivität der *Taq* Polymerase bei TaqMan[®]-Sonden), in die amplifizierte DNA inkorporiert (Scorpion Primer), unterliegen einer Konformitätsänderung in Anwesenheit der komplementären Ziel-DNA (Molecular Beacon) (DIDENKO, 2001) oder hybridisieren in unmittelbarer Nähe auf dem spezifischen DNA-Abschnitt der zu amplifizierenden Zielsequenz (Hybridisierungssonden) (DE SILVA ET AL., 1998). Das erzeugte Signal ist direkt proportional zur Menge an amplifizierter Ziel-DNA während der exponentiellen Phase des PCR-Zyklus. Sonden beinhalten

ten den Vorteil der Sequenzspezifität, die dsDNA interkalierende Farbstoffe nicht bieten können (MCKILLIP UND DRAKE, 2004). Sequenz-spezifische Sonden bieten somit nicht nur die Möglichkeit der Quantifizierung, sondern ermöglichen in Verbindung mit der Schmelzkurvenanalyse auch die Detektion von Mutationen (DE SLIVA ET AL., 1998).

Die Anwendung von konventioneller PCR (BEJ ET AL., 1994; MAHON ET AL., 1994; AABO ET AL., 1995; JITRAPAKDEE ET AL., 1995; KWANG ET AL., 1996; LIN UND TSEN, 1999; MAKINO ET AL., 1999) sowie real-time PCR (CHEN ET AL., 1997; JENIKOVA ET AL., 2001; DE MEDICI ET AL., 2003; ELLINGSON ET AL., 2004; MALORNY ET AL., 2004; PERELLE ET AL., 2004; WANG ET AL., 2004) zum Nachweis von *Salmonella* spp. aus Lebensmitteln wurde in zahlreichen Studien vorgestellt.

Die Kopplung von PCR mit IMS zum Nachweis von *Salmonella* spp. aus Lebensmitteln ist in verschiedenen Studien durchgeführt worden. Tabelle 7 fasst den aktuellen Stand der Forschung zusammen.

Tabelle 7: IMS-PCR zum Nachweis von *Salmonella* spp. aus Lebensmitteln tierischen Ursprungs.

Zielgen	Probenmatrix	Zeitdauer der Voranreicherung	Art der IMS	Aliquot aus der VA für IMS	Dauer	Sensitivität	Detektionssystem	Referenz
IMS-konventionelle PCR								
<i>OriC</i>	Geflügelfleisch	6 h 24 h	mit monoklonalen AK beschichtete Magnetpartikel	1 ml	30 h	100 CFU/g 0,1 CFU/g	Gelelektrophorese	FLUIT ET AL., 1993
<i>IroB</i>	Eiweiß	16 h (Supplementierung mit Ferrioxamin E)	Dynabeads® anti- <i>Salmonella</i>	1 ml	24 h	10 ³ Bakterien/ml	Gelelektrophorese	BÄUMLER ET AL., 1997
<i>OriC</i>	Hackfleisch	20 h	Dynabeads® anti- <i>Salmonella</i>	1 ml	24 h	1-4 KbE/g	Gelelektrophorese	EROL ET AL., 1999
<i>Salmonella</i> spezifische Sequenz	Ei	16 h (Supplementierung mit Eisen)	Dynabeads® anti- <i>Salmonella</i>	1 ml	20 h	10 ⁴ Zellen/ml	Gelelektrophorese	RIJPENS ET AL., 1999
<i>invA</i> und <i>spvC</i>	Hackfleisch	16 h	Dynabeads® anti- <i>Salmonella</i>	1 ml	24 h	1-5 x 10 ³ CFU/25g	Gelelektrophorese	JENIKOVA ET AL., 2000
<i>Salmonella</i> spezifische Sequenz	Ei (getrocknet)	16 h	Dynabeads® anti- <i>Salmonella</i>	1 ml	k.A.	k.A.	Gelelektrophorese	SPANOVA ET AL., 2001

AK: Antikörper; bp: base pair; k.A.: keine Angabe; VA: Voranreicherung

Fortsetzung Tabelle 7: IMS-PCR zum Nachweis von *Salmonella* spp. aus Lebensmitteln tierischen Ursprungs.

Zielgen	Probenmatrix	Zeitdauer der Voranreicherung	Art der IMS	Aliquot aus der VA für IMS	Dauer	Sensitivität	Detektionssystem	Referenz
IMS-real-time PCR								
<i>invA</i> , 119 bp	Hackfleisch	16-18 h	Dynabeads® DNA Direct System	0,5 ml	k.A.	k.A.	TaqMan®-Sonden	JENIKOVA ET AL., 2001
<i>sefA</i>	Geflügel	24 h	Dynabeads® anti- <i>Salmonella</i>	1 ml	k.A.	10 ³ CFU/ml	SYBR® Green	DE MEDICI ET AL., 2003
<i>invA</i> , 284 bp	Hackfleisch	10 h	Dynabeads® anti- <i>Salmonella</i>	1 ml	13 h	2,5 CFU/25 g	SYBR® Green	MERCANOGLU UND GRIF-FITHS, 2005

AK: Antikörper; bp: base pair; k.A.: keine Angabe; VA: Voranreicherung

7 Bestimmung der bakteriellen Lebensfähigkeit durch molekularbiologische Methoden

Eine Gesundheitsgefährdung für den Verbraucher geht von lebenden pathogenen Keimen aus. Um festzustellen, ob ein pathogener Keim eine aktuelle Bedrohung darstellt, muß dessen Lebensfähigkeit bestimmt werden (KEER UND BIRCH, 2003).

Klassische Methoden zur Erfassung der Lebensfähigkeit schließen die Durchflußzytometrie (CARON ET AL., 1998; TURNER ET AL., 2000) sowie Nukleinsäure-basierte Verfahren (MCKILLIP ET AL., 1998; SHERIDAN ET AL., 1998) ein.

Klassische Methoden zur Feststellung der Lebensfähigkeit sind zeitaufwendig. Deswegen haben sich molekulare Methoden entwickelt, die Schnelligkeit, Spezifität sowie Sensitivität ermöglichen. Sowohl DNA als auch RNA wurden durch molekulare Amplifikationsmethoden, wie PCR, RT-PCR, NASBA (CHAN UND FOX, 1999; SIMPKINS ET AL., 2000) oder RT-SDA (HELLYER, 2001) zur Bestimmung der Lebensfähigkeit herangezogen. Der Vorteil von NASBA gegenüber RT-PCR liegt in der höheren Sensitivität. Bei NASBA wird eine Fülle von einzelsträngigen RNA-Transkripten von einem mRNA Template gebildet. Um falsch-positive Ergebnisse durch DNA-Kontamination bei RT-PCR auszuschließen, wird diese durch DNAsen beseitigt oder „Intron-flanking“ Primer verwendet, um zwischen RNA- und DNA-abgeleiteten Amplikons unterscheiden zu können (TONG ET AL., 1994). Für Prokaryonten ist jedoch die Verwendung von „Intron-flanking“ Primern nicht geeignet (SIMPKINS ET AL., 2000). Beim Vergleich der Leistungsfähigkeit von PCR, RT-PCR und NASBA stellten BIRCH ET AL (2001) die größte Sensitivität für NASBA bei der Detektion persistierender Nukleinsäuren hitzeinaktivierter *E. coli* Stämme fest. PCR und NASBA waren in der Lage, auch 30 h nach der Inaktivierung, verbliebene DNA bzw. mRNA nachzuweisen.

Aufgrund der variablen Persistenz von Nukleinsäuren in toten Zellen besteht jedoch keine eindeutige Korrelation zwischen der Anwesenheit von DNA bzw. RNA und der Lebensfähigkeit des Bakteriums. Deshalb können die Auswahl des Zielgens und die Sensitivität der Methode die Validität der Untersuchung signifikant bestimmen (KEER UND BIRCH, 2003).

Das Prinzip zur Unterscheidung zwischen lebenden und toten Keimen durch molekularbiologische Methoden liegt darin begründet, dass man eine Nukleinsäure (DNA oder RNA) findet, die nur in lebenden Zellen zu finden ist, die Kinetik ihres Abbaus mit dem Verlust an Lebensfähigkeit verbunden ist und die nach dem Tod der Zelle rasch abgebaut wird (SHERIDAN ET AL., 1998). Da die DNA toter Zellen in für die PCR detektierbarer Form erhalten bleibt (JOSEPHSON ET AL., 1993; MASTERS ET AL., 1994; HERMAN, 1997), ist es möglich, durch dieses Verfahren ein falsch-positives Ergebnis von toten Zellen zu erhalten. PCR ist folglich nicht in der Lage, zwischen der DNA toter und lebender Keime zu unterscheiden (RIJPENS UND HERMAN, 2002). Auch nicht alle drei RNA-Gruppen (tRNA, rRNA, mRNA) sind geeignet, lebende von toten Bakterien zu unterscheiden (RIJPENS UND HERMAN, 2002).

So gibt es geringe Informationen zur Persistenz von tRNA in geschädigten oder toten Zellen. DAVIS ET AL. (1986) stellten in ihren Untersuchungen fest, dass tRNA einige Zeit länger in verhungerten *E. coli* Zellen fortbesteht als rRNA und deshalb als Indikator für die Lebensfähigkeit ungeeignet ist.

Auch rRNA wurde als Indikator für die Lebensfähigkeit untersucht (TOLKER-NIELSEN ET AL., 1997; UYTENDAELE ET AL., 1997; MCKILLIP ET AL., 1998; SHERIDAN ET AL., 1998; MCKILLIP ET AL. 1999). rRNA ist ein universeller Bestandteil bakterieller Ribosomen, in hoher Copyzahl verfügbar und kann, ähnlich wie DNA, in toten Zellen für eine bestimmte Zeitdauer persistieren (MCKILLIP ET AL., 1998). MCKILLIP ET AL. (1998) untersuchten an *E. coli* O157:H7 und *Staphylococcus aureus* die Eignung von 16S rRNA als Indikator für die Lebensfähigkeit. Die 16S rRNA wurde unter extremen Hitzebedingungen (121 °C; 15 min) inaktiviert. Bei moderater Hitzeinwirkung (80 °C; 20 min) und UV-Bestrahlung dagegen konnte rRNA noch bis zu 48 h nach der Inaktivierung mittels RT-PCR nachgewiesen werden. Die Anwesenheit von rRNA ist deshalb nicht korreliert mit der Lebensfähigkeit im Anschluß an moderate Hitzeinaktivierung (80 °C; 20 min) oder UV-Bestrahlung der Zellen. 16S rRNA hitzeinaktivierter *E. coli* O157:H7 ist sowohl in Reinkultur als auch Magermilch gleichermaßen stabil. Die Begleitflora sowie die Bestandteile der Milch beschleunigen nicht den rRNA-Abbau. Obwohl rRNA instabiler ist als DNA, kann sie nicht als Indikator für die Lebensfähigkeit von Bakterien in gering verarbeiteten Lebensmitteln (z.B. Hitzebehandlung 60 °C bis 80 °C) verwendet werden (MCKILLIP ET AL., 1998).

In Untersuchungen von SHERIDAN ET AL. (1998) war 16S rRNA von hitze- oder Ethanolinaktivierten *E. coli* noch nach 16 h Lagerung bei Raumtemperatur nachweisbar. Aufgrund ihrer variablen Persistenz in Bezug auf zahlreiche bakterielle Stressbedingungen wurde sie deshalb als wenig geeigneter Indikator für die Bestimmung der Lebensfähigkeit betrachtet (TOLKER-NIELSEN ET AL., 1997).

Von den drei RNA-Gruppen wurde die mRNA-Analyse als geeignet betrachtet, einen Hinweis auf die bakterielle Lebensfähigkeit zu geben, da die meisten mRNA-Spezies nur für kurze Zeit (Halbwertszeit von Sekunden bis Minuten) in aktiv metabolisierenden Bakterien persistieren (KUSHNER, 1996).

Um als Indikator für die Lebensfähigkeit geeignet zu sein, muß mRNA spezifisch für den Zielorganismus sein, unabhängig von physiologischen und umweltbedingten Veränderungen sowie reichlich exprimiert werden und eine von post-Inaktivierungsbedingungen unabhängige kurze Halbwertszeit in toten Zellen aufweisen (SZABO UND MACKEY, 1999; YARON UND MATTHEWS, 2002). Der Transkript-Pool von Bakterien variiert jedoch über den gesamten Wachstumszyklus hinweg. SZABO UND MACKEY (1999) untersuchten die Auswirkung von verschiedenen pH-Werten und Temperaturen auf die Transkription des *sefA* Gens von *S. Enteritidis* in Hackfleisch und Hühnerfleisch. Sie berichteten von großen Unterschieden in der *sefA*

Expression von *S. Enteritidis* in Abhängigkeit von Wachstumsphase, -medium sowie -temperatur. Da der physiologische Status eines Bakteriums im Lebensmittel nicht bekannt ist, ist der Gebrauch der RT-PCR Amplifizierung der *sefA* mRNA für die Detektion von *S. Enteritidis* in Lebensmittel limitiert (SZABO UND MACKEY, 1999). Hinzu treten bei der Detektion von pathogenen Mikroorganismen in Lebensmittel durch RT-PCR, dass sie nicht nur abhängig vom ausgewählten Zielgen ist, sondern auch von Inhibitoren der Lebensmittelmatrix, die eine ausreichende Extraktion des Templates für die Amplifikation verhindert oder den Amplifikationsprozeß hemmt, beeinflusst wird (MCINGVALE ET AL., 2002).

Auch SHERIDAN ET AL. (1998) fanden eine Limitierung von RT-PCR für die Bestimmung der Lebensfähigkeit von *E. coli* heraus. Die Persistenz der mRNA toter Zellen ist abhängig von den mRNA-Spezies, der Inaktivierungsmethode und den anschließenden Lagerungsbedingungen. In mehreren Studien wurde gezeigt, dass auch mRNA in einer detektierbaren Form mehrere Stunden nach dem Zelltod persistieren kann (SHERIDAN ET AL., 1998; SHERIDAN ET AL., 1999; BIRCH ET AL., 2001).

Aus diesen Studien geht hervor, dass es schwierig ist, ein mRNA-Zielgen zu finden, das die genannten Eigenschaften erfüllt. So ist z.B. ein Transkript, das unabhängig von physiologischen und umweltbedingten Einflüssen in großer Zahl exprimiert wird, selten. Verwendet man mRNA als Indikator für die Bestimmung der Lebensfähigkeit, wird dies immer ein Kompromiß zwischen Sensitivität und Reliabilität sein (MCINGVALE ET AL., 2002). Außerdem sind die Abbauege der bakteriellen mRNA sehr komplex und erst in den letzten Jahren aufgeklärt worden (STEEGE, 2000). Deshalb ist es erforderlich, die Persistenz und die Zerfallscharakteristik des jeweiligen mRNA Targets zu kennen, wenn man über mRNA eine Aussage zur Lebensfähigkeit des untersuchten Bakteriums treffen will (KEER UND BIRCH, 2003).

C Material und Methoden

1 Material

Nachfolgend sind die für die Arbeit benötigten Gebrauchslösungen, Gebrauchs- und Verbrauchsmaterialien, sowie Chemikalien und Nährmedien zusammengestellt.

1.1 Gebrauchslösungen

Physiologische NaCl-Lösung

7,65 g Natriumchlorid „reinst“	Merck, Nr. 1.06400
0,724 g di-Natriumhydrogenphosphat	Merck, Nr. 1.06586
0,21 g Kaliumhydrogenphosphat	Merck, Nr. 4873
ad 1 Liter aqua dest.	

PBS-Tween

9,55 g Phosphate Buffered Saline (PBS)	Biochrom, Nr. L 182-50
500 µl Tween 20	Merck, Nr. 8.22184
ad 1 Liter aqua dest.	

Lysispuffer für die DNA-Extraktion

1790 µl steriles Reinstwasser	
200 µl TE-Puffer	
10 µl Tween 20	Merck, Nr. 8.22184

TE-Puffer

10 mM Tris	Merck, Nr. 8382
1 mM EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Sigma, Nr. ED-225
in aqua dest.	
mit HCl (Salzsäure)	Merck, Nr. 0319
auf pH 8 einstellen	

1.2 Gebrauchsmaterial

Technisches Gerät	Hersteller, Typ-Bezeichnung
Magnet MPC-L [®]	Dynal, Nr. 120.21
Thermoschüttler	Eppendorf, Nr. 5355 02652
Magnetrührer, temperierbar	Heidolph, MR 3001K
Laborschüttler	Vortex Genie 2 Scientific Industries G-560 E;
LightCycler	Roche, Nr. 2 011 468
Kühlblock mit Zentrifugenadaptern	Roche, Nr. 1 909 321
Pipetten (0,5-10 µl; 10-100 µl; 100-1000 µl)	Brand, Nr. 7041-02; 7041-70; 7041-80
Zentrifugen	Hettich EBA 12 R Hereaus Biofuge 28 RS
Tischzentrifuge	Polylabo Centrifuge, PMC – 060 Eppendorf, MiniSpin [®]
Waage	Sartorius, Typ 3716, Nr. 2604193
Sterilwerkbank Herasafe	Hereaus (Kendro Laboratory Products) Typ HS 12
Ultra-Turrax	IKA Werke, Typ 18-10, Nr. 8254
Ultra-Turrax Regler	IKA Werke, Thyristor 18-10
Dispergierwerkzeug S 25 N – 18 G	IKA Werke, Ident-Nr. 05934.00
Horizontalschüttler	IKA Labortechnik, KS 250
Brutschrank	Memmert, Modell 500
Kühlbrutschrank	Memmert, Modell ICE 500

1.3 Verbrauchsmaterial

Bezeichnung	Hersteller und Katalognummer
Dynabeads [®] M-280 anti-Salmonella	Dynal, Nr. 710.02
15 ml PP-Röhrchen	Greiner, Nr. 188.271
50 ml PP-Röhrchen	Greiner, Nr. 227.261
Kryoröhrchen	Brand, Nr. 114832 Greiner, Nr. 121279
Filterpipettenspitzen (10 µl; 100 µl; 1000 µl)	Brand, Nr. 702-100; 702-104; 702-108

Bezeichnung	Hersteller und Katalognummer
Reaktionsgefäße 0,5 ml	Eppendorf; Nr. 0030 121.023
1,0 ml	Eppendorf, Nr. 0030 120.086
2,0 ml	Eppendorf, Nr. 0030 120.094
LightCycler Kapillaren	Roche, Nr. 1 909 339
LightCycler-FastStart DNA Master Hybridization Probes	Roche, Nr. 2 239 272
High Pure PCR Product Purification Kit	Roche, Nr. 1 732 668
PCR-grade Wasser	Roche, Nr. 3 315 959
Petrischalen	Greiner, Nr. 633180
Salmonella Polyvalent I Serum	Diagonal, Nr. ORMT 11
Salmonella Polyvalent II Serum	Diagonal, Nr. ORMU 11
BBL Crystal [®] Enteric/Nonfermenter	Becton Dickinson, Nr. 245000

1.4 Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller und Katalognummer
Proteinase K (20 mg/ml)	Sigma, Nr. P-2308
Kaliumhydroxid Plätzchen zur Analyse	Merck, Nr. 1.05033
Perhydrol [®] 30 % H ₂ O ₂	Merck, Nr. 1.07209
N,N,N',N'-Tetramethyl-p-Phenylendiamin-Dihydrochlorid	Sigma, Nr. T-3134
Kovacs Indolreagenz	Merck, Nr. 1.09293
Ferrioxamin E ¹ "enterobacterial Autoinducer of Growth" ¹	

¹: Beide Substanzen wurden von Dr. Reissbrodt (Robert-Koch-Institut, Wernigerode) freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

1.5 Nährmedien

Gepuffertes Peptonwasser

50 g Peptonwasser aus Casein	Merck, Nr. 1.07213
25 g Natriumchlorid	Merck, Nr. 1.06400
17,85 g di-Natriumhydrogenphosphat	Merck, Nr. 1.06586
7,5 g Kaliumhydrogenphosphat	Merck, Nr. 4873
ad 5 Liter aqua dest. (pH 7,0)	

Selenit-Cystin Anreicherungsbouillon

23 g Selenit-Cystin Anreicherungsbouillon	Merck, Nr. 1.07709
ad 1 Liter aqua dest.	

Rappaport-Vassiliadis Anreicherungsbouillon

43 g Rappaport-Vassiliadis-Anreicherungsbouillon	Merck, Nr. 1.07700
ad 1 Liter aqua dest.	

Standard-I-Bouillon

25 g Standard-I-Bouillon	Merck, Nr. 1.07882
ad 1 Liter aqua dest.	

Nutrient Broth (zur Kryokonservierung)

12,5 g Nutrient Broth No. 2	Oxoid, Nr. CM 67
75 g Glycerin zur Analyse (15 %)	Merck, Nr. 1.04092
ad 0,5 Liter aqua dest.	

BPLS-Agar

51,5 g BPLS-Agar (modifiziert)	Merck, Nr. 1.10747
ad 1 Liter aqua dest.	

XLT4-Agar

59 g XLT4-Agar-Basis	Merck, Nr. 1.13919
4,6 ml XLT4-Agar-Supplementlösung	Merck, Nr. 1.08981
ad 1 Liter aqua dest.	

Normalagar

60 g Blutagar-Basis Nr. 2
ad 1,5 Liter aqua dest.

Oxoid, Nr. CM 271

Blutagar

60 g Blutagar-Basis Nr. 2
100 ml defibriniertes Schafsblut

ad 1,5 Liter aqua dest.

Oxoid, Nr. CM 271
Fiebig Nährstofftechnik, 65510 Id-
stein/Ts.

Gassner Agar

77 g Gassner Agar
ad 1 Liter aqua dest.

Merck, Nr. 1.01282

1.6 Biologisches Material

1.6.1 Referenzkeim

Als Referenzkeim und als Keim für die Positivkontrolle diene *S. Enteritidis* DSM 9898.

1.6.2 Probenmaterial und –lagerung

Zur Untersuchung der Leistungsfähigkeit der IMS-real-time PCR-Methode wurden insgesamt 491 Feldproben, d.h. nativ kontaminierte Fleischproben, parallel mit dem kulturellen Verfahren nach §35 LMBG in einem Monitoring auf eine Kontamination mit *Salmonella* spp. untersucht. Es wurden vier verschiedene Matrices in den Betrachtungen berücksichtigt. Tabelle 8 fasst diese und die beprobten Fleischstücke zusammen.

Tabelle 8: Darstellung der vier untersuchten Matrices.

Fleischart	beprobtes Fleischstück
Rind	Hüftsteak
Schwein	Bauchfleisch mit Schwarte
Geflügel (nur Hähnchen)	Schenkelfleisch mit Haut
Hackfleisch	Rinder-, Schweine- und gemischtes Hackfleisch

Die Proben wurden aus Supermärkten und Metzgereien in Freising und Umgebung bezogen. Es wurde frische und verpackte Ware untersucht. Sowohl frische als auch verpackte Ware lagerte bis zur Untersuchung im Kühlschrank bei 2-4 °C. Die Lagerungszeit betrug für die frischen Produkte 1 Tag und für die verpackten Proben 2 Tage.

2 Methoden

2.1 Allgemeine mikrobiologische Methoden

2.1.1 Kontrollstamm und dessen Anzucht

Die Kulturen des Referenzkeimes *S. Enteritidis* DSM 9898 lagerten in der lehrstuhleigenen Sammlung kryokonserviert bei -70 °C. Vor Gebrauch wurde der Keim auf Blutagar sowie parallel auf XLT4-Agar mittels Dreiösenausstrich aufgetaut und 24 h bei 37 °C bebrütet. Der aufgetaute Keim wurde bei 4 °C aufbewahrt und im Abstand von 4 Wochen auf Blutagar und XLT4-Agar unter den oben angegebenen Bedingungen subkultiviert.

2.1.2 Ermittlung der Keimkonzentration von *Salmonella*-Suspensionskulturen

Für die artefizielle Kontamination von Probenmaterial ist ein definierter Keimgehalt Voraussetzung. Zu dessen Ermittlung wurde Koloniematerial von kulturell angezüchteten *S. Enteritidis* DSM 9898 in 10 ml Standard-I-Bouillon suspendiert und 18 h bei 37 °C inkubiert. Aus dieser Suspensionskultur wurde eine Verdünnungsreihe mit dem Faktor 1:10 erstellt. Die Verdünnungsstufen 10^{-6} bis 10^{-9} wurden im Doppelansatz auf Normalagar und parallel im Einfachansatz auf XLT4-Agar mittels Oberflächenspatelverfahren (0,1 ml Keimsuspension/Platte) aufgebracht. Die Platten wurden anschließend 24 h bei 37 °C inkubiert und danach ausgezählt. Zur Ermittlung des Keimgehalts je Verdünnungsstufe wurde der Mittelwert

der Keimzahlen, der sich durch die Auszählung der beiden Normalagarplatten ergab, berechnet und auf 0,1 ml bzw. 1 ml je Verdünnungsstufe oder eingewogenem Fleisch bezogen.

2.1.3 Artefizielle Kontamination von Probenmaterial

Zum Nachweis definierter Keimgehalte wurde Fleisch artefiziell kontaminiert. Um standardisierte Bedingungen zu erhalten, wurde als Probenmaterial Schweineschnitzelfleisch, das vom Metzger bezogen wurde, verwendet. Dieses wurde mit unterschiedlich konzentrierter Bouillonkultur des Referenzkeims (ca. 1 KBE/25g; 10 KBE/25g; 100 KBE/25 g) beimpft. Die gewünschten Keimgehalte wurden, wie unter 2.1.2 beschrieben, erhalten. In den Betrachtungen mitberücksichtigt sind Schwankungen, die sich bei der Einstellung der Keimkonzentrationen ergeben. Die Inokulation des Probenmaterials erfolgte stets nach dessen Zerkleinerung.

Für die bei den Versuchen angelegte Positivkontrolle wurde zerkleinertes Schweineschnitzelfleisch verwendet und mit einer definierten Konzentration des *Salmonella*-Referenzkeims, die nach den Angaben von 2.1.2 ermittelt wurde, beimpft. Die bei der Untersuchung der Feldproben mitgeführte Positivkontrolle wurde stets mit ca. 100 KBE/25 g des Referenzkeims inokuliert.

2.2 Real-time PCR-Einstellungen

Im Folgenden werden die für die Versuche verwendeten PCR-Einstellungen zusammengefasst. Sie stützen sich auf die Arbeit von SCHMID (2002).

DNA-Zielsequenz:	<i>Salmonella</i> -Invasionsgen (457 bp)
Primer:	invE-A (STONE ET AL., 1994)
Detektionsformat:	Hybridisierungssonden

Die Geräteeinstellungen des LightCycler® fasst Tabelle 9 zusammen.

Tabelle 9: Einstellungen des LightCycler® (SCHMID, 2002).

Einstellungen der PCR-Reaktion			
Programmschritt	Temperatur	Zeit	Fluoreszenzmessung
Preinkubation	95 °C	10 min	
<u>PCR-Reaktion (60 Zyklen)</u>			
Denaturierung	95 °C	15 s	
Annealing	62 °C	10 s	single
Elongation	72 °C	18 s	
Einstellungen der Schmelzkurvenanalyse			
Schmelzkurve	von 45 °C bis 75 °C	0,1 °C/s bis zum Er- reichen der Zieltem- peratur	continuous

Die Zusammensetzung des MasterMix gibt Tabelle 10 wieder.

Tabelle 10: Zusammensetzung des MasterMix der real-time PCR (SCHMID, 2002).

Bestandteile	Konzentration ¹	Menge/Probe [µl]
MgCl ₂	25 mM	1,6
H ₂ O (PCR-grade)	-	8,4
FastStart DNA Master ²	10-fach	2,0
Primer InvE	20 µM	0,5
Primer InvA	20 µM	0,5
Hybridierungssonde (Fluoreszein)	4 µM	1,0
Hybridierungssonde (LC-640)	4 µM	1,0
Gesamt		15

¹: Ausgangskonzentration

²: enthält *Taq* Polymerase, Puffer, dNTPs, MgCl₂

Zu 15 µl MasterMix wurden 5 µl DNA-Probe in die LightCycler® Kapillaren pipettiert. Diese wurden anschließend bei 700 x *g* zentrifugiert und standen der Messung zur Verfügung.

Die Basenabfolge der Primer und Hybridisierungssonden stellt Tabelle 11 zusammen.

Tabelle 11: Basensequenz der Primer und Hybridisierungssonden.

Bezeichnung	Basensequenz der Primer (5' → 3')	Referenz
InvE (forward)	TGC CTA CAA GCA TGA AAT GG	STONE ET
InvA (reverse)	AAA CTG GAC CAC GGT GAC AA	AL., 1994
	Basensequenz der Hybridisierungssonden (5' → 3')	
FL ¹	CGT CTT ATC TTG ATT GAA GCC GAT GCC-Fluo	SCHMID,
LC ²	LCRed-640-TGA AAT TAT CGC CAC GTT CGG GCA-Pho	2002

1.: Hybridisierungssonde Fluoreszein
2.: Hybridisierungssonde LC-640

2.3 Untersuchungen zum Wachstumsverhalten von *S. Enteritidis* DSM 9898

2.3.1 Untersuchungen zur Wachstumskinetik und –stimulation von *S. Enteritidis* DSM 9898

Zunächst wurde untersucht, welches Wachstumsverhalten *S. Enteritidis* DSM 9898 unter optimalen Bedingungen zeigt. Gleichzeitig wurde geprüft, inwieweit sich die Voranreicherungszeit durch eine Verkürzung der lag-Phase von *S. Enteritidis* DSM 9898 reduzieren lässt. Dies sollte durch Wachstumsstimulantien erreicht werden.

Zur Untersuchung der Wachstumskinetik wurde gepuffertes Peptonwasser mit 10 KBE/ml *S. Enteritidis* artifiziell kontaminiert. Die unverdünnte Keimsuspension wurde vor Erstellung der Verdünnungsreihe (2.1.2) 12 h bei 4 °C einem Kältestreß ausgesetzt. Zum Anreicherungsmedium wurden die Wachstumsstimulantien Ferrioxamin E (50 ng/ml) und/oder ein „enterobacterial Autoinducer of Growth“ (1 % v/v) hinzugefügt. Unsupplementiertes gepuffertes Peptonwasser diente als Kontrolle. Die Proben je Wachstumsstiumlans sowie die un-supplementierte Vergleichsprobe wurden im Vierfachansatz angelegt. Die Probennahme erfolgte jede halbe Stunde während eines Zeitraumes von 4 h und nach 6 h. Die Auswertung der Proben erfolgte über kulturelles Verfahren und mittels real-time PCR. Für die Auswertung über das kulturelle Verfahren wurden bei jeder Probennahme 0,1 ml der Voranreicherung auf Normagar im Spatelverfahren aufgebracht. Nach 24 h bei 37 °C erfolgte die Auszählung der Kolonien. Parallel wurden für die DNA-Extraktion 1 ml der Voranreicherung in ein 1,5 ml steriles Reaktionsgefäß überführt und 10 min bei 10.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und 30 µl Lysispuffer sowie 2 µl Proteinase K (20 mg/ml) auf das Bakterienpellet gegeben. Es folgte eine Inkubation der Proben bei 56 °C für 1 h im Thermoschüttler (300 Upm) sowie eine abschließende Erhitzung auf 100 °C für 10 min. Die Proben wurden bis zur Mes-

sung bei 4 °C gelagert. Anschließend erfolgte die Messung mittels real-time PCR nach den in 2.2 angegebenen Einstellungen. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Mann-Whitney-Rangsummen-Test (SigmaStat, Version 3.1).

2.3.2 Untersuchungen zur Unterscheidung von lebenden und toten *S. Enteritidis* DSM 9898

Zunächst wurden zwei verschiedene Möglichkeiten getestet, lebende und tote *S. Enteritidis* mittels real-time PCR zu unterscheiden. Nachfolgend werden die Methoden beider Varianten vorgestellt.

a) mittels Immunomagnetischer Separation (IMS)

Dieser Versuchsanordnung lag die Überlegung zugrunde, durch die Einwirkung von Hitze die Oberflächenstruktur des Referenzkeims in der Weise zu schädigen, dass keine Bindung mehr zwischen dem Antigen des Bakteriums und dem Antikörper des Beads möglich ist. Zu diesem Zweck wurde physiologische NaCl-Lösung mit einer Ausgangskonzentration von 10^2 KBE/ml, 10^5 KBE/ml und 10^8 KBE/ml mit lebenden bzw. hitzeinaktivierten (96 °C; 10 min) *S. Enteritidis* artefiziell kontaminiert. Zur Kontrolle der vollständigen Inaktivierung der Zellen wurden 0,1 ml der jeweiligen Verdünnungsstufe auf Normalagar im Spatelverfahren aufgetragen, 24 h bzw. 48 h bei 37 °C inkubiert und anschließend auf Kolonienwachstum hin untersucht. Für die IMS wurden zu 4 ml Probenlösung jeweils 32 µl Dynabeads® anti-*Salmonella* hinzugefügt und 10 min in horizontaler Lage (250 Upm) inkubiert. Zur Separation der Beads wurden die Proben in den Magneten MPC-L® eingesetzt und 10 min durch Drehbewegung mit Seitenwechsel bewegt. Anschließend ruhten sie 5 min. Im weiteren folgten drei Waschschriffe mit je 9 ml 0,05 % PBS-Tween 20. Nach einer Zugabe von 30 µl Lysispuffer wurden die Beads in ein steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 2 µl Proteinase K (20 mg/ml) zugegeben. Anschließend wurden die Proben 1 h bei 56 °C auf dem Thermoerschüttler (300 Upm) inkubiert und danach 10 min bei 100 °C erhitzt. Abschließend lagerten sie bis zur real-time PCR Analyse bei 4 °C. Die PCR-Bedingungen entsprachen den unter 2.2 dargestellten Angaben.

b) mittels quantitativer real-time PCR (qPCR)

In diesem Versuch wurden lebende und hitzeinaktivierte *S. Enteritidis* DSM 9898 vorangereichert und anschließend der DNA-Gehalt mittels real-time PCR ermittelt. Während dieses Anreicherungsschrittes, so die Überlegung, würden sich die lebenden im Gegensatz zu den toten Zellen vermehren. Diese Zunahme an Zellmasse und damit DNA-Menge würde sich bei den lebenden Bakterien durch einen niedrigen Crossing Points bemerkbar machen. Für die Untersuchungen wurde gepuffertes Peptonwasser mit einer Anfangskonzentration von $10^0 - 10^5$ KBE/ml lebender bzw. toter (96 °C; 10 min) *S. Enteritidis* artefziell kontaminiert. Nach einer Inkubationszeit von 4 h bei 37 °C wurden Proben zur DNA-Extraktion gezogen. Die DNA-Aufreinigung und real-time PCR Messung erfolgte wie unter 2.3.1 angegeben. Der Versuchsaufbau wurde fünfmal durchgeführt. Da in einer Lebensmittelprobe lebende und tote Keime gemeinsam auftreten, wurden in einem zweiten Schritt unterschiedliche Mischverhältnisse (100 % tot; 75 % tot/25 % lebend; 50 % tot/50 % lebend; 25 % tot/75 % lebend; 100 % lebend) aus lebenden und hitzeinaktivierten (96 °C; 10 min) *S. Enteritidis* (100 KBE/ml gepuffertes Peptonwasser) untersucht. Dadurch sollte geprüft werden, ob nach der Bildung der Differenz der Crossing Points auch bei Mischverhältnissen ein Unterschied feststellbar ist. Die Inkubationszeit betrug ebenfalls 4 h bei 37 °C. Die DNA-Aufreinigung und real-time PCR Analyse erfolgte wie unter 2.3.1 angeführt. Diese Versuchsanordnung wurde dreimal durchgeführt.

Um die Inaktivierung der erhitzten Keime zu kontrollieren, wurden 0,1 ml der jeweiligen Verdünnungsstufe bzw. des jeweiligen Mischungsverhältnisses auf Normalagar mittels Spatelverfahren ausgebracht. Nach 24 h bzw. 48 h bei 37 °C wurden die Platten auf Wachstum hin untersucht.

Die Differenz der Crossing Points vor und nach dem Voranreicherungsschritt wurden statistisch mittels Mann-Whitney Rangsummen Test (SigmaStat, Version 3.1) verglichen.

2.4 Anpassung und Optimierung der IMS-real-time PCR-Methode an die Vorgaben des amtlichen Verfahrens nach §35 LMBG

Zur Anpassung und Optimierung der IMS-real-time PCR-Methode wurden verschiedene Vorversuche durchgeführt, die nachfolgend beschrieben werden. Die Bewertung der einzelnen Methoden erfolgte nach den Kriterien Entfernung von den Nachweis störender Bestandteile der Probenmatrix sowie DNA-Wiederfindung nach artefizieller Kontamination.

2.4.1 Probenaufbereitung vor IMS

Die Basis der IMS-real-time PCR-Methode bildet die Arbeit von SCHMID (2002). Um einen Vergleich mit dem kulturellen Referenzverfahren zu ermöglichen, musste die Einwaage von bisher 5 g Fleisch (+ 40 ml gepuffertes Peptonwasser, entspricht 1:9, w/v) auf 25 g (+ 225 ml gepuffertes Peptonwasser, entspricht 1:10, w/v) angeglichen werden. Zunächst wurde die Basismethode – die Einwaage wurde auf 25 g erhöht – auf ihre Durchführbarkeit hin untersucht. Um die groben Fasern, die sich infolge der Zerkleinerung bildeten zu entfernen, wurden die Schritte Filtration, Sedimentation sowie Zentrifugation angewendet. Zur Behebung der Schwankungen in der Sedimentausprägung nach der Zentrifugation durch die Matrixeffekte wurde ein steriler Edelstahlstempel (Abbildung 1) zur Hilfe genommen, der es ermöglichte, ein schwach ausgebildetes Sediment nach unten zu drücken und anschließend das Aliquot vom Überstand abzunehmen. Jede untersuchte Keimgehaltsstufe der einzelnen Versuchsdurchführungen wurde im Doppelansatz angelegt. Die Versuchsanordnungen der Probenaufbereitungsarten Filtration und Zentrifugation in Verbindung mit der Stempelanwendung wurden dreimal durchgeführt. Die Versuchsprotokolle der Optimierungsschritte sind in Tabelle 12 zusammengestellt. Die real-time PCR wurde nach den unter 2.2 angegebenen Einstellungen durchgeführt.



Abbildung 1: Edelstahlstempel schräge Seitenansicht (Abbildung links) und Ansicht von oben (Abbildung rechts)

Tabelle 12: Optimierungsschritte zur Anpassung der IMS-real-time PCR-Methode an die Vorgaben des amtlichen Verfahrens.

Methodenschritt	Optimierungsschritt				
	Basismethode	Filtration	Sedimentation	Zentrifugation	Verbesserung der Sedimentausprägung
Einwaage	25 g Schweinefleisch + 225 ml gepuffertes Peptonwasser				
Zerkleinerung	Zerkleinerung mittels Ultra-Turrax auf Regelstufe 7				
Artefizielle Kontamination	1 KBE/25 g 10 KBE/25 g 100 KBE/25 g	100 KBE/25 g	100 KBE/25 g	100 KBE/25 g	1 KBE/25 g 10 KBE/25 g 100 KBE/25 g
Inkubation	4 h bzw. 6 h bei 37 °C als Schüttelkultur (150 Upm)	4 h bei 37 °C	4 h bzw. 6 h bei 37 °C als Schüttelkultur (150 Upm)	6 h bei 37 °C als Schüttelkultur (150 Upm)	
Optimierung		Teilung der Suspension in je zwei 125 ml Aliquots → ein Aliquot wird filtriert (Suspension in sterilem Sieb mit einlagiger Gaze filtrieren; Filtrationsrückstand mit 10 ml 0,05 % PBS-Tween 20 waschen); das zweite Aliquot wird nicht filtriert.	Teilung des Ansatzes in je zwei 125 ml Aliquots → ein Aliquot wird bis zur Probennahme geschüttelt, das andere Aliquot der gleichen Probe 30 min vor Probennahme nicht geschüttelt (konnte sedimentieren).	<u>Zentrifugation:</u> Entnahme eines 20 ml Aliquots → Zentrifugation für je 2 min bei 91 x g bzw. 136 x g. <u>Sedimentation:</u> 30 min vor Probennahme Sedimentation grober Matrixpartikel	<u>Zentrifugation:</u> Entnahme eines 20 ml Aliquots → Zentrifugation für je 2 min bei 91 x g. <u>Stempelanwendung:</u> Entnahme eines 20 ml Aliquots → Zentrifugation für je 2 min bei 91 x g → Auflegen des sterilen Edelstahlstempels
Entnahme des Aliquots	Entnahme eines 10 ml Aliquots	10 ml des Filtrats bzw. 10 ml der Suspension	Jeweils Entnahme eines 10 ml Aliquots		

Fortsetzung Tabelle 12: Optimierungsschritte zur Anpassung der IMS-real-time PCR-Methode an die Vorgaben des amtlichen Verfahrens.

Methodenschritt	Basismethode	Optimierungsschritt			Verbesserung der Sedimentausprägung
		Filtration	Sedimentation	Zentrifugation	
IMS		80 µl Dynabeads [®] anti- <i>Salmonella</i> Inkubation bei 250 Upm für 10 min auf dem Horizontalschüttler Separation der Beads mit dem Magneten MPC-L [®] : 10 min Drehbewegung mit Seitenwechsel, 5 min ruhen lassen 3 x Waschen mit je 9 ml 0,05 % PBS-Tween 20: je 2 min Drehbewegung mit Seitenwechsel, 3 min ruhen lassen			
DNA-Extraktion		Beads in steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß überführen Zugabe von 30 µl Lysispuffer Zugabe von 2 µl Proteinase K (20 mg/ml) Inkubation 1 h bei 56 °C Kochen für 10 min bei 100 °C Abkühlung bei 4 °C			
PCR		Real-time PCR			

2.4.2 DNA-Aufreinigung

Um die negativen Einflüsse der Matrixeffekte auf das PCR-Ergebnis zu unterbinden, wurde der bisherigen IMS-real-time PCR-Methode ein DNA-Aufreinigungsschritt angeschlossen. Zu diesem Zweck wurden Fleischproben mit unterschiedlichen Keimgehalten artefiziell kontaminiert und im Doppelansatz angelegt. Davon wurde anschließend ein Ansatz nur der DNA-Extraktion und der zweite Parallelansatz einem zusätzlichen Aufreinigungsschritt unterzogen. In die Untersuchung mit einbezogen wurden die beiden Probenaufbereitungsarten Zentrifugation sowie Zentrifugation in Verbindung mit Stempelanwendung. Der Versuchsansatz wurde sechs Mal durchgeführt. Die einzelnen Methodenschritte fasst Tabelle 13 zusammen. Die real-time PCR erfolgte unter den in 2.2 angegebenen Einstellungen.

Tabelle 13: Methodenschritte der IMS-real-time PCR-Methode zur Verbesserung der DNA-Aufreinigung.

Methodenschritte	Zentrifugation	Zentrifugation + Stempelanwendung
Einwaage	27 g Schweinefleisch + 243 ml gepuffertes Peptonwasser (vorgewärmt auf 37 °C)	
Zerkleinerung	Zerkleinerung mittels Ultra-Turrax auf Regelstufe 7	
Artefizielle Kontamination ¹	1 KBE/25 g 10 KBE/25 g	
Inkubation	6 h bei 37 °C als Schüttelkultur (150 Upm)	
Probenbearbeitung	Entnahme eines 20 ml Aliquots; Zentrifugation für je 2 min bei 91 x g	Entnahme eines 20 ml Aliquots; Zentrifugation für je 2 min bei 91 x g; Auflegen des Edelstahlstempels
Entnahme des Aliquots	Jeweils Entnahme eines 10 ml Aliquots	
IMS	80 µl Dynabeads [®] anti- <i>Salmonella</i> Inkubation bei 250 Upm für 10 min auf dem Horizontalschüttler Separation der Beads mit dem Magneten MPC-L [®] : 10 min Drehbewegung mit Seitenwechsel, 5 min ruhen lassen 3 x Waschen mit je 9 ml 0,05 % PBS-Tween 20: je 2 min Drehbewegung mit Seitenwechsel, 3 min ruhen lassen	
DNA-Extraktion	Beads in steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß überführen 30 µl Lysispuffer zugeben 2 µl Proteinase K (20 mg/ml) zugeben Inkubation 1 h bei 56 °C 10 min bei 100 °C kochen Abkühlung bei 4 °C	
DNA-Aufreinigung	Aufreinigung der PCR-Probe aus dem DNA-Extraktionsschritt mittels High Pure PCR Product Purification Kit	
PCR	Real-time PCR	

¹: *S. Enteritidis* DSM 9898 wurde als Testkeim verwendet. Vor Einstellung der angegebenen Keimgehalte wurde die Keimsuspension 24 h bei 37 °C inkubiert und anschließend 12 h bei 4 °C einem Kältestreß ausgesetzt.

2.5 In house-Validierung der IMS-real-time PCR-Methode anhand des kulturellen Referenzverfahrens nach §35 LMBG durch artefiziell kontaminierte Fleischproben

Nachfolgend werden die Methoden zur Überprüfung der Leistungsfähigkeit der IMS-real-time PCR-Methode an artefiziell mit *S. Enteritidis* DSM 9898 kontaminierten Fleischproben dargestellt. Diese erfolgte anhand des kulturellen Referenzverfahrens nach §35 LMBG. Beide Methoden und das Vorgehen werden in diesem Abschnitt der Arbeit beschrieben. Im weiteren wird eine Möglichkeit dargestellt, eine Kontamination von lebenden und toten Salmonellen mittels IMS-real-time PCR zu unterscheiden.

2.5.1 Überprüfung der Leistungsfähigkeit der IMS-real-time PCR-Methode im Vergleich zum amtlichen Verfahren nach §35 LMBG an artefiziell kontaminiertem Fleisch

Im Folgenden werden die Methodenschritte des kulturellen Verfahrens nach §35 LMBG (L 00.00 20) sowie der IMS-real-time PCR-Schnellmethode dargestellt. Fleischproben (Schweineschnitzfleisch) wurden mit aufsteigenden Keimgehalten (ca. 1 KBE/25 g; 10 KBE/25 g; 100 KBE/25 g) von *S. Enteritidis* DSM 9898 artefiziell kontaminiert. Die für die Inokulation benötigte Ausgangskeimsuspension wurde für 12 h bei 4 °C einem Kältestreß ausgesetzt. Die Keimgehaltsstufen 1 KBE/25 g und 10 KBE/25 g wurden im Doppelansatz angelegt, die Keimgehaltsstufe mit 100 KBE/25 g nur im Einfachansatz. Außerdem wurde eine Negativkontrolle mitgeführt. Um die Funktionsfähigkeit der Medien zu kontrollieren, wurden 270 ml gepuffertes Peptonwasser mit 100 KBE *S. Enteritidis* DSM 9898 inokuliert und nur mit dem kulturellen Verfahren getestet. Die Versuche wurden sechs Mal durchgeführt. Nach einer sechsstündigen Voranreicherungszeit bei 37 °C wurde ein Aliquot für die IMS-real-time PCR-Methode entnommen und nach den Angaben von Tabelle 14 bearbeitet. In die Untersuchungen mit einbezogen wurde als Probenbearbeitungsart vor IMS nur die Zentrifugation. Die real-time PCR wurde nach den unter 2.2 angegebenen Einstellungen durchgeführt. Nach 16-20 h bei 37 °C wurde die gleiche Voranreicherung für die Referenzmethode nach §35 LMBG weiterverwendet. Das heißt, beide Methoden wurden aus einem Ansatz bedient. Dadurch wurden gleiche Versuchsbedingungen für beide Methoden erreicht und ein exakter Vergleich ermöglicht.

Nachfolgend werden die Methodenschritte beider Verfahren im Einzelnen dargestellt.

2.5.1.1 Methodenschritte der Referenzmethode nach §35 LMBG

Die Anleitung für das Referenzverfahren ist der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §35 LMBG entnommen. Im Speziellen wurde das Horizontale Verfahren für den Nachweis von Salmonellen aus Lebensmitteln in der Ausgabe vom September 1998 (L 00.00.20:1998) angewandt. Daraus ergeben sich folgende Methodenschritte.

Einwaage und Ausgangssuspension

Zu 27 g Fleisch wurden 243 ml gepuffertes Peptonwasser (vorgewärmt auf 37 °C) gegeben. Dies entspricht einem Verhältnis von 1:10 (w/v).

Nicht selektive Voranreicherung

Die Ausgangssuspension wurde mindestens 16 h und höchstens 20 h bei 37 °C inkubiert. Während der Bebrütungszeit wurden die Proben bei 150 Upm auf dem Horizontalschüttler geschüttelt.

Selektive Anreicherung

Als Selektivmedien wurden Selenit-Cystin-Anreicherungsbouillon (SC-Medium) und Rappaport-Vassiliadis-Anreicherungsbouillon (RVS-Medium) verwendet. Zu 100 ml SC-Medium pipettiert man 10 ml der Voranreicherung (Verhältnis von 1:10). Aus der Voranreicherung wurden 0,1 ml zu 10 ml RVS-Medium gegeben (Verhältnis von 1:100). Beide Medien wurden 24 h sowie 48 h bei 37 °C (SC-Medium) bzw. 42 °C (RVS-Medium) inkubiert.

Identifizierung

Zur Identifizierung von Salmonellen-verdächtigen Kolonien erfolgte ein Ausstrich aus den beiden selektiven Anreicherungsmedien mit der Impföse auf der Oberfläche zweier Selektivnährmedien. Die Verwendung des Brilliantgrün-Phenolrot-Laktose-Saccharose-Agars (BPLS-Agar) ist vorgeschrieben. Als Nährboden der freien Wahl wurde Xylose-Lysin-Tergitol 4-Agar (XLT4-Agar) gewählt. Nach 24 h sowie 48 h Bebrütungszeit wurden sowohl aus dem SC- als auch dem RVS-Medium die Selektivnährböden mittels Dreiösenausstrich beimpft und 24 h bzw. 48 h bei 37 °C inkubiert. Eine Kontrolle auf Salmonellen-verdächtiges Wachstum erfolgte nach 24 h und 48 h Bebrütung der Selektivnährböden. Die endgültige Auswertung wurde stets nach 48-stündiger Inkubationszeit vorgenommen. Salmonellen-verdächtige Einzelkolonien wurden zur Bestätigung auf Normalagar subkultiviert und 24 h bei 37 °C inkubiert. Liegen Salmonellen-verdächtige Kolonien ohne Einzelkolonien oder uneindeutige Kolonien vor, wurden diese nochmals auf XLT4-Agar subkultiviert und 24 h, bei uneindeutigem Wachstum weitere 24 h, bei 37 °C bebrütet. Aus diesen Subkultivierungen isolierte Salmonellen-

verdächtige Einzelkolonien wurden auf Normalagar im Dreiösenausstrich aufgetragen, 24 h bei 37 °C bebrütet und anschließend der Bestätigung zugeführt.

Bestätigung

Für die getesteten Keimgehaltsstufen 1 KBE/25 g, 10 KBE/25 g, 100 KBE/25 g sowie die Medienkontrolle wurde jeweils 1 Salmonellen-verdächtigtes Isolat pro Selektivagarplatte bestätigt. Vor der serologischen und biochemischen Bestätigung wurden die Salmonellen-verdächtigen Keime auf ihr Verhalten bei Anwesenheit von Kaliumhydroxid (3 % (w/v) KOH), von 3 % (w/v) H₂O₂ (Katalase-Aktivität), von 0,5 % (w/v) N,N,N',N'-Tetramethyl-p-Phenylendiamin-Dihydrochlorid (Oxidase-Aktivität) sowie von Kovacs Indolreagenz (Produktion von Indol) untersucht. Abschließend wurde eine Gram-Färbung angeschlossen. Keime, die bei diesen Tests bereits Salmonellen-untypische Reaktionen zeigten, wurden weder serologisch noch biochemisch weiter bestätigt.

Serologisch

Die Anwesenheit der Salmonellen-typischen O-Antigene wurde durch Polyvalent I Serum sowie Polyvalent II Serum mittels Objektträgerschnellagglutination überprüft. Um Selbstagglutination auszuschließen, wurde jeder Keim parallel in NaCl-Lösung suspendiert und auf Agglutinatbildung hin kontrolliert.

Biochemisch

Für die biochemische Bestätigung wurde das kommerziell erhältliche BBL Crystal[®] System (Enteric/Nonfermenter) von Becton Dickinson verwendet.

Die einzelnen Arbeitsschritte der Referenzmethode fasst Abbildung 2 graphisch zusammen.

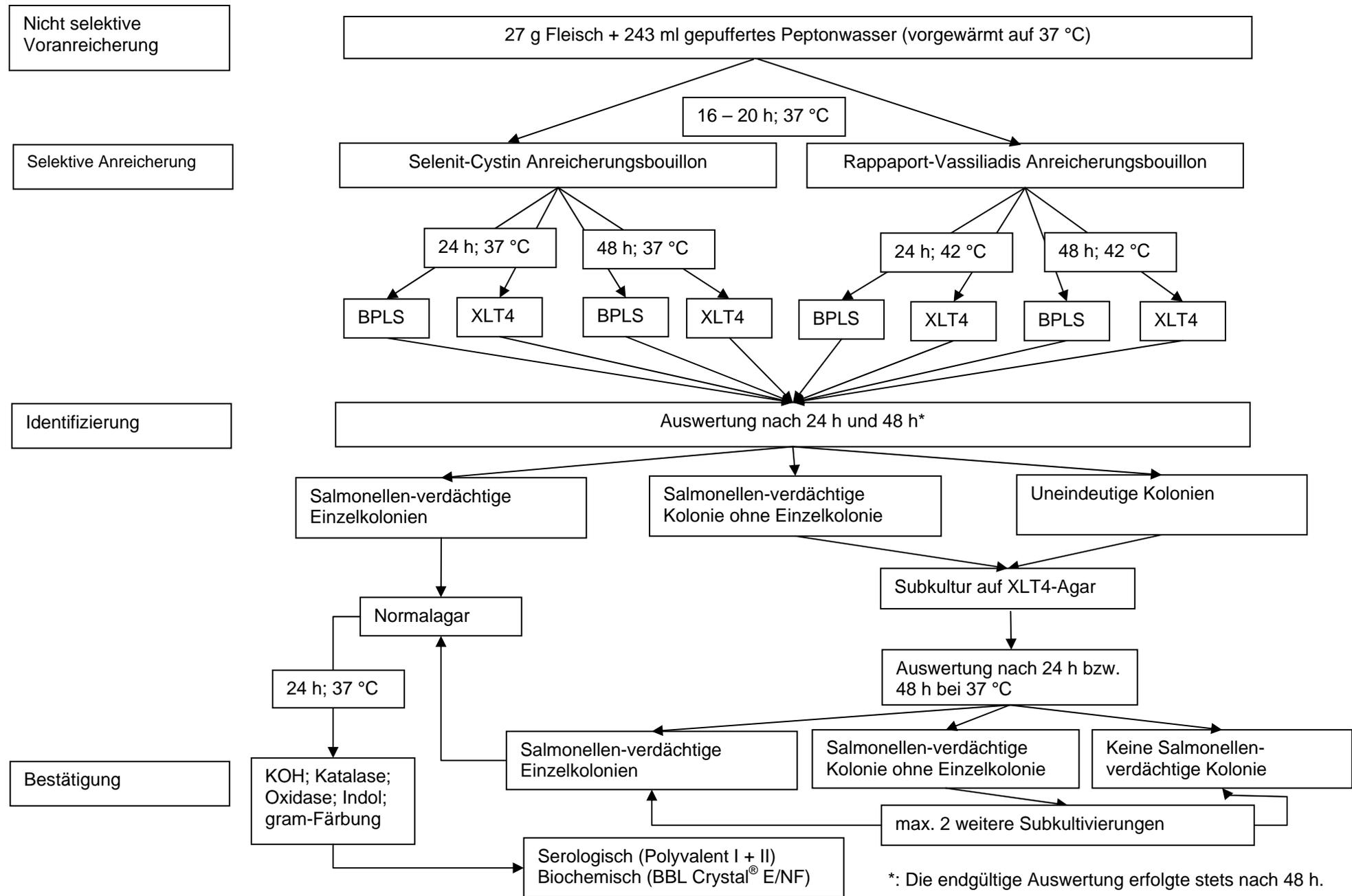


Abbildung 2: Graphische Darstellung der Methodenschritte des amtlichen Verfahrens nach §35 LMBG.

2.5.1.2 Methodenschritte des IMS-real-time PCR-Verfahrens

Aufgrund der Vorversuche ergab sich die in Tabelle 14 dargestellte Versuchsdurchführung für IMS-real-time PCR-Methode.

Tabelle 14: Methodenschritte der IMS-real-time PCR-Methode zur Validierung anhand des amtlichen Verfahrens nach §35 LMBG.

Methodenschritt	Durchführung
Einwaage	27 g Schweinefleisch + 243 ml gepuffertes Peptonwasser (vorgewärmt auf 37 °C)
Zerkleinerung	Zerkleinerung mittels Ultra-Turrax auf Regelstufe 7
Artefizielle Kontamination ¹	1 KBE/25 g 10 KBE/25 g 100 KBE/25 g
Inkubation	6 h bei 37 °C als Schüttelkultur (150 Upm)
Art der Probenbearbeitung	Entnahme eines 20 ml Aliquots; Zentrifugation für je 2 min bei 91 x g
Entnahme des Aliquots	Jeweils Entnahme eines 10 ml Aliquots
IMS	80 µl Dynabeads [®] anti-Salmonella Inkubation bei 250 Upm für 10 min auf dem Horizontalschüttler Separation der Beads mit dem Magneten MPC-L [®] : 10 min Drehbewegung mit Seitenwechsel, 5 min ruhen lassen 3 x Waschen mit je 9 ml 0,05 % PBS-Tween 20: je 2 min Drehbewegung mit Seitenwechsel, 3 min ruhen lassen
DNA-Extraktion	Beads in steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß überführen Zugabe von 30 µl Lysispuffer Zugabe von 2 µl Proteinase K (20 mg/ml) Inkubation 1 h bei 56 °C Kochen für 10 min bei 100 °C Abkühlung bei 4 °C
DNA-Aufreinigung	Aufreinigung der PCR-Probe aus dem DNA-Extraktionsschritt mittels High Pure PCR Product Purification Kit
PCR	Real-time PCR

¹: S. Enteritidis DSM 9898 wurde als Testkeim verwendet. Vor Einstellung der angegebenen Keimgehalte wurde die Keimsuspension 24 h bei 37 °C inkubiert und anschließend 12 h bei 4 °C einem Kältestreß ausgesetzt.

2.5.2 Darstellung der Validierungsparameter beider Methoden

Im folgenden Kapitel der Arbeit werden die Validierungsparameter zur Bewertung der IMS-real-time PCR-Methode im Vergleich zum kulturellen Referenzverfahren nach §35 LMBG zusammengefasst. Die Darstellungen nehmen ihren Bezug auf Ausführungen von HÜBNER ET AL (2002) zur Bewertung mikrobiologischer Prüfverfahren.

Allgemein folgt die Auswertung der Leistungsgrößen dem Schema aus Tabelle 15.

Tabelle 15: Auswertungsschema für qualitative mikrobiologische Nachweisverfahren (HÜBNER ET AL., 2002).

		Zu validierende Methode		Summe
		+	-	
Referenzmethode oder	+	a	b	a+b
reelle Kontamination	-	c	d	c+d
Summe		a+c	b+d	a+b+c+d=n

a = Anzahl der bei beiden Methoden positiven Analysenergebnisse

b = Anzahl der falsch negativen Analysenergebnisse

c = Anzahl der falsch positiven Analysenergebnisse

d = Anzahl der bei beiden Methoden negativen Analysenergebnisse

Nachfolgend werden die zur Bewertung hinzugezogenen Validierungsparameter definiert und formelmäßig dargestellt. Die Definitionen sind der Arbeit von HÜBNER ET AL. (2002) entnommen.

Die Spezifität wird mit $d/(c+d) \cdot 100$ berechnet und drückt aus, wieviel % aller sicher negativen Proben als negativ erkannt wurden. Die Sensitivität der zu validierenden Methode wird als $a/(a+b) \cdot 100$ dargestellt. Sie gibt an, wieviel aller sicher positiven Proben als positiv erkannt wurden. Die relative Richtigkeit gibt bei mikrobiologischen Prüfverfahren den Grad der Übereinstimmung der Resultate, welche mit der zu validierenden Methode und der Referenzmethode an gleichen Proben erhalten wurde. Sie berechnet sich aus $(a+d)/n \cdot 100$. Die Nachweisgrenze (limit of detection) stellt die kleinste Konzentration an Mikroorganismen dar, bei der alle Resultate positiv ausfallen. Die Anzahl der Resultate mit positiver Abweichung (Falsch-Positiv-Rate) errechnen sich nach $c/(c+d) \cdot 100$. Die Falsch-Negativ-Rate, die die Anzahl der Resultate mit negativer Abweichung angibt, wird mit $b/(a+b) \cdot 100$ berechnet. Die statistische Übereinstimmung zweier zu vergleichender Prüfverfahren wird mit dem Konkordanzindex κ ausgedrückt. Dieser errechnet sich nach der Formel $\kappa = 2 \cdot (ad - bc) / ((a+c)(c+d) + (a+b)(b+d))$. Die Übereinstimmung zweier Prüfverfahren wird als genügend bezeichnet, wenn $\kappa \geq 0,81$ ist.

2.5.3 Unterscheidung einer Kontamination von lebenden und toten Salmonellen mittels IMS-real-time PCR aus Fleisch

Mit dieser Versuchsanordnung sollte geprüft werden, ob durch IMS und einem sechsstündigen Voranreicherungsschritt eine Unterscheidung von lebenden und toten *S. Enteritidis* aus der Probenmatrix Fleisch möglich ist. Zu diesem Zweck wurden Fleischproben mit aufsteigenden Keimgehalten (ca. 1 KBE/25 g; 10 KBE/25 g; 100 KBE/25 g) von lebenden und hitzeinaktivierten (96 °C; 10 min) *S. Enteritidis* DSM 9898 artefiziell kontaminiert. Zur Kontrol-

le der vollständigen Inaktivierung der Zellen wurden 0,1 ml der jeweiligen Verdünnungsstufe auf Normalagar und XLT4-Agar im Spatelverfahren aufgetragen, 24 h bzw. 48 h bei 37 °C inkubiert und jeweils auf Kolonienwachstum hin untersucht. Alle Keimgehaltsstufen wurden im Doppelansatz angelegt. Außerdem wurde eine Negativkontrolle mitgeführt. Die Versuche wurden dreimal durchgeführt. Direkt nach der artefiziellen Kontamination wurde ein Aliquot entnommen und wie in Tabelle 16 dargestellt, bearbeitet. Nach einer sechsständigen Voranreicherungszeit bei 37 °C wurde ein weiteres Aliquot für die IMS-real-time PCR-Methode entnommen. Die einzelnen Methodenschritte für die Probenbearbeitung vor und nach dem Anreicherungs-schritt sind Tabelle 16 zu entnehmen. Die real-time PCR wurde nach den unter 2.2 angegebenen Einstellungen durchgeführt.

Tabelle 16: Methodenschritte zur Unterscheidung einer Kontamination von lebenden und toten *Salmonella* spp. mittels IMS-real-time PCR.

Methodenschritte	Durchführung vor der Anreicherung	Durchführung nach der Anreicherung
Einwaage	27 g Schweinefleisch + 243 ml gepuffertes Peptonwasser (vorgewärmt auf 37 °C)	
Zerkleinerung	Zerkleinerung mittels Ultra-Turrax auf Regelstufe 7	
Artefizielle Kontamination	1 KBE/25 g 10 KBE/25 g 100 KBE/25 g	
Inkubation		6 h bei 37 °C als Schüttelkultur (150 Upm)
Probenbearbeitung	Entnahme eines 20 ml Aliquots; Zentrifugation für je 2 min bei 91 x g	
Entnahme des Aliquots	Entnahme eines 10 ml Aliquots	
IMS	80 µl Dynabeads® anti- <i>Salmonella</i> Inkubation bei 250 Upm für 10 min auf dem Horizontalschüttler Separation der Beads mit dem Magneten MPC-L®: 10 min Drehbewegung mit Seitenwechsel, 5 min ruhen lassen 3 x Waschen mit je 9 ml 0,05 % PBS-Tween 20: je 2 min Drehbewegung mit Seitenwechsel, 3 min ruhen lassen	

Fortsetzung Tabelle 16: Methodenschritte zur Unterscheidung einer Kontamination von lebenden und toten *Salmonella* spp. mittels IMS-real-time PCR.

Methodenschritte	Durchführung vor der Anreicherung	Durchführung nach der Anreicherung
DNA-Extraktion	Beads in steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß überführen Zugabe von 30 µl Lysispuffer Zugabe von 2 µl Proteinase K (20 mg/ml) Inkubation 1 h bei 56 °C Kochen für 10 min bei 100 °C Abkühlung bei 4 °C	
DNA-Aufreinigung	Aufreinigung der PCR-Probe aus dem DNA-Extraktionsschritt mittels High Pure PCR Product Purification Kit	
PCR	Real-time PCR	

2.6 Überprüfung der Leistungsfähigkeit der IMS-real-time PCR-Methode anhand nativ kontaminierter Feldproben – ein Vergleich mit dem amtlichen Verfahren nach §35 LMBG

Natürlich kontaminierte Fleischproben wurden parallel mit dem kulturellen Referenzverfahren nach §35 LMBG und der IMS-real-time PCR-Methode untersucht. In diesem Vergleich mit dem amtlichen Verfahren soll die Leistungsfähigkeit und Durchführbarkeit der Schnellmethode überprüft werden.

2.6.1 Methodisches Vorgehen

Im nachfolgenden Punkt werden die einzelnen Verfahrensschritte zur Untersuchung natürlich kontaminierter Fleischproben dargestellt. Pro Ansatz wurden eine Negativ- und eine Positivkontrolle mitgeführt. Als Testkeim für die Positivkontrolle diente *S. Enteritidis* DSM 9898. Der Keim wurde, anders als in der Validierung, keinem Kältestreß ausgesetzt. Auch im DNA-Aufreinigungsschritt und der PCR wurde jeweils ein Leerwert mitgeführt. Ein Ansatz umfasste 10 Proben sowie jeweils eine Negativ- und Positivkontrolle. Bei den Matrices Schwein und Geflügel wurden jeweils von der Gesamteinwaage (27 g) 2/3 Schwarte bzw. Haut und 1/3 Fleisch eingewogen. Nach einer sechsstündigen Voranreicherungszeit bei 37 °C wurde ein Aliquot für die IMS-real-time PCR-Methode entnommen. Die Einstellungen für die real-time PCR entsprechen den Angaben von 2.2. Eine Übersicht über die Methodenschritte der IMS-real-time PCR-Methode im einzelnen gibt Tabelle 17.

Tabelle 17: Methodenschritte des IMS-real-time PCR-Verfahrens zur Untersuchung von nativ kontaminierten Fleischproben.

Methodenschritt	Durchführung
Einwaage	27 g Fleisch + 243 ml gepuffertes Peptonwasser (vorgewärmt auf 37 °C)
Zerkleinerung	Zerkleinerung mittels Ultra-Turrax auf Regelstufe 7
Inkubation	6 h bei 37 °C als Schüttelkultur (150 Upm)
Art der Probenbearbeitung	Entnahme eines 20 ml Aliquots; Zentrifugation für je 2 min bei 91 x g
Entnahme des Aliquots	Jeweils Entnahme eines 10 ml Aliquots
IMS	80 µl Dynabeads® anti- <i>Salmonella</i> Inkubation bei 250 Upm für 10 min auf dem Horizontalschüttler Separation der Beads mit dem Magneten MPC-L®: 10 min Drehbewegung mit Seitenwechsel, 5 min ruhen lassen 3 x Waschen mit je 9 ml 0,05 % PBS-Tween 20: je 2 min Drehbewegung mit Seitenwechsel, 3 min ruhen lassen
DNA-Extraktion	Beads in steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß überführen Zugabe von 30 µl Lysispuffer Zugabe von 2 µl Proteinase K (20 mg/ml) Inkubation 1 h bei 56 °C Kochen für 10 min bei 100 °C Abkühlung bei 4 °C
DNA-Aufreinigung	Aufreinigung der PCR-Probe aus dem DNA-Extraktionsschritt mittels High Pure PCR Product Purification Kit
PCR	Real-time PCR

Die Proben wurden nach der DNA-Extraktion bei -20 °C eingefroren und nach Abschluß der Probennahme aufgereinigt. Anschließend folgte jeweils die PCR-Analyse. Die PCR-Produkte ausgewählter, aus den nativ kontaminierten Feldproben isolierten *Salmonella* spp. wurden an die Firma Sequiserve GmbH zur Sequenzierung eingesandt. Die Basenabfolge der Proben wurde mit den sequenzierten Nukleotiden der Gendatenbank BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) verglichen.

Nach 16-20 h bei 37 °C wurde die gleiche Voranreicherung für die Referenzmethode nach §35 LMBG weiterverwendet. Das heißt, beide Methoden wurden, wie in der Validierung auch, aus einem Ansatz bedient. Dadurch wurden gleiche Versuchsbedingungen für beide Verfahren erreicht und ein exakter Methodenvergleich ermöglicht. Das weitere methodische Vorgehen für das kulturelle Verfahren entspricht den Angaben unter 2.5.1.1. Für die Feldproben wurden 3 Salmonellen-verdächtigen Isolate je Selektivagarplatte und für die Positivkontrolle 1 Salmonellen-verdächtigtes Isolat je Selektivagarplatte serologisch und biochemisch bestätigt. Die aus den Feldproben isolierten Keime wurden bis zur serologischen Typisierung bei -70 °C kryokonserviert. Die serologische Typisierung der als *Salmonella* spp. bestätigten Keime wurde vom Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) in Berlin durchgeführt.

Wie bereits erwähnt, wurden je Ansatz eine Positiv- und eine Negativkontrolle mitgeführt. Bei der IMS-real-time PCR-Methode wurde während des DNA-Aufreinigungsschrittes ein Leer-

wert mitgeführt, der nur mit den Reagenzien des kommerziellen Kits behandelt wurde. Für den DNA-Nachweis wurde ebenfalls ein Leerwert, der die PCR-Reagenzien enthielt und dem statt der Probe Wasser zugegeben wurde, mitgeführt. Das heißt, für die IMS-real-time PCR-Methode wurde zu jedem Verfahrensschritt eine Negativkontrolle mitgeführt.

2.6.2 Vergleich beider Methoden

Die statistische Auswertung der Ergebnisse und der Vergleich der IMS-real-time PCR-Methode mit dem kulturellen Referenzverfahren erfolgte nach den Angaben von 2.5.2.

D Ergebnisse

1 Untersuchungen zum Wachstumsverhalten von *S. Enteritidis* DSM 9898

1.1 Untersuchungen zur Wachstumskinetik und –stimulation von *S. Enteritidis* DSM 9898

Durch die Untersuchung der Wachstumskinetik sollte geprüft werden, ob und inwieweit die lag-Phase und dadurch die Gesamtversuchsdauer durch Wachstumsstimulantien reduziert werden kann. Die Tests zum Wachstumsverhalten erfolgten auf kulturellem Weg (Oberflächenspatelverfahren) und durch die Bestimmung des DNA-Gehaltes (real-time PCR). Betrachtet man die unsupplementierten Proben und damit das Wachstumsverhalten von *S. Enteritidis* ohne Zugabe von wachstumsfördernden Substanzen, zeigt sich bei der Auswertung des kulturellen Verfahrens, dass der Keim die lag-Phase nach einer Inkubationszeit von 2,5 h überwunden hat (Abbildung 3). Eine Inkubationszeit von 4 h ermöglicht es den Bakterien, die exponentielle Phase zu erreichen. Dadurch kann die Versuchszeit auf ein Minimum reduziert werden.

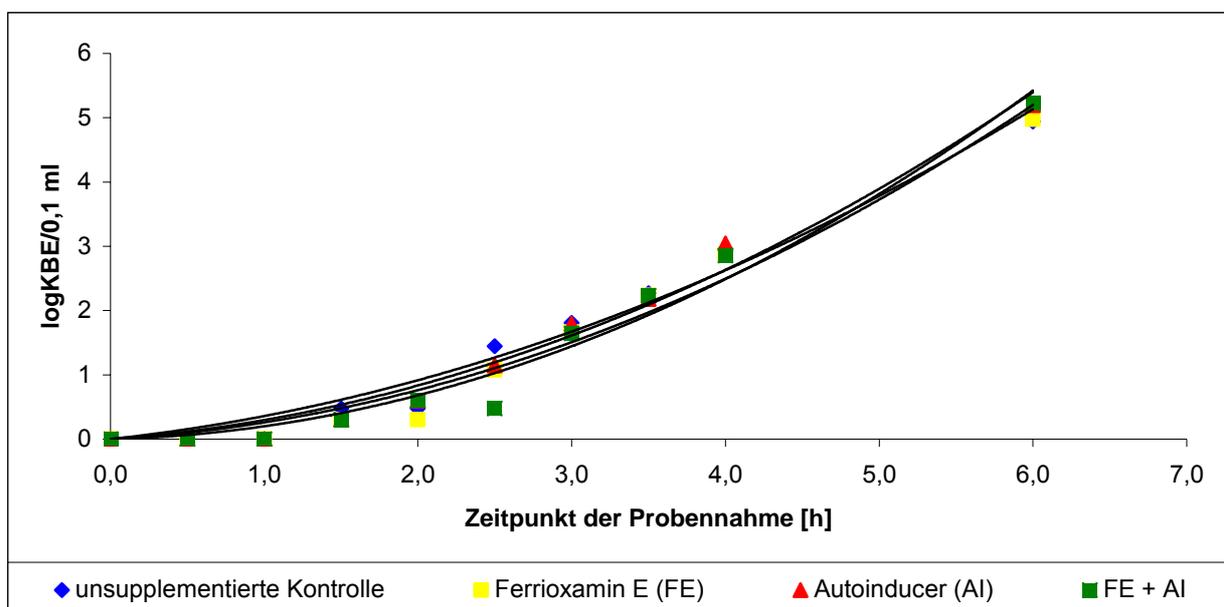


Abbildung 3: Wachstumskinetik von *S. Enteritidis* DSM 9898 mit und ohne Wachstumsstimulierung (MW; n = 4).

Statistisch wurden die Werte nach Kolonieauszählung mit SigmaStat, Version 3.1 ausgewertet. Zunächst wurden sie mittels Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung getestet. Dabei ergab sich, dass sowohl die un-supplementierte Kontrolle als auch die supplementierten Proben nicht normalverteilt ($\alpha = 0,001$) waren. Aufgrund dieses Ergebnisses wurde mittels Mann-Whitney-Rangsummen-Test geprüft, ob ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Werten der supplementierten Proben im Vergleich zur nicht supplementierten Kontrolle besteht. Auf einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ besteht kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen. Folglich konnte durch die kulturelle Methode kein Unterschied im Wachstumsverhalten zwischen den supplementierten und un-supplementierten Proben nachgewiesen werden. Deshalb sollte im weiteren über die Bestimmung des DNA-Gehaltes festgestellt werden, ob ein wachstumsstimulierender Effekt beobachtet werden kann. Nach einer Voranreicherungszeit von 4 h sowie 6 h wurden deshalb parallel zum kulturellen Verfahren die Proben für den PCR-Nachweis gezogen. Die Ergebnisse in Tabelle 18 zeigen, dass auch auf DNA-Ebene beim Vergleich der un-supplementierten Kontrolle mit den supplementierten Proben keine Verschiebung der Crossing Points nach links und damit eine Zunahme des DNA-Gehalts festgestellt werden konnte. Die hohe Standardabweichung der un-supplementierten Probe nach 4 h lässt sich durch Effekte in der Keimvermehrung erklären. Durch die Sensitivität des Nachweisverfahrens der real-time PCR können diese Schwankungen detektiert werden. Die späten Crossing Points der mit Ferrioxamin E + Autoinducer supplementierten Proben nach 4 h (45,89) sowie der Ferrioxamin E supplementierten Proben nach 6 h (44,33) lassen auf eine mögliche Hemmung des Keimwachstums schließen.

Tabelle 18: Crossing Points nach Supplementierung des Voranreicherungsmediums mit Ferrioxamin E und/oder eines „enterobacterial Autoinducer of Growth“.

Zeitpunkt der Probennahme [h]	Crossing Point [Zyklen]; MW (STAW); n = 2			
	Ferrioxamin E	Autoinducer	Ferrioxamin E + Autoinducer	Nicht supplementiert
4,0	35,81 (0,37)	36,41 (0,08)	45,89 (2,92)	38,79 (6,43)
6,0	44,33 (1,77)	37,81 (0,28)	27,44 (1,07)	30,09 (2,11)

Zusammenfassend lässt sich aus den Untersuchungen zur Wachstumskinetik und –stimulierung festhalten, dass eine Reduktion der Voranreicherungszeit durch eine Verkürzung der lag-Phase von *S. Enteritidis* durch die Supplementierung des Voranreicherungsmediums aufgrund der Ergebnisse (Abbildung 3 und Tabelle 18) nicht möglich zu sein scheint. Die weiteren Versuche wurden deshalb ohne Supplementierung durchgeführt.

Aus Tabelle 18 lässt sich noch ein weiteres wichtiges Ergebnis ableiten. Das Voranreicherungsmedium wurde für die Untersuchungen mit 10 KBE/ml des Referenzkeims inokuliert. Diese geringe Keimzahl wurde deshalb gewählt, um festzustellen, ob nach einer relativ kurzen Anreicherungszeit (4 h bzw. 6 h) genügend DNA zum Nachweis zur Verfügung steht. Der Crossing Point der un-supplementierten Proben erscheint nach einer Voranreicherungszeit von 6 h mit 30,09 um 8,69 Zyklen früher als nach 4 h (38,78) (Tabelle 18). Durch die Verschiebung des Crossing Points nach links wird eine größere DNA-Menge angezeigt, die sich durch die Verlängerung der Voranreicherungszeit und der sich daraus ergebenden Zunahme des Keimgehalts erklären lässt. Sowohl nach 4 h als auch nach 6 h ist somit bei der un-supplementierten Kontrolle so viel DNA vorhanden, dass ein sensitiver Nachweis aus Reinkulturen gelingt. Beachtet man jedoch, dass beim Nachweis aus Fleisch Matrixeffekte und ein gewisser Verlust durch die Immunomagnetische Separation vorliegen, werden in den weiteren Vorversuchen zur Methodenoptimierung beide Voranreicherungszeiten (4 h und 6 h) untersucht.

1.2 Untersuchungen zur Unterscheidung von lebenden und toten *S. Enteritidis* DSM 9898

Im Folgenden werden die Ergebnisse zweier Möglichkeiten, lebende und tote *S. Enteritidis* DSM 9898 über real-time PCR zu unterscheiden, dargestellt.

a) Immunomagnetische Separation (IMS)

Mit Hilfe dieser Versuchsanordnung wurde geprüft, ob eine Unterscheidung von lebenden und toten *S. Enteritidis* über IMS und anschließender real-time PCR möglich ist. Durch Hitzeinwirkung (96 °C; 10 min) sollte die Oberflächenstruktur der Bakterien geschädigt werden, so dass die Ausbildung eines Antigen-Antikörper-Komplexes nicht mehr möglich ist. Die Mittelwerte der Crossing Points verschiedener Keimkonzentrationen an lebenden und toten Zellen fasst Tabelle 19 zusammen.

Tabelle 19: Crossing Points lebender und toter *S. Enteritidis* nach IMS.

Keimkonzentration [KBE/ml]	Crossing Points [Zyklen]; MW (STAW); n = 3	
	lebend	tot
10 ⁸	23,92 (0,70)	33,01 (10,91)
10 ⁵	28,31 (0,85)	30,96 (0,78)
10 ²	38,99 (0,36)	36,68 (9,75)

Daraus geht hervor, dass mittels IMS unabhängig von der Keimkonzentration sowohl lebende als auch hitzeinaktivierte *S. Enteritidis* detektiert werden. Bei einer Konzentration von 10⁸ KBE/ml erscheint der Crossing Point der toten Zellen um 9,09 Zyklen später als bei den lebenden Zellen. Für die Konzentration 10⁵ KBE/ml zeigen die lebenden Zellen einen um ca. 2 Zyklen früheren Crossing Point als die toten Zellen. Umgekehrt verhält es sich bei einer Keimkonzentration von 10² KBE/ml. Hier erscheint der Crossing Point der lebenden Zellen um ca. 2 Zyklen später als für die toten Zellen. Bei einer Keimkonzentration von 10⁸ KBE/ml und 10² KBE/ml ergibt sich für die toten Bakterien auch eine relativ hohe Standardabweichung von ± 10,91 bzw. ± 9,75 Zyklen. Dies deutet auf Schwankungen im DNA-Gehalt der Proben hin. Ein möglicher Erklärungsansatz geht dahin, dass durch die Hitzeeinwirkung die Zellen lysiert werden, wodurch die DNA frei wird und durch die Waschschriffe während der IMS abgospült wird und somit für den Nachweis mittels PCR nicht mehr zur Verfügung steht. Die durch Oberflächenspatelverfahren auf Normalagar aufgebraachte Keimsuspensionen der hitzeinaktivierten Bakterien zeigten nach 48-stündiger Inkubation bei 37 °C kein Wachstum an. Die Oberflächenstruktur des Testkeims wird durch die Hitzeinaktivierung offensichtlich nicht in dem Maße geschädigt, dass eine Antigen-Antikörper-Bindung unterbunden wird. Das Ergebnis aus Tabelle 19 zeigt, dass eine Unterscheidung von lebenden und toten *S. Enteritidis* durch IMS alleine (ohne Voranreicherungsschritt) nicht möglich ist.

b) Quantitative real-time PCR (qPCR)

In diesem Versuch wurde die Möglichkeit einer Unterscheidung von lebenden und toten *S. Enteritidis* mittels real-time PCR getestet. Zu diesem Zweck wurden die DNA-Gehalte abgestufter Keimgehalte lebender und toter *S. Enteritidis* vor und nach einem Voranreicherungsschritt bestimmt. Die arithmetischen Mittelwerte der Crossing Points aus dieser Messreihe stellt Tabelle 20 zusammen.

Tabelle 20: Arithmetische Mittelwerte der Crossing Points nach DNA-Extraktion von lebenden und toten *S. Enteritidis* vor und nach Anreicherung (4 h; 37 °C; n = 5).

Art der Probenbearbeitung	Keimkonzentration [KBE/ml]					
	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ¹	10 ⁰
	Crossing Points [Zyklen]; MW (STAW), n = 5					
lebend/ohne Anreicherung	29,92 (2,22)	34,33 (2,32)	37,75 (1,59)	40,73 (3,06)	41,47 (1,73)	46,77 (6,35)
tot/ohne Anreicherung	29,71 (0,98)	33,58 (1,40)	37,04 (1,09)	39,63 (1,45)	42,19 (2,16)	41,91 (4,86)
lebend/mit Anreicherung	18,55 (0,59)	20,57 (0,36)	24,05 (1,02)	29,32 (2,24)	33,55 (1,97)	37,26 (2,49)
tot/mit Anreicherung	29,42 (1,67)	33,41 (1,16)	36,87 (1,05)	38,29 (1,01)	41,25 (1,05)	41,65 (2,48)

Daraus ist ersichtlich, dass die Crossing Points der nicht erhitzten und der erhitzten Proben vor und nach der Anreicherung zwischen 29 (10⁵ KBE/ml) und 46 (10⁰ KBE/ml) lagen. Nach dem Voranreicherungsschritt sanken die Crossing Points der nicht erhitzten Proben auf 18,5 (10⁵ KBE/ml) bis 37 (10⁰ KBE/ml) ab. Durch die mit der Anreicherung verbundene Zellvermehrung und daraus resultierende Zunahme der DNA-Menge verschiebt sich der Crossing Point im Mittel um ungefähr 10 Zyklen nach links. Die Crossing Points der inaktivierten Proben blieben nach der Voranreicherung zwischen 29 (10⁵ KBE/ml) und 41 (10⁰ KBE/ml). Weil tote Zellen nicht mehr vermehrungsfähig sind, kann auch die Zellmasse und damit die DNA-Menge durch die Anreicherung nicht zunehmen. Aus diesem Grund nehmen die Crossing Points nach der Anreicherung toter Zellen die Ausgangswerte von vor dem Anreicherungsschritt an.

In einem nächsten Schritt wurde die Differenz der Crossing Points vor und nach der Anreicherung gebildet. Da die Differenz bei lebenden Zellen durch die Verschiebung der Crossing Points nach links größer ausfallen wird als bei den toten Zellen, kann über diese Information eine Entscheidung darüber gefällt werden, ob es sich in der betreffenden Probe um eine lebende oder tote *S. Enteritidis* gehandelt hat. Die Differenz der Crossing Points der Werte aus Tabelle 20 vor und nach der Anreicherung stellt Tabelle 21 dar.

Tabelle 21: Differenz der Crossing Points lebender und toter *S. Enteritidis* vor und nach Anreicherung (4 h; 37 °C; n = 5).

Lebensfähigkeit	Keimkonzentration [KBE/ml]					
	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ¹	10 ⁰
Differenz der Crossing Points [Zyklen]; MW (STAW), n = 5						
lebend	11,37 (2,71)	13,76 (2,50)	13,70 (1,56)	11,41 (3,79)	7,92 (2,36)	8,40 (8,76)
tot	1,12 (1,19)	0,19 (0,34)	0,23 (0,21)	1,38 (1,39)	2,09 (1,61)	2,18 (1,94)

Erwartungsgemäß sind die Differenzen der Crossing Points der lebenden Zellen (zwischen 13 und 8) höher als der toten Keime (zwischen 0,2 und 2) (Tabelle 21). Mit abnehmendem Keimgehalt sinkt bei den lebenden Zellen auch die Höhe der Differenz. So beträgt der Unterschied zwischen den Crossing Points vor und nach der Anreicherung bei einer Keimzahl von 10⁵ KBE/ml 11 und bei einer Konzentration von 10¹ KBE/ml nur noch knapp 8. Es ist auch erkennbar, dass die Standardabweichung bei abnehmendem Keimgehalt zunimmt. Dies lässt sich dadurch erklären, dass sich Effekte und Schwankungen in der Keimvermehrung bei den niedrigen Keimgehalten in höherem Maße ausprägen als bei den hohen Konzentrationen. Die Differenzen der Crossing Points der toten Zellen liegen aufgrund ausbleibender Vermehrung und der damit verbundenen niedrigeren Zellzahl und DNA-Menge deutlich unter denen der lebenden Zellen. Auffällig sind auch die hohen Werte für die Standardabweichung, die sich über das gesamte getestete Keimgehaltsspektrum ziehen. Sie weisen auf Schwankungen im DNA-Gehalt der gemessenen Proben hin. Dieser Sachverhalt kann dadurch erklärt werden, dass durch die Hitzeeinwirkung ein Teil der Zellen lysiert wird und durch diesen Vorgang die DNA aus den Zellen frei wird. Daraus resultieren die Schwankungen bei wiederholenden Messungen, die durch die hohe Standardabweichung zum Ausdruck kommen. Die statistische Auswertung der Differenzen der Crossing Points wurde mit SigmaStat, Version 3.1 durchgeführt. Zunächst wurden die Werte der Differenzen der Crossing Points vor und nach der Anreicherung lebender und toter Zellen auf Normalverteilung geprüft. Auf einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,001$ sind die Werte nicht normalverteilt (Kolmogorov-Smirnov-Test). Aufgrund dieses Ergebnisses wurde zur Feststellung eines Unterschiedes zwischen den Differenzen der Crossing Points lebender und toter Zellen der Mann-Whitney-Rangsummen-Test verwendet. Danach besteht bei den Keimgehalten von 10⁵ KBE/ml bis 10¹ KBE/ml ein signifikanter Unterschied ($\alpha = 0,05$) zwischen den Werten der Differenz lebender Zellen zu den Werten toter Keime nach einem Anreicherungsschritt von 4 h bei 37 °C. Kein signifikanter Unterschied ($\alpha = 0,05$) ist bei einer Konzentration von 10⁰ KBE/ml gegeben.

Aufgrund dieses Ergebnisses kann man über die Höhe der Differenz der Crossing Points vor und nach der Anreicherung bis zu einem Keimgehalt von 10^1 KBE/ml und unter den gegebenen Bedingungen eine Aussage darüber machen, ob es sich bei den untersuchten Salmonellen um lebende oder tote Zellen gehandelt hat.

Für die Untersuchung von Mischverhältnissen aus lebenden und toten *S. Enteritidis* wurde das Anreicherungsmedium mit 100 KBE/ml des Referenzkeims artefiziell kontaminiert. Die Crossing Points nach DNA-Extraktion fasst Tabelle 22 zusammen.

Tabelle 22: Arithmetische Mittelwerte der Crossing Points nach DNA-Extraktion unterschiedlicher Mischverhältnisse von lebenden und toten *S. Enteritidis* vor und nach Anreicherung (4 h; 37 °C; n = 3).

Mischverhältnisse, bezogen auf 100 KBE/ml	Crossing Points [Zyklen]; MW (STAW); n = 3	
	vor Anreicherung	nach Anreicherung
100 % tot	41,52 (0,6)	42,81 (2,5)
75 % tot; 25 % lebend	41,83 (1,5)	35,79 (0,6)
50 % tot; 50 % lebend	42,77 (1,4)	33,16 (1,6)
25 % tot; 75 % lebend	45,17 (4,7)	32,11 (0,8)
100 % lebend	41,05 (1,8)	31,49 (0,9)

Aus Tabelle 22 geht hervor, dass die Crossing Points der Mischverhältnisse, unabhängig von der Zahl an inaktivierten Zellen, vor der Anreicherung bei ungefähr 42 lagen. Nach dem Anreicherungsschritt blieben die Crossing Points der vollständig inaktivierten Zellen aufgrund ausbleibender Vermehrung, wie erwartet, bei 42. Mit zunehmender Zahl an lebenden Zellen und der damit verbundenen Zunahme der DNA-Menge sanken die Crossing Points von 36 (75 % tot/25 % lebend) auf 31 (100 % lebend). Abbildung 4 stellt die Verschiebung der Crossing Points graphisch dar.

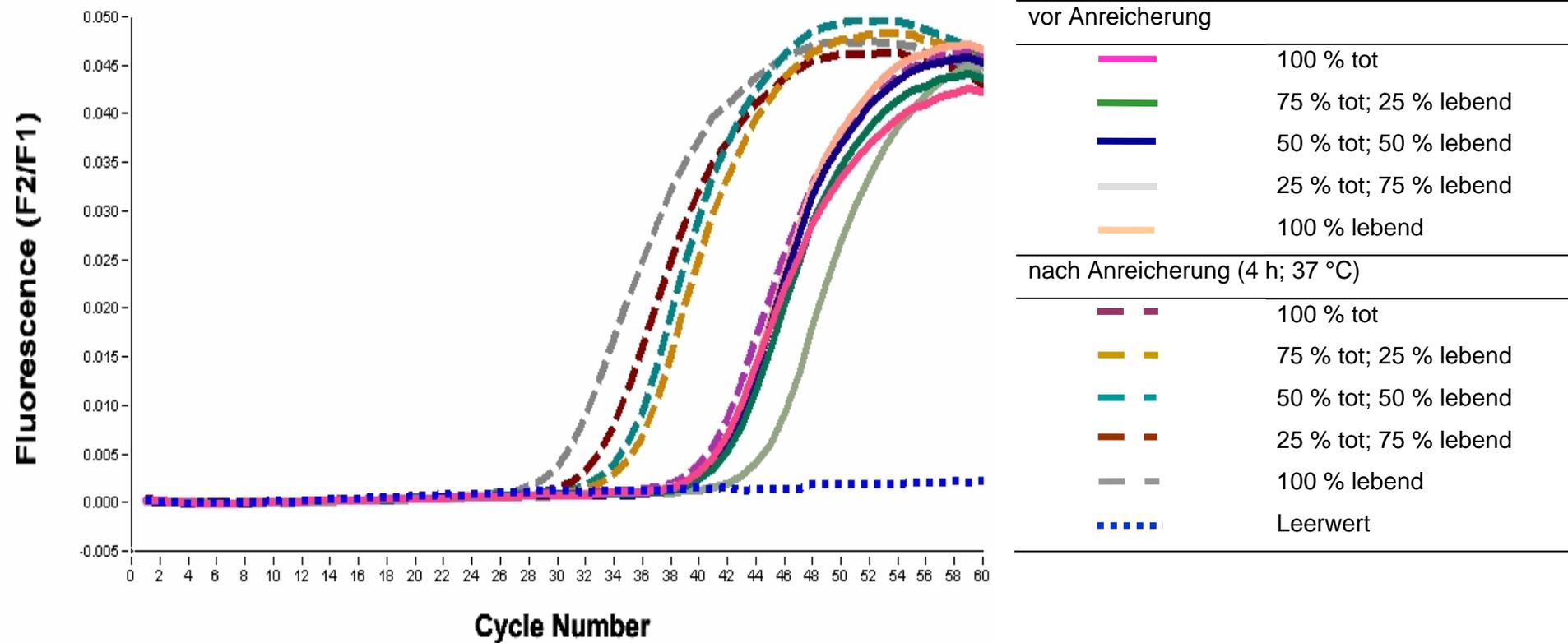


Abbildung 4: Amplifikationskurven verschiedener Mischverhältnisse lebender und toter *S. Enteritidis* vor und nach einem Anreicherungsschritt (4 h; 37 °C).

Die Differenz der Crossing Points unterschiedlicher Mischverhältnisse aus lebenden und toten *S. Enteritidis* vor und nach Anreicherung stellt Tabelle 23 dar.

Tabelle 23: Differenz der Crossing Points nach DNA-Extraktion unterschiedlicher Mischverhältnisse von lebenden und toten *S. Enteritidis* vor und nach Anreicherung (4 h; 37 °C; n = 3).

Mischverhältnisse, bezogen auf 100 KBE/ml	Differenz der Crossing Points [Zyklen]; MW (STAW); n = 3
100 % tot	1,29 (2,2)
75 % tot; 25 % lebend	6,04 (1,3)
50 % tot; 50 % lebend	9,61 (2,3)
25 % tot; 75 % lebend	13,06 (4,2)
100 % lebend	9,56 (2,1)

Mit zunehmender Zahl an lebenden und damit vermehrungsfähigen Keimen steigt auch erwartungsgemäß die Differenz der Crossing Points. Im Vergleich zu den Untersuchungen an nur lebenden und toten Zellen treten die Unterschiede in den Differenzen weniger deutlich hervor. Die Entscheidung, ob es sich bei der vorliegenden Probe um eine lebende oder tote Zelle gehandelt hat, kann in diesem Fall nicht ohne weiteres gefällt werden.

Die durch Oberflächenspatelverfahren auf Normalagar aufgebrachten Keimsuspensionen der hitzeinaktivierten Bakterien zeigten nach 48-stündiger Inkubation bei 37 °C kein Wachstum an. Durch diese Kontrolle der Inaktivierung mit Hilfe von kulturellen Methoden (C/2.3.2) kann ausgeschlossen werden, dass die aus den toten Zellen nachgewiesene DNA von nicht vollständig abgetöteten Keimen stammte.

Aufgrund der Ergebnisse der Versuchsanordnung kann bis zu einem Keimgehalt von 10^5 KBE/ml bis 10^1 KBE/ml bei 100 % lebenden und 100 % toten Keimen aus Reinkultur über die Höhe der Differenz der Crossing Points vor und nach einem Anreicherungsschritt (4 h, 37 °C) eine Aussage über die Vermehrungsfähigkeit gemacht werden. Berücksichtigt man ein Mischverhältnis aus lebenden und toten Zellen bei einer Keimkonzentration von 100 KBE/ml (Reinkultur), so tritt der Unterschied in der Höhe der Differenz der Crossing Points nicht mehr in so hohem Maße hervor wie bei nur lebenden und toten Keimen. Bei einer graphischen Darstellung der Crossing Point ist die durch die Vermehrung bedingte Verschiebung des Crossing Points nach links jedoch deutlich sichtbar (Abbildung 4).

2 Anpassung und Optimierung der IMS-real-time PCR-Methode an die Vorgaben des amtlichen Verfahrens nach §35 LMBG

Die Ergebnisse der Abstimmung und Optimierung der bereits bestehenden IMS-real-time PCR-Methode an die Vorgaben des amtlichen Verfahrens werden im nachfolgenden Teil der Arbeit dargestellt.

2.1 Probenaufbereitung vor IMS

Zunächst wurde die Basismethode (25 g Einwaage) auf ihre Durchführbarkeit hin untersucht. Während der Vorversuche galt es weiterhin, die den Nachweis störenden groben Fasern, die sich nach der Homogenisierung der Fleischprobe bildeten, abzutrennen. Dieses Problem wurde durch die Schritte Filtration, Sedimentation, Zentrifugation und Zentrifugation in Verbindung mit der Stempelanwendung zu lösen versucht.

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Optimierungsschritte, die sich aus der Anpassung der IMS an das amtliche Verfahren ergaben, dargestellt.

Überprüfung der Basismethode

In einem ersten Versuch wurde die Einwaage der Basismethode von 5 g (+ 40 ml gepuffertes Peptonwasser) auf 25 g (+ 225 ml gepuffertes Peptonwasser) erhöht und dadurch auf die Anforderungen des amtlichen Verfahrens abgestimmt. Wie aus Tabelle 24 ersichtlich ist, führte eine alleinige Erhöhung der Einwaage nicht zu dem gewünschten Ergebnis eines Salmonellen-Nachweises. Auch eine Anhebung der Voranreicherungszeit von 4 h auf 6 h bei 37 °C zeigte ein unbefriedigendes Ergebnis. Der Grund für einen ausbleibenden DNA-Nachweis liegt in der Matrixbeschaffenheit begründet, da die Methode bei Proben ohne Fleischmatrix den Nachweis zumindest nach 6 h Voranreicherungszeit und einem Keimgehalt von 100 KBE/25 g ermöglicht (Tabelle 24).

Tabelle 24: Detektion abgestufter Konzentrationen von *S. Enteritidis* in Abhängigkeit verschiedener Voranreicherungszeiten.

Konzentration [KBE/25 g]	Crossing Points [Zyklus]		
	Ansatz 1	Ansatz 2	ξ (STAW)
Inkubationszeit: 4 h			
1	n.n.	n.n.	- (-)
10	49,82	n.n.	- (-)
100	n.n.	n.n.	- (-)
100 ¹	50,58	n.n.	- (-)
Inkubationszeit: 6 h			
1	n.n.	n.n.	- (-)
10	47,93	n.n.	- (-)
100	48,02	n.n.	- (-)
100 ¹	39,68	42,12	40,90 (1,73)

¹: Ansatz ohne Fleisch, nur mit gepuffertem Peptonwasser

n.n.: nicht nachweisbar

Deshalb wurden Separationsschritte zur Aufreinigung hinzugezogen, um störende Probenbestandteile auszuschalten. Für den Ausgleich von Matrixschwankungen wurde die Eignung von Filtration, Sedimentation und Zentrifugation als Aufreinigungsmöglichkeiten getestet.

Filtration

In einem nächsten Schritt wurde versucht, die groben Fasern über ein mit Gaze ausgelegten sterilen Sieb zu entfernen. Aus Tabelle 25 ist ersichtlich, dass der Crossing Point der filtrierten Proben im Mittel um ca. 1 Zyklus früher erscheint und dadurch einen höheren DNA-Gehalt anzeigen als die nicht filtrierten Proben. Auch die Standardabweichung der filtrierten Proben liegt mit 1,8 etwas niedriger als bei den nicht filtrierten Proben (2,1). Durch die Filtration sinken offensichtlich die Schwankungen während der Wiederholungen der Versuchsanordnung. Während der Versuchsdurchführung erwies sich die Handhabung des Filtrations-schrittes jedoch als technisch nicht möglich. Aus diesem Grund wurde nur eine vierstündige Inkubation getestet und im weiteren auf eine Filtration der Proben verzichtet.

Tabelle 25: Einfluß der Probenfiltration auf die Resultate der IMS-real-time PCR-Methode (Keimkonzentration 100 KBE/ml).

Art der Probenbearbeitung vor IMS	Crossing Points [Zyklus]; MW (STAW); n = 3
mit Filtration	38,73 (1,8)
ohne Filtration	40,04 (2,1)

Sedimentation

In den Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass ein Sedimentationsschritt keine Verbesserung im Hinblick auf eine Reduktion der groben Bestandteile erbringt. Selbst eine Erhöhung der Voranreicherungszeit von 4 h auf 6 h bei 37 °C brachte keine Verbesserung für den DNA-Nachweis.

Zentrifugation

Im weiteren Vorgehen wurde zur Aufreinigung ein Zentrifugationsschritt gewählt, um die groben Bestandteile und Fasern in das Sediment zu verschieben, zugleich aber die Bakterien nicht abzuzentrifugieren, sondern im Überstand zu halten. Vorausgegangene visuelle Beurteilungen des Überstandes haben gezeigt, dass im Vergleich zu einer 30-minütigen Sedimentation eine Zentrifugation bei 91 x g bzw. 136 x g für 2 min den Faseranteil im Überstand reduzieren. Zur Beurteilung der DNA-Gehalte im Überstand nach einem Zentrifugationsschritt wurden die Proben mittels PCR nach den Angaben von C/2.2 und C/2.4.1 untersucht. Die Ergebnisse der DNA-Detektion nach Zentrifugation im Vergleich zur Sedimentation bei einer Keimkonzentration von 100 KBE/25 g des Referenzkeims sind in Tabelle 26 dargestellt.

Tabelle 26: Crossing Points nach Zentrifugation im Vergleich zur Sedimentation (Keimkonzentration 100 KBE/ml).

Art der Probenbearbeitung vor IMS	Crossing Points [Zyklus]		
	Ansatz 1	Ansatz 2	ξ (STAW)
91 x g ¹	39,42	45,80	42,61 (4,51)
136 x g ¹	48,45	47,49	47,97 (0,68)
Sedimentation ²	n.n.	48,58	-

¹: Zentrifugationsdauer 2 min.

²: 30 min Sedimentation vor Probenentnahme

n.n.: nicht nachweisbar

Aus Tabelle 26 geht hervor, dass die bei 91 x g zentrifugierten Proben mit 42,61 im Mittel einen früheren Crossing Point aufweisen als die bei 136 x g aufbereiteten Proben mit 47,97. Ein Teil der Bakterien wird durch die Anhebung der Umdrehungszahl offensichtlich in das

Sediment verschoben. Dies macht sich durch eine Erhöhung des Crossing Points um im Mittel 5,4 Zyklen bemerkbar. Die Ergebnisse der Sedimentation bestätigen, dass dieser Schritt nicht ausreicht, um die den Nachweis störenden groben Bestandteile zu beseitigen und dadurch die Matrixschwankungen auszugleichen. Durch die hohe Viskosität und Faserigkeit der Matrix wird sowohl die Bindung der Keime an die Beads als auch die Separation der Beads an den Magneten unterbunden. Von zwei Ansätzen kann deshalb nach Sedimentation in einem keine DNA nachgewiesen werden.

Verbesserung der Sedimentausprägung

In weiteren Versuchen hat sich herausgestellt, dass die Ausprägung des Sediments matrixbedingt in erheblichem Maße schwanken kann. Um einen von groben Bestandteilen möglichst freien Überstand zu gewinnen, wurde zur Sedimentverbesserung nach der Zentrifugation ein steriler Edelstahlstempel angewendet, mit dessen Hilfe ein schwach ausgebildetes Sediment nach unten gedrückt wurde. Die Anwendung des Stempels wurde anhand abgestufter Gehalte (ca. 1 KBE/25 g; 10 KBE/25 g; 100 KBE/25 g) des Referenzkeims überprüft. Die Ergebnisse der Zentrifugation in Verbindung mit der Stempelmethode im Vergleich zur Zentrifugation stellt Tabelle 27 zusammen.

Tabelle 27: Vergleich der Crossing Points abgestufter Gehalte des Referenzkeims nach Zentrifugation mit und ohne Anwendung des Edelstahlstempels zur Verbesserung der Sedimentausprägung.

Art der Probenbearbeitung vor IMS; Keimkonzentration [KBE/25 g]	Crossing Points [Zyklus]						MW (STAW); n = 6	Wiederfindungsrate [%]
	Versuch 1		Versuch 2		Versuch 3			
	Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 3	Ansatz 4	Ansatz 5	Ansatz 6		
1 KBE/25 g								
Zentrifugation	39,24	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	51,99	-	33,3
Zentrifugation + Edelstahlstempel	40,29	41,38	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	-	33,3
10 KBE/25 g								
Zentrifugation	35,01	35,59	40,65	44,27	49,39	46,09	41,83 (5,80)	100,0
Zentrifugation + Edelstahlstempel	38,34	40,65	48,45	49,14	49,89	53,63	46,68 (5,89)	100,0
100 KBE/25 g							MW (STAW); n = 3	
Zentrifugation	28,51		36,73		43,80		36,35 (7,65)	100,0
Zentrifugation + Edelstahlstempel	29,29		42,37		n.n.		35,83 (9,25)	66,7

n.n.: nicht nachweisbar

Aus Tabelle 27 ist ersichtlich, dass bei einer Keimkonzentration von 1 KBE/25 g von drei Versuchsdurchführungen im Doppelansatz der Salmonellen-Nachweis sowohl nach der Zentrifugation als auch nach der Zentrifugation in Verbindung mit der Stempelanwendung in zwei Fällen gelang. Bei einer Anfangskonzentration von 10 KBE/25 g gelang der Nachweis bei Zentrifugation und Zentrifugation mit Stempelanwendung in allen sechs Wiederholungen. Bei einer ähnlichen Standardabweichung von ca. 5,8 Zyklen erscheint nach der Zentrifugation der Crossing Point um im Mittel 5 Zyklen früher als nach der Stempelanwendung (MW = 46,68). Die durch den früheren Crossing Point angezeigte höhere DNA-Menge ist ein Indiz dafür, dass durch diesen Aufreinigungsschritt störende Matrixeffekte ausgeschaltet werden können. Berechnet man eine prozentuale Wiederfindungsrate aus den in Tabelle 27 dargestellten Werten, ergibt sich für die Zentrifugation ein tendenziell besseres Ergebnis für eine Keimkonzentration von 100 KBE/25 g. Bei einem Keimgehalt von 10 KBE/25 g gelang mit beiden Aufreinigungsmöglichkeiten der DNA-Nachweis aus allen artefiziell kontaminierten Proben.

2.2 DNA-Aufreinigung

In den vorangegangenen Vorversuchen hat sich gezeigt, dass die groben Fasern, die sich infolge der Zerkleinerung bildeten, durch einen Zentrifugationsschritt am besten entfernt werden konnten. Da die Ausprägung des Sediments jedoch matrixbedingt stark schwanken konnte, wurde nach der Zentrifugation ein steriler Stempel aufgelegt und das schwach ausgebildete Sediment nach unten gedrückt. Dadurch war es möglich, einen von groben Bestandteilen möglichst freien Überstand zu gewinnen. In weiteren Versuchen konnte jedoch festgestellt werden, dass sowohl nach der Zentrifugation als auch nach der Stempelanwendung das PCR-Ergebnis in erheblichem Maße schwankte und dadurch die Reproduzierbarkeit des Ergebnisses nicht mehr gegeben war. Durch einen zusätzlichen DNA-Aufreinigungsschritt sollten nun die den PCR-Nachweis störenden Bestandteile entfernt werden. Es folgte ein Vergleich, bei dem ein Ansatz nur der DNA-Extraktion und der Parallelansatz zusätzlich einem Aufreinigungsschritt unterzogen wurde. Der Versuchsansatz wurde sechs Mal durchgeführt. Damit sollte festgestellt werden, ob durch die zusätzliche DNA-Aufreinigung eine Verbesserung der PCR-Resultate und deren Reproduzierbarkeit erzielt werden konnte. Die Ergebnisse sind in Tabelle 28 zusammengefasst.

Tabelle 28: Vergleich der Crossing Points nach Anwendung von DNA-Extraktion bzw. einer zusätzlichen DNA-Aufreinigung.

Konzentration des Referenzkeims [KBE/25 g]	Art der Probenaufbereitung vor IMS	Art der DNA-Gewinnung	Wiederfindungshäufigkeit	Crossing Points der positiven Proben [Zyklus]
				MW (STAW); n = 6
1	Zentrifugation + Stempel	Extraktion	3/6 ¹	31,46 (2,16)
1	Zentrifugation + Stempel	Extraktion + Aufreinigung	6/6	35,77 (2,77)
1	Zentrifugation	Extraktion	5/6	38,24 (3,22)
1	Zentrifugation	Extraktion + Aufreinigung	3/6	34,68 (0,23)
				MW (STAW); n = 5
10	Zentrifugation + Stempel	Extraktion	4/5	31,21 (4,69)
10	Zentrifugation + Stempel	Extraktion + Aufreinigung	5/5	33,21 (2,50)
10	Zentrifugation	Extraktion	5/5	33,51 (4,60)
10	Zentrifugation	Extraktion + Aufreinigung	5/5	31,57 (1,28)

¹: Anzahl der Proben mit positivem Befund/Anzahl der untersuchten Proben

Aus Tabelle 28 ist ersichtlich, dass nach einer Zentrifugation in Verbindung mit einer Stempelanwendung der DNA-Aufreinigungsschritt bei den getesteten Salmonellen-Gehalten keine Verbesserung bringt. Bei einer Keimkonzentration von 1 KBE/25 g erscheint der Crossing Point um 4,31 Zyklen später und weist zudem mit 2,77 Zyklen eine höhere Standardabweichung auf als nach alleiniger Anwendung der DNA-Extraktion. Ein ähnliches Ergebnis erkennt man auch bei einer Keimkonzentration von 10 KBE/25 g. Zwar liegt die Standardabweichung nach Anwendung des Aufreinigungsschrittes niedriger als nach alleiniger DNA-Extraktion, der Crossing Point fällt aber mit 33,21 Zyklen um 2 Zyklen höher als nach alleiniger DNA-Extraktion. Anders liegt das Ergebnis nach Anwendung der Zentrifugation. Durch den zusätzlichen Aufreinigungsschritt erscheint bei einer Keimkonzentration von 1 KBE/25 g der Crossing Point um 3,56 Zyklen früher. Die Standardabweichung von 0,23 liegt deutlich unter jener, wenn die DNA nicht zusätzlich aufgereinigt wird (3,22). Auch bei 10 KBE/25 g artefizieller Kontamination liegt der Crossing Point nach einem Aufreinigungsschritt mit 31,57 Zyklen niedriger als nach alleiniger DNA-Extraktion (33,51 Zyklen). Nach Anwendung der Zentrifugation und einer zusätzlichen DNA-Aufreinigung ergibt sich bei einem Keimgehalt von 1 KBE/25 g zwar eine tendenziell niedrigere Wiederfindungshäufigkeit als nach Zentrifugation in Verbindung mit einer Stempelanwendung. Bei einer Keimkonzentration von 10 KBE/25 g liefern jedoch sowohl die Zentrifugation als auch die Zentrifugation mit Stempelanwendung die gleiche Wiederfindungshäufigkeit nach Anwendung eines zusätzlichen DNA-Aufreinigungsschrittes.

Daraus lässt sich folgern, dass ein DNA-Aufreinigungsschritt nur bei Anwendung der Zentrifugation zu einer Verbesserung des PCR-Ergebnisses und dessen Reproduzierbarkeit führte. Diese zeigt sich in einem früheren Crossing Point nach einem zusätzlichen Aufreinigungsschritt, der wiederum eine höhere DNA-Ausbeute anzeigt sowie in einer niedrigeren Standardabweichung. Nach Zentrifugation mit Stempelanwendung dagegen weist der höhere Crossing Point nach einer Aufreinigung einen niedrigeren DNA-Gehalt bei gleichem Keimgehalt aus als nach alleiniger DNA-Extraktion. Dies kann zum einen dadurch erklärt werden, dass der Aufreinigungsschritt mit DNA-Verlusten verbunden ist und zum anderen, dass störende Matrixeffekte durch die Stempelanwendung nicht in dem erhofften Maße ausgeschaltet werden konnten.

Von den überprüften Varianten, störende Matrixeffekte zu entfernen, lieferte die Zentrifugation das beste Ergebnis für den DNA-Nachweis. In der internen Validierung wird deshalb die Zentrifugation als Probenaufbereitungsart vor IMS gewählt sowie ein DNA-Aufreinigungsschritt nach DNA-Extraktion durchgeführt (vgl. 3.1).

3 In house-Validierung der IMS-real-time PCR-Methode anhand des kulturellen Referenzverfahrens nach §35 LMBG durch artefiziell kontaminierte Fleischproben

Im nachfolgenden Kapitel der Arbeit werden die Ergebnisse der internen Validierung der IMS-real-time PCR-Methode anhand des kulturellen Referenzverfahrens nach §35 LMBG durch artefiziell kontaminierte Fleischproben dargestellt. Im weiteren werden die Resultate einer Möglichkeit, lebende von toten *S. Enteritidis* mit Hilfe von IMS und real-time PCR zu unterscheiden vorgestellt.

3.1 Überprüfung der IMS-real-time PCR-Methode im Vergleich zum amtlichen Verfahren nach §35 LMBG an artefiziell kontaminiertem Fleisch

Zunächst werden die Ergebnisse der Validierung der IMS-real-time PCR-Methode dargestellt. Anschließend folgt der Vergleich mit dem Referenzverfahren.

3.1.1 IMS-real-time PCR-Verfahren

Die Leistungsfähigkeit der IMS-real-time PCR-Methode wurde anhand artefiziell kontaminierter Fleischproben überprüft. Parallel dazu wurden die Proben mit dem Referenzverfahren untersucht. Die arithmetischen Mittelwerte der Crossing Points sowie die prozentualen Wiederfindungsraten der „Schnellmethode“ nach artefizieller Kontamination sind Tabelle 29 zu entnehmen.

Tabelle 29: Darstellung der Crossing Points nach artefizieller Kontamination abgestufter Keimgehalte von *S. Enteritidis*.

Konzentration des Referenzkeims [KBE/25 g]	Crossing Points [Zyklen]	Wiederfindungshäufigkeit
	MW (STAW); n = 12	
1	33,22 (1,65)	10/12 ¹
10	29,50 (0,87)	12/12
	MW (STAW); n = 6	
0	n.n.	0/6
100	25,58 (0,98)	6/6

¹: Anzahl der Proben mit positivem Befund/Anzahl der untersuchten Proben

n.n.: nicht nachweisbar

In Tabelle 29 sind die arithmetischen Mittelwerte der Crossing Points nach DNA-Extraktion abgestufter Keimgehalte aus zwölf bzw. sechs Durchführungen dargestellt. Die Keimkonzentrationen von 1 KBE/25 g und 10 KBE/25 g wurden je Versuchsdurchführung im Doppelansatz angelegt. Die Keimgehaltsstufe von 100 KBE/25 g nur im Einfachansatz. Jeder Ansatz wurde sechs Mal durchgeführt. Aus Tabelle 29 ist ersichtlich, dass der Nachweis von 1 KBE *S. Enteritidis* in 25 g Fleisch nach einer sechsstündigen Voranreicherungszeit durch die IMS-real-time PCR-Methode in 10 von 12 der untersuchten Proben gelang. Nach einer artefiziellen Kontamination von 10 KBE/25 g sowie 100 KBE/25 g kann *S. Enteritidis* in allen Versuchsdurchführungen mittels IMS-real-time PCR nachgewiesen werden.

3.1.2 Vergleich der Wiederfindungsraten beider Methoden

Der Kernpunkt dieser Arbeit ist die Überprüfung der Leistungsfähigkeit der IMS-real-time PCR-Methode anhand des kulturellen Referenzverfahrens nach §35 LMBG. Wie unter C/2.5.1 bereits ausgeführt, wurden beide Methoden aus einem Ansatz bedient. Dadurch wurden gleiche Versuchsbedingungen und ein exakter Methodenvergleich gewährleistet. Als Vergleichsmaßstab gilt die 48-stündige Bebrütung des SC- und RVS-Mediums (SC 48 h/RVS 48 h). Die Wiederfindungsraten unterschiedlicher Keimgehalte beider Verfahren sind in Tabelle 30 zusammengefasst.

Tabelle 30: Vergleich der prozentualen Wiederfindungshäufigkeit der IMS-real-time PCR-Methode und des kulturellen Verfahrens nach § 35 LMBG (SC 48 h/RVS 48 h).

Keimgehalt [KBE/25 g]	Wiederfindungshäufigkeit [%]	
	n = 12	
	IMS-real-time PCR-Methode	Kulturelles Verfahren §35 LMBG
1	83	67
10	100	100
	n = 6	
0	n.n.	n.n.
100	100	100

n.n.: nicht nachweisbar

Daraus geht hervor, dass die IMS-real-time PCR-Methode bei einem Keimgehalt von 1 KBE/25 g mit 83 % eine tendenziell bessere Wiederfindungshäufigkeit aufweist als das kulturelle Verfahren. Für Keimkonzentrationen von 10 KBE/25 g sowie 100 KBE/25 g kann unabhängig von der Methode in allen Versuchsdurchführungen *S. Enteritidis* nachgewiesen

werden. Aus diesem Ergebnis lässt sich als Fazit zusammenfassen, dass das IMS-real-time PCR-Verfahren bei den angegebenen Keimgehalten in Bezug auf die Wiederfindungshäufigkeit die gleiche Leistungsfähigkeit zeigt wie das kulturelle Referenzverfahren nach §35 LMBG.

3.1.3 Darstellung der Validierungsparameter der IMS-real-time PCR-Methode

Im nachfolgenden Teil der Arbeit erfolgt die Darstellung der Leistungsgrößen der IMS-real-time PCR-Methode im Vergleich zum kulturellen Referenzverfahren nach §35 LMBG. Die Ergebnisse errechnen sich nach den in C/2.5.2 aufgeführten Formeln. Als Auswertungsschema diente die 48-stündige Bebrütung des SC- sowie RVS-Mediums. Speziell für die Validierung beider Methoden ergibt das in Tabelle 31 zusammengefasste Auswertungsschema.

Tabelle 31: Auswertungsschema zur Bewertung der IMS-real-time PCR-Methode anhand des Referenzverfahrens nach §35 LMBG (SC 48 h/RVS 48 h).

		IMS-real-time PCR-Methode		
		+	-	Summe
Referenzmethode nach	+	26	0	26
§35 LMBG	-	2	8	10
Summe		28	8	36

Die IMS-real-time PCR-Methode erkennt 80 % aller sicher negativen Proben als negativ (Spezifität). Für die Sensitivität errechnet sich ein Wert von 100 %. Dieser gibt an, dass kein falsch-negatives Ergebnis durch diese Methode geliefert wurde. Die relative Richtigkeit nimmt einen Wert von 94 % an. Dieser drückt aus, bei wie vielen Messungen die Referenzmethode und die IMS-real-time PCR-Methode zum gleichen Ergebnis führten. Die Nachweisgrenze der „Schnellmethode“ liegt bei 10 KBE *S. Enteritidis* in 25 g Fleisch, da ab dieser Keimkonzentration alle artefiziell kontaminierten Proben *Salmonella*-positiv waren (Tabelle 30). Für die Falsch-Positiv-Rate erhält man einen Wert von 20 %. Die Falsch-Negativ-Rate resultierte in einem Wert von 0 %. Dieser bringt zum Ausdruck, dass das neue Verfahren keinen falsch-negativen Befund gewertet hat. Obwohl nur 6 negative Proben getestet wurden, sind in Tabelle 31 8 Proben, die in beiden Methoden ein negatives Ergebnis lieferten, aufgezeichnet. Dies lässt sich daraus erklären, dass sowohl das Referenzverfahren als auch die IMS-real-time PCR-Methode 2 mit ca. 1 KBE/25 g inokulierte Proben übereinstimmend als *Salmonella*-negativ auswiesen. Aufgrund der geringen Keimkonzentration für die artefi-

zielle Kontamination und der sich daraus ergebenden Schwankungen ist es möglich, dass in den beiden Fällen keine Salmonelle in die Probe gelangt war.

Für die statistische Übereinstimmung ergibt sich ein Wert von $\kappa = 0,85$. Da dieser Wert größer als 0,81 ist, herrscht zwischen beiden Prüfverfahren eine fast vollständige statistische Übereinstimmung.

Aufgrund dieses Ergebnisses wurde die Untersuchung der Feldproben auf Basis der Validierungsmethoden durchgeführt.

3.2 Unterscheidung einer Kontamination von lebenden und toten *Salmonella* spp. mittels IMS-real-time PCR aus Fleisch

In den Vorversuchen wurden Untersuchungen zur Unterscheidung von lebenden und toten *S. Enteritidis* aus Reinkulturen angestellt (1.2). Dazu wurde sowohl mittels IMS als auch einem Anreicherungsschritt (4 h; 37 °C) versucht, lebende von toten Zellen zu differenzieren. In dieser Versuchsanordnung wurde nun durch IMS und einem sechsständigen Voranreicherungsschritt geprüft, ob eine lebend-tot-Unterscheidung auch aus der Probenmatrix Fleisch möglich ist. Die Probenbearbeitung und DNA-Extraktion erfolgte nach den Vorgaben der Validierung (C/2.5.1). Die Durchführung war in drei Versuchen mit insgesamt sechs Ansätzen je getesteter Keimgehaltsstufe angelegt. Die Negativkontrollen (n = 3) lieferten weder vor noch nach der Anreicherung ein *Salmonella*-positives Ergebnis. Die Häufigkeit eines erfolgreichen DNA-Nachweises von lebenden und toten Zellen vor und nach der Anreicherung stellt Tabelle 32 zusammen.

Tabelle 32: Häufigkeit des DNA-Nachweises von lebenden und toten *S. Enteritidis* vor und nach einem Anreicherungsschritt (6 h; 37 °C; n = 6).

Konzentration des Referenzkeims [KBE/25 g]	Häufigkeit des DNA-Nachweises (n = 6)			
	vor Anreicherung		nach Anreicherung (6 h; 37 °C)	
	lebend	tot	lebend	tot
1	0/6 ¹	0/6	5/6	0/6
10	0/6	0/6	6/6	0/6
100	0/6	1/6	6/6	0/6

¹: Anzahl der Proben mit positivem Befund/Anzahl der untersuchten Proben

Aus Tabelle 32 ist ersichtlich, dass, mit einer Ausnahme, weder von lebenden noch toten *S. Enteritidis* vor der Anreicherung DNA aus den sechs Ansätzen je untersuchter Keimgehaltsstufe nachgewiesen werden konnte. Nur bei einer Keimkonzentration von 100 KBE/25 g

hitzeinaktivierter Zellen gelang in einem von sechs Ansätzen die Detektion des spezifischen Amplifikats. Aufgrund der Vermehrung lebender Zellen durch die Anreicherung (6 h; 37 °C) und der daraus resultierenden Zunahme der Zellzahl sowie DNA-Menge, konnte von den lebenden Zellen über alle getesteten Keimgehaltsstufen hinweg DNA nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu den anderen getesteten Keimkonzentrationen wurde allerdings bei 1 KBE/25 g nur in fünf von sechs Ansätzen DNA detektiert. Die toten Zellen zeigten nach dem Anreicherungsschritt infolge ausbleibender Vermehrung keinen Fluoreszenzanstieg, der die Anwesenheit von DNA anzeigen würde.

Die durch Oberflächenspatelverfahren auf Normalagar aufgebrauchten Keimsuspensionen der hitzeinaktivierten Bakterien zeigten nach 48-stündiger Inkubation bei 37 °C kein Wachstum an. Dadurch konnte ausgeschlossen werden, dass nachgewiesene DNA toter *S. Enteritidis* von vermehrungsfähigen Zellen stammte.

Die arithmetischen Mittelwerte der Crossing Points der lebenden Zellen nach der Anreicherung sind Tabelle 33 zu entnehmen.

Tabelle 33: Arithmetische Mittelwerte der Crossing Points lebender *S. Enteritidis* nach Anreicherung¹ (6 h; 37 °C).

Konzentration des Referenzkeims [KBE/25 g]	Crossing Points [Zyklen] nach Anreicherung MW (STAW); n = 6
1	32,07 (2,68)
10	29,45 (1,55)
100	25,19 (2,08)

¹: Vor der Anreicherung gelang bei keinen der Proben mit lebenden *S. Enteritidis* der DNA-Nachweis (siehe Tabelle 32).

Als Fazit lässt sich zusammenfassen, dass auf Basis der beschriebenen IMS-real-time PCR-Methode die Möglichkeit einer lebend-tot-Unterscheidung im Rahmen des Leistungsvermögens des Verfahrens besteht.

4 Überprüfung der IMS-real-time PCR-Methode anhand nativ kontaminierter Feldproben – ein Vergleich mit dem amtlichen Verfahren nach §35 LMBG

Nachdem die Leistungsfähigkeit der IMS-real-time PCR-Methode im Vergleich zum kulturellen Referenzverfahren anhand artefiziell kontaminierter Fleischproben getestet wurde, sollte diese an natürlich mit *Salmonella* spp. kontaminierten Feldproben untersucht werden. Die Ergebnisse dieses Methodenvergleichs werden im folgenden Kapitel der Arbeit dargestellt.

4.1 Auswertung des Probenmaterials

4.1.1 Probenumfang

Insgesamt wurden 491 nativ kontaminierte Fleischproben auf die Anwesenheit von *Salmonella* spp. hin untersucht. Die Feldproben wurden dabei parallel mit dem kulturellen Verfahren und der IMS-real-time PCR-Methode untersucht und ausgewertet. Die Aufteilung der Gesamtprobenzahl auf die einzelnen Fleischarten stellt Abbildung 5 graphisch dar.

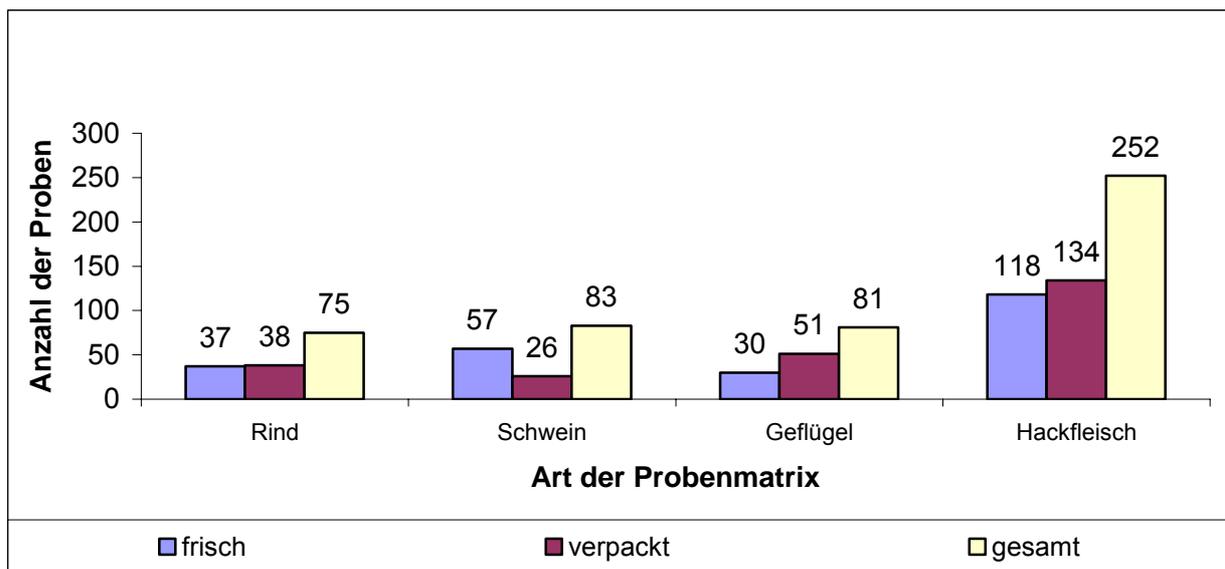


Abbildung 5: Aufteilung der Gesamtprobenzahl auf die untersuchten Fleischarten.

Die hohe Gesamtprobenzahl von Hackfleisch im Vergleich zu den übrigen Probenmatrizes erklärt sich aus der Untersuchung aller drei Hackfleischarten (Rinder-, Schweine- und gemischtes Hackfleisch). Alle drei Arten wurden mit jeweils ca. 80 Proben berücksichtigt (Rinderhackfleisch: 82 Proben; Schweinehackfleisch: 86 Proben; gemischtes Hackfleisch: 84 Proben).

4.1.2 Anteil positiver Proben und deren Serovarverteilung im kulturellen Referenzverfahren nach §35 LMBG

Insgesamt waren im kulturellen Verfahren nach §35 LMBG 43 von 491 untersuchten Fleischproben *Salmonella*-positiv. Dies entspricht einem Anteil von ca. 9 %. Die Aufteilung positiver Proben auf die Gesamtprobenzahl je Fleischart gibt Tabelle 34 wieder.

Tabelle 34: Anteil positiver Proben an der Gesamtprobenzahl je Fleischart (§35 LMBG).

Probenart	Gesamtprobenzahl je Fleischart	davon positiv	prozentualer Anteil [%]
Rind	75	1	1,3
Schwein	83	2	2,4
Geflügel	81	28	34,5
Hackfleisch	252	12	4,8
Summe	491	43	

Geflügel weist mit ca. 35 % den Hauptteil an *Salmonella*-positiven Proben aus. An zweiter Stelle folgt die Probenmatrix Hackfleisch mit knapp 5 % positiver Proben. Rind- und Schweinefleisch zeigen mit ca. 1 % bzw. 2 % eine ähnliche Kontamination mit *Salmonella* spp..

Aus den 43 positiven Proben wurden 8 Serovare identifiziert (Tabelle 35). Von den detektierten positiven Isolaten konnten 74 % *S. Typhimurium* zugerechnet werden. Jeweils 7 % der Isolate entfielen auf *S. Subspezies I Rauform*. Knapp 5 % der Isolate gehörten den Serovaren *S. der Gruppe B* sowie *S. Thompson* an. Jeweils 2 % konnten den Serovaren *S. der Gruppe D 1*, *S. Brandenburg*, *S. Kentucky* und *S. Kimuenza* zugerechnet werden.

Tabelle 35: Häufigkeit und Verteilung der Serovare nativ kontaminierter Feldproben.

Serovarbezeichnung	absolute Häufigkeit der Serovare (n = 43)	prozentuale Häufigkeit der Serovare (n = 43)
<i>S. Typhimurium</i>	32	74,4 %
<i>S. Subspezies I Rauform</i>	3	7,0 %
<i>S. der Gruppe B</i>	2	4,7 %
<i>S. Thompson</i>	2	4,7 %
<i>S. der Gruppe D 1</i>	1	2,3 %
<i>S. Brandenburg</i>	1	2,3 %
<i>S. Kentucky</i>	1	2,3 %
<i>S. Kimuenza</i>	1	2,3 %

Betrachtet man die Serovarverteilung in Abhängigkeit von der Fleischart (Abbildung 6), konnten die im Rind- und Schweinefleisch nachgewiesenen Isolate *S. Typhimurium* zugerechnet werden. Neben 24 *S. Typhimurium* wurden aus Geflügel zusätzlich jeweils 1 *S. Kentucky* und 1 *S. Kimuenza* sowie 2 *S. Thompson* isoliert. Aus Hackfleisch wurden jeweils 3 *S. Subspezies I Rauform*, 2 *S. der Gruppe B*, 1 *S. der Gruppe D 1*, 1 *S. Brandenburg* und 5 *S. Typhimurium* isoliert.

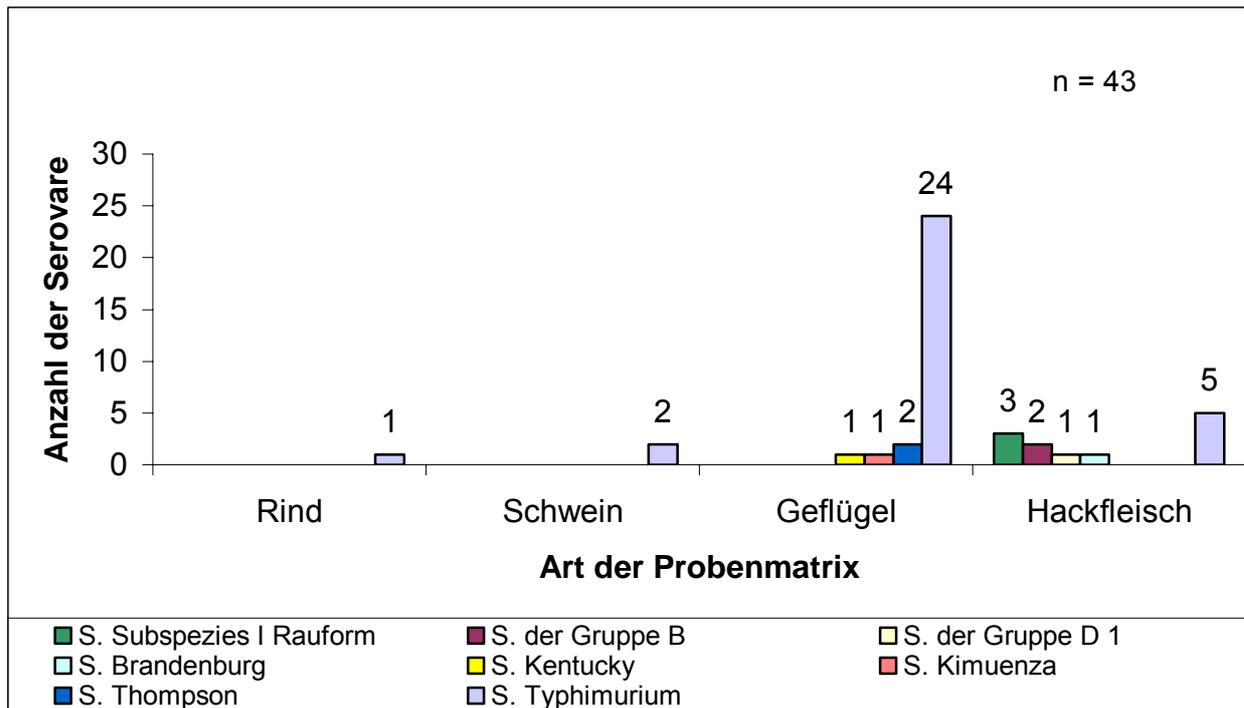


Abbildung 6: Serovarverteilung in Abhängigkeit von der Fleischart.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass über alle Probenmatrizes hinweg der Hauptteil der Isolate dem Serovar *S. Typhimurium* angehörten. Erwähnenswert sind die im Hackfleisch nachgewiesenen 3 Isolate *S. Subspezies I Rauform*, von denen 2 Isolate Mehrfachresistenzen aufweisen.

4.2 Vergleich der IMS-real-time PCR-Methode mit dem kulturellen Referenzverfahren nach §35 LMBG

Im folgenden Kapitel der Arbeit wird die IMS-real-time PCR-Methode mit dem Referenzverfahren nach §35 LMBG verglichen. Zunächst werden die Übereinstimmungen beider Methoden vorgestellt. Anschließend folgt die Darstellung der Abweichungen.

4.2.1 Darstellung der Übereinstimmung beider Methoden

Die IMS-real-time PCR-Methode wurde mit zwei verschiedenen Aspekten der Referenzmethode verglichen. Den Vergleichsmaßstab für die Auswertung setzten das Selenit-Cystin- und das Rappaport-Vassiliadis-Medium nach einer 48-stündigen Inkubation (SC 48 h/RVS 48 h). Die Wahl dieser Inkubationsbedingungen ergab sich deshalb, weil da-

durch die meisten *Salmonella*-positiven Proben detektiert werden konnten. Die Vorgaben der kulturellen Methode nach §35 LMBG sehen eine 48-stündige Bebrütung des RVS-Mediums nur optional vor. Verpflichtend ist folglich eine Inkubation des SC-Medium für 48 h sowie eine Bebrütung des RVS-Mediums für 24 h. Deshalb wird die IMS-real-time PCR-Methode auch mit diesen Inkubationsbedingungen (SC 48 h/RVS 24 h) verglichen. Die Berechnung der Validierungsparameter erfolgte nach den Ausführungen in C/2.5.2. Das Auswertungsschema sowie die Darstellung der Leistungsgrößen für den Vergleichsmaßstab (SC 48 h/RVS 48 h) sind Tabelle 36 sowie Tabelle 37 zu entnehmen.

Tabelle 36: Auswertungsschema zur Bewertung der IMS-real-time PCR-Methode anhand des Referenzverfahrens nach §35 LMBG (SC 48 h/RVS 48 h).

		IMS-real-time PCR-Methode		
		+	-	Summe
Referenzmethode:	+	36	7	43
SC 48 h/RVS 48 h	-	3	445	448
Summe		39	452	491

Für diese Vergleichsbedingungen ergeben sich die in Tabelle 37 dargestellten Parameter.

Tabelle 37: Validierungsparameter der IMS-real-time PCR-Methode im Vergleich zum kulturellen Verfahren nach §35 LMBG (SC 48 h/RVS 48 h).

Validierungsparameter	Wert
Spezifität	99,3 %
Sensitivität	83,7 %
Relative Richtigkeit	98,0 %
Falsch-Positiv-Rate	0,7 %
Falsch-Negativ-Rate	16,3 %
Konkordanzindex κ	0,87

Legt man eine 48-stündige Inkubation sowohl des SC- als auch des RVS-Mediums einem Vergleich zugrunde, ergibt sich für die „Schnellmethode“, dass sie 99,3 % der negativen Proben als negativ (Spezifität) erkannt und 83,7 % der positiven Proben als positiv (Sensitivität) gewertet hat. In 98 % der untersuchten Proben stimmten die Resultate der IMS-real-time PCR-Methode mit denen der Referenzmethode überein (relative Richtigkeit). Mit 0,7 % lag die Anzahl der Resultate mit positiver Abweichung deutlich unter dem Wert für die Anzahl der Resultate mit negativer Abweichung (16,3 %). Der Konkordanzindex κ nahm mit 0,87

einen Wert deutlich über 0,81 ein. Somit kann beiden Prüfverfahren eine fast vollständige statistische Übereinstimmung attestiert werden.

In einer weiteren Überlegung wurden die Ergebnisse des Referenzverfahrens nach der im LMBG vorgeschriebenen Inkubationszeit der Medien (SC-Medium 48 h; RVS-Medium 24 h) mit der IMS-real-time PCR-Methode verglichen. Das Auswertungsschema und die Validierungsparameter stellen Tabelle 38 und Tabelle 39 zusammen.

Tabelle 38: Auswertungsschema zur Bewertung der IMS-real-time PCR-Methode anhand des Referenzverfahrens nach §35 LMBG (SC 48 h/RVS 24 h).

		IMS-real-time PCR-Methode		Summe
		+	-	
Referenzmethode:	+	33	5	38
SC 48 h/RVS 24 h	-	6	447	453
Summe		39	452	491

Unter diesen Inkubationsbedingungen ergeben sich die in Tabelle 39 zusammengefassten Werte für die Leistungsparameter.

Tabelle 39: Validierungsparameter der IMS-real-time PCR-Methode im Vergleich zum kulturellen Verfahren nach §35 LMBG (SC 48 h/RVS 24 h).

Validierungsparameter	Wert
Spezifität	98,7 %
Sensitivität	86,8 %
Relative Richtigkeit	97,8 %
Falsch-Positiv-Rate	1,3 %
Falsch-Negativ-Rate	13,2 %
Konkordanzindex κ	0,84

Für die Leistungsparameter Spezifität, Sensitivität und relative Richtigkeit errechnen sich für die Inkubationsbedingungen SC 48 h/RVS 24 h ähnliche Werte wie für den Auswertungsmaßstab (Tabelle 39). Während die Falsch-Positiv-Rate mit 1,3 % über den Angaben des Vergleichsmaßstabs liegt, ergibt sich für die Falsch-Negativ-Rate ein etwas niedrigerer Wert. Die statistische Übereinstimmung fällt zwar mit 0,84 etwas geringer aus als beim Vergleich der IMS-real-time PCR-Methode mit dem Auswertungsmaßstab (0,87), zeigt aber eine statistische Übereinstimmung an.

4.2.2 Darstellung der Abweichungen beider Methoden

In diesem Kapitel werden die Abweichungen zwischen beiden Methoden herausgestellt. Diese ergeben sich durch falsch-positive bzw. falsch-negative Ergebnisse im Vergleich zur Referenzmethode. Für beide Auswertungsvarianten sind sowohl die falsch-positiven als auch die falsch-negativen Resultate zusammengefasst.

Abweichungen der IMS-real-time PCR-Methode vom Referenzverfahren (Vergleichsmaßstab: SC 48 h/RVS 48 h)

Die in Tabelle 40 angegebenen Proben lieferten im Referenzverfahren, wenn beide Selektivmedien 48 h inkubiert wurden, ein negatives Ergebnis, in der IMS-real-time PCR-Methode allerdings ein positives Ergebnis. Das Resultat wurde durch die PCR deshalb als *Salmonella*-positiv gewertet, weil mit spezifischen Hybridisierungssonden ein Fluoreszenzanstieg erfolgte und der Schmelzpeak bei der für den amplifizierten DNA-Abschnitt charakteristischen Temperatur ausgebildet wurde. Bei allen drei Abweichungen handelte es sich im Hackfleischproben, wobei zwei der verpackten (410; 459) und eine der frischen (436) Ware zuzuweisen waren.

Tabelle 40: Im Vergleich zum Referenzverfahren nach §35 LMBG (SC 48 h/RVS 48 h) in der IMS-real-time PCR-Methode falsch-positive Ergebnisse.

Probennummer	Fleischart	Verpackungsart
410	Hackfleisch	verpackt
436	Hackfleisch	frisch
459	Hackfleisch	verpackt

Da alle drei Proben nur nach Anwendung der IMS-real-time PCR-Methode ein *Salmonella*-positives Ergebnis ergaben, wurden die Amplifikate sequenziert. Ein Vergleich der Basenabfolge des DNA-Abschnittes mit den sequenzierten Nukleotiden der Gendatenbank BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) ergab eine vollständige Übereinstimmung mit dem amplifizierten Zielgen. Somit konnte bewiesen werden, dass es sich bei den in Tabelle 40 dargestellten Proben tatsächlich um *Salmonella* spp. gehandelt hatte.

Während der Untersuchungen hat sich herausgestellt, dass die in Tabelle 41 zusammengefassten Proben im kulturellen Referenzverfahren als *Salmonella*-positiv, nach Anwendung der IMS-real-time PCR-Methode jedoch als *Salmonella*-negativ erkannt wurden.

Tabelle 41: Im Vergleich zum Referenzverfahren nach 35 LMBG (SC 48 h/RVS 48 h) in der IMS-real-time PCR-Methode falsch-negative Ergebnisse.

Probennummer	Fleischart	Verpackungsart	Serovar
155	Geflügel	frisch	S. Typhimurium
157	Hackfleisch	frisch	S. Typhimurium
164	Schwein	verpackt	S. Typhimurium
211	Rind	frisch	S. Typhimurium
288	Hackfleisch	verpackt	S. Subspezies I Rauform
316	Geflügel	frisch	S. Typhimurium
369	Hackfleisch	verpackt	S. Subspezies I Rauform

Alle in Tabelle 41 dargestellten Proben wurden als Reinkultur nochmals der DNA-Extraktion und DNA-Aufreinigung sowie der PCR-Analyse unterzogen. Die untersuchten Proben zeigten ohne Ausnahme ein *Salmonella*-positives Ergebnis. Dies wurde bestätigt durch die Verwendung von Hybridisierungssonden und die Schmelztemperatur, die für alle Proben *Salmonella*-typisch ausfiel.

Abweichungen der IMS-real-time PCR-Methode vom Referenzverfahren (SC 48 h/RVS 24 h)

Reduziert man die Inkubationszeit des RVS-Mediums auf 24 h, steigt die Zahl der falsch-positiven Ergebnisse auf sechs Proben an, weil die Referenzmethode drei mit *Salmonella* spp. kontaminierte Proben nicht detektierte. Zu den in Tabelle 40 dargestellten Proben kommen drei (Probennummern: 188; 236; 253) weitere hinzu, die jedoch in der IMS-real-time PCR-Methode ein *Salmonella*-positives Ergebnis (spezifische Hybridisierungssonden, für das Amplifikat charakteristischer Schmelzpeak) ergaben. Die einzelnen Probennummern sind Tabelle 42 zu entnehmen.

Tabelle 42: Im Vergleich zum Referenzverfahren nach §35 LMBG (SC 48 h/RVS 24 h) in der IMS-real-time PCR-Methode falsch-positive Ergebnisse.

Probennummer	Fleischart	Verpackungsart	Serovar
188	Hackfleisch	verpackt	S. Brandenburg
236	Geflügel	frisch	S. Typhimurium
253	Geflügel	frisch	S. Typhimurium
410	Hackfleisch	verpackt	
436	Hackfleisch	frisch	
459	Hackfleisch	verpackt	

Durch die reduzierte Inkubationszeit sinkt die Zahl der in der IMS-real-time PCR-Methode falsch-negativen Ergebnisse von sieben auf fünf Proben ab (Tabelle 43).

Tabelle 43: Im Vergleich zum Referenzverfahren nach §35 LMBG (SC 48 h/RVS 24 h) in der IMS-real-time PCR-Methode falsch-negative Ergebnisse.

Probennummer	Fleischart	Verpackungsart	Serovar
155	Geflügel	frisch	S. Typhimurium
157	Hackfleisch	frisch	S. Typhimurium
164	Schwein	verpackt	S. Typhimurium
288	Hackfleisch	verpackt	S. Subspezies I Rauform
316	Geflügel	frisch	S. Typhimurium

Die Proben mit den Nummern 211 und 369 konnten unter den gewählten Bedingungen für beide Methoden weder mit dem kulturellen Verfahren noch mit der „Schnellmethode“ als *Salmonella*-positiv gewertet werden (Tabelle 44).

Tabelle 44: Im Vergleich zum Referenzverfahren nach §35 LMBG (SC 48 h/RVS 48 h) in der IMS-real-time PCR-Methode sowie nach einer Inkubationsdauer von SC 48 h/RVS24 h des kulturellen Verfahrens falsch-negative Ergebnisse.

Probennummer	Fleischart	Verpackungsart	Serovar
211	Rind	frisch	S. Typhimurium
369	Hackfleisch	verpackt	S. Subspezies I Rauform

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die IMS-real-time PCR-Methode im Vergleich zum kulturellen Referenzverfahren (SC 48 h/RVS 48 h) insgesamt sieben *Salmonella*-positive Proben nicht detektieren konnte (Tabelle 41). Dagegen wurden die in der „Schnellmethode“ falsch-positiven Proben durch Sequenzierung als eindeutig *Salmonella*-positiv eingestuft (Tabelle 40). Somit konnten durch das Referenzverfahren, unabhängig von der Bebrütungsdauer der Selektivmedien, drei mit *Salmonella* spp. kontaminierte Fleischproben nicht nachgewiesen werden.

E Diskussion

Konventionelle kulturelle Verfahren zum Nachweis von *Salmonella* spp. aus Lebensmitteln gestalten sich sehr zeitaufwendig, so dass ein schnelles Eingreifen im Sinne eines vorsorgenden Verbraucherschutzes nicht möglich ist. Deshalb war es Ziel dieser Arbeit, eine Methode zu entwickeln, die nicht nur innerhalb eines Tages ein bestätigtes Ergebnis liefert, sondern auch, dass deren Qualität der Resultate der des kulturellen Referenzverfahrens nach §35 LMBG entspricht. Nach der Anpassung der bestehenden IMS-real-time PCR-Methode nach SCHMID (2002) an die Vorgaben des kulturellen Referenzverfahrens, wurde die Leistungsfähigkeit der Schnellmethode sowohl an artefiziell als auch nativ kontaminierten Fleischproben getestet. Außerdem wurde als wichtiges Kriterium die Fähigkeit der IMS-real-time PCR-Methode überprüft, zwischen lebenden und toten *Salmonella* spp. zu differenzieren.

1 Reduktion der Voranreicherungszeit durch Wachstumsstimulantien

In der vorliegenden Arbeit sollte die lag-Phase während der Voranreicherungszeit der IMS-real-time PCR-Methode mit Hilfe von Wachstumsstimulantien reduziert werden. Zum Einsatz kamen das Siderophor Ferrioxamin E und/oder ein „enterobacterial Autoinducer of Growth“ (AI). Weder die Supplementierung des gepufferten Peptonwassers mit den beiden Einzelsubstanzen noch eine Kombination aus beiden führte nach kultureller Auswertung sowie der Bestimmung des DNA-Gehaltes mittels real-time PCR zu einer signifikanten Reduktion der lag-Phase im Vergleich zur un-supplementierten Kontrolle.

Verschiedene Arbeiten zeigen jedoch, dass Ferrioxamin E die Anpassungs- bzw. lag-Phase verkürzt, dadurch die Voranreicherungszeit reduziert sowie die Methodensensitivität erhöht. Außerdem begünstigt es die Resuzitation geschädigter Zellen. In den meisten Studien wurde Hühnereiweiß als Matrix verwendet (REISSBRODT UND RABSCH, 1993; PLESS UND REISSBRODT, 1995; REISSBRODT ET AL., 1996). In Hühnereiweiß sind sehr geringe Salmonellen-Zahlen vorhanden sowie das Bakterienwachstum durch Lysozyme, Enzyminhibitoren (Ovomucoid, Avidin), Ovotransferrin sowie einem hohen pH-Wert limitiert. Vor allem das Ovotransferrin verhindert durch die Bindung von Eisen in besonderem Maße das Bakterienwachstum (REISSBRODT UND RABSCH, 1993). Somit finden Salmonellen im Hühnereiweiß widrige Wachstumsbedingungen vor.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Effekt von Wachstumsstimulantien anhand von Reinkulturen (*S. Enteritidis* DSM 9898) getestet. Diese wurden als Suspensionskulturen 12 h bei

4 °C gelagert. Kälte wurde deshalb als Stressbedingung gewählt, da sie den Lagerungsbedingungen von rohem Fleisch am nächsten kommt. REISSBRODT ET AL. (1996) dagegen lagerten artefiziell mit *S. Enteritidis* kontaminiertes Hühnereiweiß bis zu 11 Tage bei Raumtemperatur und konnten bereits nach 6 h signifikant mehr Keime nachweisen als aus un-supplementiertem gepuffertem Peptonwasser. Dies stellt rigidere Stressbedingungen dar als in den eigenen Untersuchungen, zumal die Suspensionskulturen in nährstoffreicher Standard-I-Bouillon bei 4 °C gelagert wurden und somit keine Nährstofflimitierung wie z.B. im Hühnereiweiß vorlagen. Eine Nährstofflimitierung wie im Hühnereiweiß wird man jedoch im Fleisch nicht vorfinden. Trotzdem könnte man davon ausgehen, dass auch in diesem Lebensmittel eine Eisenlimitierung gegeben ist, da Eisen meist proteingebunden vorliegt und somit für Salmonellen nicht verfügbar ist (KINGSLEY ET AL., 1995). Aus diesem Grund könnte man davon ausgehen, dass die Supplementierung mit Ferrioxamin E zu einer Verbesserung der Eisenversorgung von Salmonellen im Lebensmittel Fleisch führt.

Die Frage beim Einsatz von Ferrioxamin E scheint sich darauf zu richten, ab welchem Stressausmaß der Wachstumsfaktor in der Resuszipitation von Salmonellen aus Lebensmitteln seine Wirkung, d.h. die Wiederherstellung von geschädigten Zellen, die Verkürzung der lag-Phase und den Schutz gestresster Zellen vor reaktiven Sauerstoffspezies während der Voranreicherung, entfaltet (REISSBRODT ET AL., 2000). So war Ferrioxamin E in Untersuchungen von REISSBRODT ET AL. (2000) in der Lage, stark gestresste *S. Typhimurium* Zellen aus Boden im Gegensatz zu un-supplementierten Proben (84 Tage) noch nach 455 Tagen wiederherzustellen. Solch rigide Stressbedingungen wird man jedoch in rohen Lebensmitteln kaum vorfinden.

Für die eigenen Untersuchungen floßen bei der Auswahl der Stressbedingungen für Salmonellen die in Fleisch relevanten Lagerungsbedingungen ein. Salmonellen werden in Fleisch hauptsächlich durch die Wirkung von Kälte, Hitze oder Konservierungsmitteln gestresst. Rohem Fleisch kommt jedoch Kältestreß am nächsten, da solches vom Schlachtprozess bis zur Abgabe an den Verbraucher gekühlt gelagert werden muß. Das heißt jedoch auch, dass Stressbedingungen wie in Hühnereiweiß im rohen Fleisch weniger vorherrschen werden.

Die Effektivität von Ferrioxamin E wurde an verschiedenen Lebensmitteln untersucht. RICHTER ET AL. (2000) kontaminierten Rohmilch und Weichkäse (aus hitzebehandelter Milch) mit subletal geschädigten (durch Hitzebehandlung) *Salmonella* Serovaren. Auch in diesen Untersuchungen ergab sich für die kulturelle Methode nach ISO 6579 durch die Supplementierung des Voranreicherungsmediums mit Ferrioxamin E keine Verbesserung in der Detektion von Salmonellen. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu den Untersuchungen von HATTENDORF UND BÜLTE (1997). Sie erzielten nach einer 20-stündigen mit Ferrioxamin E supplementierten Voranreicherung in Verbindung mit einer verkürzten Selektivanreicherung (5 h) in RVS-Medium mittels IMS bzw. PCR eine Wiederfindungsrate von 100 % für einen Bereich

von 10-50 KBE/10 g. In dieser Studie verbesserte Ferrioxamin E die Sensitivität des Salmonellennachweises.

Deshalb sollte an dieser Stelle die Überlegung mit einbezogen werden, ob Salmonellen in Lebensmitteln tatsächlich in solchem Maße gestresst werden, dass Wachstumsstimulantien zur Resuszipitation geschädigter Keime in ihrer Wirkung greifen können.

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit resultiert für den Einsatz von Ferrioxamin E bei Lebensmitteln weiterer Forschungsbedarf. Durch das zunehmende Angebot von schutzgasverpackter Frischfleischware ergeben sich im Vergleich zu loser Frischfleischware veränderte Lebensbedingungen für Salmonellen. Während frisches Fleisch nur einer Lagerungszeit von 1 bis 2 Tagen ausgesetzt ist, kann schutzgasverpacktes Fleisch über mindestens eine Woche kühl gelagert werden. Durch die veränderten atmosphärischen Bedingungen in der Verpackung sowie die verlängerte Lagerungsdauer bei Kälte erzeugen ein höheres Stressniveau als dies in unverpackter Ware der Fall ist. Somit besteht durchaus ein Interesse, die Effektivität von Ferrioxamin E in Bezug auf schutzgasverpackte Fleischware in weiteren Studien zu testen.

Als weiterer Wachstumsfaktor wurde ein hitzestabiler „enterobacterial Autoinducer of Growth“ (AI) verwendet, der von verschiedenen Enterobakterien-Spezies in nährstoffarmem Serum-SAPI Medium in Anwesenheit von Noradrenalin gebildet wird (LYTE ET AL., 1996; FREESTONE ET AL., 1999). Die Effektivität des AI in der Wiederherstellung von *S. Typhimurium* wurde bisher von REISSBRODT ET AL. (2002) untersucht. In dieser Studie wurden *S. Typhimurium* Zellen mehrere Monate in sterilem Reinstwasser bei Raumtemperatur gelagert und anschließend die Fähigkeit des Wachstumsfaktors getestet, diese geschädigten Zellen in gepuffertem Peptonwasser wiederherzustellen. In dieser Studie war AI in der Lage, die Resuszipitation schwer gestreßter *S. Typhimurium* Populationen auch dann noch zu begünstigen, wenn Ferrioxamin E keinen positiven Effekt mehr zeigte. Für den AI gilt ebenso wie bereits für Ferrioxamin E erwähnt, die Frage, ab welchem Stressniveau dieser Wachstumsfaktor einen positiven Effekt für die Detektion von *Salmonella* spp. zeigt. Im Lebensmittel Fleisch herrschen, wie bereits erwähnt, weniger rigide Stressbedingungen wie in den Untersuchungen von REISSBRODT ET AL. (2002). In weiteren Untersuchungen muß die Effektivität von AI bei der Resuszipitation von *Salmonella* spp. in Lebensmitteln weiter getestet werden, vor allem im Hinblick auf schutzgasverpackte Frischfleischwaren.

Ein kombinierter Einsatz von Ferrioxamin E mit AI führt, ebenso wie in den Untersuchungen von REISSBRODT ET AL. (2002), zu keiner signifikanten Reduktion der Anpassungsphase.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Effekt einer Supplementierung von artefiziell mit Reinkulturen kontaminiertem gepuffertem Peptonwasser mit Ferrioxamin E und/oder AI untersucht. Da sich *Salmonella* spp. aus Reinkulturen in anderen physiologischen Verhältnissen

befinden wie aus nativ kontaminierten Lebensmitteln, muß in weiteren Untersuchungen die Wirkung der beiden Wachstumsstimulantien anhand von Feldproben getestet werden.

2 Unterscheidung von lebenden und toten *Salmonella* spp.

Eine Gesundheitsgefährdung des Verbrauchers geht von lebenden pathogenen Keimen aus. Deshalb ist die Differenzierung von lebenden und toten Zellen durch ein mikrobiologisches Prüfverfahren wichtig. Konventionelle kulturelle Verfahren basieren auf dem Wachstumsvermögen lebender Zellen, so dass tote Zellen nicht detektiert werden. Neben der Zeitintensivität kultureller Methoden (KEER UND BIRCH, 2003) bleiben auch VBNC-Keime aufgrund mangelnden Wachstums durch kulturelle Methoden undetektiert (MCKILLIP UND DRAKE, 2004). Deshalb wurde die IMS-real-time PCR-Methode dieser Arbeit auf ihr Vermögen hin getestet, lebende von toten *Salmonella* spp. zu unterscheiden.

Zunächst wurde versucht, lebende von toten *S. Enteritidis* mittels IMS aus Reinkulturen (ohne Voranreicherung) zu unterscheiden. Es lag die Überlegung zugrunde, dass Zellen mit beschädigter Antigenstruktur nicht mehr an die Antikörper der Beads binden können und somit einem DNA-Nachweis mittels real-time PCR entzogen werden. Als Inaktivierungsmethode wurde eine für das Lebensmittel relevante Temperatur (96 °C; 10 min) gewählt. Die Ergebnisse zeigen, dass nach IMS die DNA sowohl lebender als auch hitzeinaktivierter *S. Enteritidis* mittels real-time PCR nachgewiesen werden konnte. Dies setzt voraus, dass die Antigenstruktur durch die Hitzeinaktivierung bei den toten Zellen intakt blieb und somit eine Bindung mit dem Antikörper der Beads erfolgen konnte. Die O-spezifische Seitenkette des LPS-Komplexes definiert die O-Antigene von *Salmonella* spp.. Es wird davon ausgegangen, dass sie als Antigen die spezifische Bindungsstelle der Antikörper der Beads in der IMS darstellen. LPS ist sehr hitzeresistent (TSUJI UND HARRISON, 1978). FUJII ET AL. (2002) zeigen in ihrer Untersuchung, dass Naßsterilisation bei einer Temperatur von 121 °C für 15 min ineffektiv für die Inaktivierung von LPS ist. Mit 96 °C lag die in der vorliegenden Arbeit angewandte Inaktivierungstemperatur deutlich unter 121 °C. Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass LPS noch intakt war, und eine Bindung mit dem Antikörper stattgefunden hat. Die Detektion von lebenden Mikroorganismen mittels IMS ist möglich (FLUIT ET AL., 1993). HORNES ET AL. (1991) zeigten jedoch, dass ohne einen vorangegangenen Anreicherungsschritt auch nicht-lebende Zellen mit intakten Zelloberflächenantigenen durch IMS angereichert werden können. Deshalb können mit IMS angereicherte tote Zellen durch den Nachweis von PCR-basierten Methoden ohne Voranreicherungsschritt zur Erfassung falsch-positiver Ergebnisse führen (SCHEU ET AL., 1998).

UYTTENDAELE ET AL. (1999) konnten hitzeinaktivierte (80 °C; 10 min) *E.coli* O157:H7 unabhängig von der Probenmatrix (Rinderhackfleisch) oder einem Voranreicherungsschritt bis zu

einer Keimkonzentration von $< 10^8$ KBE/g mittels IMS-PCR nicht nachweisen. Die Autoren führen dies darauf zurück, dass die Keime durch die Hitzeeinwirkung lysiert werden, dadurch die DNA frei und durch zwei Waschschriffe abgespült wird und somit für die Detektion nicht mehr zur Verfügung steht. Obwohl UYTENDAELE ET AL. (1999) über mikroskopische Analysen nachweisen konnten, dass unmittelbar nach der Hitzeeinwirkung nicht alle Zellen lysiert waren, erhielten sie dennoch bis zur angegebenen Keimkonzentration von hitzeinaktivierten Zellen kein falsch-positives Ergebnis durch die PCR. Sie gehen davon aus, dass die zwei Waschschriffe der IMS der kritische Faktor für die Eliminierung falsch-positiver Ergebnisse ist. In der vorliegenden Untersuchung konnten jedoch trotz Anwendung von drei Waschschriffen während der IMS tote *Salmonella*-Zellen mittels real-time PCR detektiert werden. Dieses Ergebnis bestätigt die Untersuchung von HORNES ET AL. (1991), dass nicht-lebende Zellen mit intakten Zelloberflächenantigenen in der IMS angereichert werden können. Es ist auch unwahrscheinlich, dass in den Untersuchungen von UYTENDAELE ET AL. (1999) die Antigenstruktur von *E.coli* O157:H7 durch die Hitzeeinaktivierung zerstört wurde, so dass keine Antigen-Antikörperbindung mehr stattfinden konnte. Die vorliegende Arbeit kann deshalb nicht bestätigen, dass wiederholte Waschschriffe während der IMS ausreichen, die DNA toter Zellen zu entfernen und somit der PCR-Detektion zu entziehen.

Im weiteren wurde untersucht, inwieweit sich ein Unterschied der Differenz der Crossing Points vor und nach einem Anreicherungschriff (4 h; 37 °C) lebender und hitzeinaktivierter (96 °C; 10 min) *S. Enteritidis* aus Reinkulturen ergibt. Der Versuchsanordnung lag die Überlegung zugrunde, dass sich nur lebende Zellen vermehren können. Diese Zellvermehrung, die mit einer DNA-Zunahme verbunden ist, äußert sich in einer Linksverschiebung des Crossing Points und einer Vergrößerung der Differenz der Crossing Points vor und nach dem Anreicherungschriff. Bei Keimgehalten von 10^5 KBE/ml bis 10^1 KBE/ml besteht ein signifikanter ($\alpha = 0,05$) Unterschied zwischen der Differenz der Crossing Points lebender und toter Zellen. Selbst bei bestimmten Mischverhältnissen aus lebenden und toten *S. Enteritidis* kann, wenn auch kein signifikanter, aber doch erkennbarer Unterschied in der Differenz der Crossing Points festgestellt werden. Durch die Spezifität und Sensitivität der angewandten real-time PCR ist es möglich, nach einem vierstündigen Voranreicherungschriff lebende von toten *S. Enteritidis* aus Reinkulturen zu unterscheiden.

Die durch die IMS und den Voranreicherungschriff gewonnene Information zur lebend-tot-Unterscheidung wurde nun verwendet, um diese Differenzierung auf Probenmatrix zu übertragen und dadurch einen Bezug zum Lebensmittel herzustellen. Es ging daher um die Frage, ob eine Differenzierung lebender und toter Zellen nicht nur aus Reinkulturen, sondern auch aus dem Lebensmittel möglich ist und dadurch ein Praxisbezug abgeleitet werden kann. Deshalb wurde IMS mit dem Voranreicherungschriff zur lebend-tot-Unterscheidung kombiniert. Die IMS, die zwar alleine nicht zur Differenzierung in der Lage ist, sollte dabei die

Keime konzentrieren und aus der Mischflora des Lebensmittels separieren. Die eigentliche Differenzierung erfolgte durch den Anreicherungsschritt, in welchem sich nur die lebenden Zellen vermehren konnten, sowie durch die Spezifität und Sensitivität der real-time PCR, die auch geringe DNA-Mengen nachweisen kann. Im Vergleich zum Test der Differenzierung lebender von toten Zellen aus Reinkulturen wurde ein Anreicherungsschritt von 6 h (37 °C) gewählt. Aus den Vorversuchen ergab sich, dass Matrixeffekte, die sich nachteilig auf die Nachweisrate auswirkten, durch die Verlängerung der Voranreicherungszeit ausgeglichen wurden. Die IMS wurde vor und nach dem Anreicherungsschritt durchgeführt. Aus der Probenmatrix Fleisch konnte vor der Anreicherung für die getesteten Keimgehaltsstufen (ca. 1 KBE/25 g; 10 KBE/25 g; 100 KBE/25 g) bis auf eine Ausnahme weder für die lebenden noch für die toten Keime ein spezifisches Amplifikat nachgewiesen werden. Die getesteten Keimkonzentrationen lagen unterhalb der Nachweisgrenze der IMS-real-time PCR-Methode. Lediglich bei einer Konzentrationsstufe von 100 KBE/25 g hitzeinaktivierter Zellen gelang der DNA-Nachweis. Dies bestätigt das Ergebnis, dass während IMS auch hitzeinaktivierte, d.h. tote und vermehrungsunfähige Zellen mit intakter Antigenstruktur durch die Antikörper der Beads gebunden werden und aus diesen toten Zellen DNA nachgewiesen werden kann. Nach dem Anreicherungsschritt war, bis auf eine Ausnahme (bei 1 KBE/25 g) in allen sechs Ansätzen die DNA der lebenden Salmonellen nachweisbar, während für die inaktivierten Zellen keine DNA detektierbar war. Weil sich die toten Zellen während des Anreicherungsschrittes nicht vermehren konnten, blieben die Keimkonzentrationen unterhalb der detektierbaren Menge von vor dem Anreicherungsschritt.

Bei der Beurteilung dieser Ergebnisse muß man sich im Klaren sein, dass IMS, die bei der Differenzierung aus Fleischmatrix zur Konzentrierung und selektiven Anreicherung eingesetzt wurde, fähig ist, auch Keime zu binden, die zwar nicht mehr lebensfähig sind, aber über eine intakte Antigenstruktur verfügen. Liegen in einem Lebensmittel nun in hohem Maße tote Keime vor, kann weder IMS noch PCR alleine eine Unterscheidung treffen, ob ein potenziell positives Ergebnis nun von lebensfähigen oder toten Zellen stammt. Dieses Problem, das sich nicht zuletzt aus der langen Persistenz der DNA in toten Zellen (HERMAN, 1997) sowie ihrer Resistenz gegenüber Erhitzung (MASTERS ET AL., 1994) ergibt, wurde durch den Anreicherungsschritt umgangen. Dieser ermöglicht die „Verdünnung“ von toten Zellen, die durch die Vermehrung der lebenden Zellen überwachsen werden. Auch SCHEU ET AL. (1998) empfehlen einen Voranreicherungsschritt vor der PCR-Analyse, um das Problem der Detektion toter Zellen durch PCR auszuschalten.

Im Gegensatz zu eukaryontischen Zellen erfolgt in prokaryontischen Zellen, wie z.B. bakteriellen Zellen, keine stabile Expression von Housekeeping Genen (FEY ET AL., 2004). Die Genexpression bakterieller Zellen unterliegt sehr stark dem physiologischen Status des Bakteriums sowie Umwelteinflüssen (SZABO UND MACKEY, 1999). Die Persistenz von mRNA in toten

Zellen ist zusätzlich abhängig von der Inaktivierungsmethode und den Lagerungsbedingungen (SHERIDAN ET AL., 1998). Diese, die Anwesenheit von mRNA beeinflussenden Größen, sind jedoch im Lebensmittel nicht bekannt (SZABO UND MACKEY, 1999). Diese Probleme sind nicht vorhanden, wenn man DNA als Indikator für die Differenzierung von lebenden und toten Zellen wählt. Unabhängig von inneren und äußeren Faktoren, die das Bakterium beeinflussen, ist DNA immer vorhanden und von genetisch regulierter Expression unbeeinflusst.

Die Verwendung von mRNA oder DNA als Marker für die Unterscheidung von lebenden und toten Bakterien ist von einem gewissen Grad an Unsicherheit verbunden. Der Nachweis von mRNA beruht auf der Überlegung, dass das instabile Molekül in toten Zellen in Korrelation mit dem Verlust an Lebensfähigkeit abgebaut und somit nur in lebenden Zellen als Zeichen eines intakten Metabolismus gebildet wird. Man würde, hätte man ein geeignetes mRNA Transkript gefunden, folglich nur die lebenden Zellen detektieren. Da aber, wie bereits erwähnt, die Genexpression in Bakterien sowohl von physiologischen Parametern als auch von Umwelteinflüssen bestimmt wird und eine stabile Expression des mRNA-Targets, die unabhängig von den Einflußgrößen, in detektierbarer Menge erfolgen und zusätzlich noch spezifisch für den Mikroorganismus sein müßte (MCINGVALE ET AL., 2002), selten zu finden ist, besteht auch bei der Verwendung von mRNA als Marker die Gefahr von falsch-negativen Ergebnissen, wenn ein lebendes Bakterium das Gen nicht exprimiert (RIJPENS UND HERMAN, 2002). Für die Verwendung von DNA als Marker zur Bestimmung der Lebensfähigkeit besteht aufgrund der hohen Stabilität des Moleküls allerdings die Möglichkeit, falsch-positive Ergebnisse von toten Zellen zu erhalten (JOSEPHSON ET AL., 1993).

Durch die vorliegende Arbeit wurde gezeigt, dass durch einen Voranreicherungsschritt die Unterscheidung von lebenden und toten *Salmonella* spp. mittels IMS und PCR, die beide separat betrachtet nicht in der Lage sind, eine Differenzierung vorzunehmen, ermöglicht wird. Der Voranreicherungsschritt bedeutet auch keinen Zeitverlust, da dieser in mikrobiologischen Methoden zur Resuszipitation sowie Vermehrung von Keimen und dadurch zur Erhöhung der Methodensensitivität vorgesehen ist (SCHEU ET AL., 1998; BAYLIS ET AL., 2000b). Auch SHERIDAN ET AL. (1999) empfehlen für die Verwendung von *tufA* mRNA von *E. coli* die Anwendung eines Voranreicherungsschrittes, da sich die Persistenz der mRNA durch höhere Temperaturen verringert und dadurch die mRNA toter Zellen schneller abgebaut wird. Im Gegensatz zur Verwendung von DNA ist für *tufA* mRNA aus *E. coli* der Abbau von den Inkubationsbedingungen abhängig.

Da die Detektion von DNA weniger vom physiologischen Status des Bakteriums sowie von umweltbedingten Größen beeinflusst werden kann als die von mRNA, ergibt sich deshalb im Moment als unkompliziertester und sicherster Weg der lebend-tot-Unterscheidung prokaryotischer Zellen der Gebrauch eines Anreicherungsschrittes in Verbindung mit einer DNA-

basierten Methode. Diese Bewertung der Ergebnisse schließt sich den Ausführungen von RIJPENS UND HERMAN (2002) an.

In der vorliegenden Arbeit erfolgt die Differenzierung von lebenden und toten *Salmonella* spp. durch einen sechsständigen Voranreicherungsschritt, der nur den lebenden Zellen die Vermehrung ermöglicht. Deshalb kann in diesem Fall eine spezifische und sensitive DNA-basierte Nachweismethode, wie die real-time PCR angewendet werden. Zudem liegt der Vorteil in der Verwendung von DNA als Indikator zur Bestimmung bakterieller Lebensfähigkeit in ihrer höheren Stabilität gegenüber Einflussfaktoren begründet. Die Steigerung der Sensitivität wurde durch die Konzentrierung der Keime mittels IMS erreicht.

3 Anpassung und Optimierung der IMS-real-time PCR-Methode an das amtliche Referenzverfahren nach §35 LMBG

Durch eine im Vergleich zum Referenzverfahren verkürzte Voranreicherungszeit (6 h; 37 °C) sowie die Kombination von Immunomagnetischer Separation mit real-time PCR wird die Reduktion der Versuchszeit erreicht. Die durch die Inkubation zunehmende Viskosität der Voranreicherung sowie die Fasern und das Fett der Probenmatrix Fleisch stellt erhöhte Anforderungen an die Probenaufbereitung. Die PCR ist zwar spezifisch, sensitiv und schnell, kann aber durch mehrere Faktoren, wie z.B. komplexen Lebensmittelmatrizes mit einem hohen Fett- und Proteingehalt inhibiert werden (ROSSEN ET AL., 1992; LANTZ ET AL., 1994). Inhibitoren reduzieren oder hemmen die Amplifikationseffizienz (WILSON, 1997). Dies und die Bindung von DNA an die Lebensmittelmatrix (UYTTENDAELE ET AL., 1999) kann zu falsch-negativen Ergebnissen führen (WILSON, 1997). Die Entfernung dieser störenden Komponenten ist der wichtigste Schritt der Probenaufbereitung PCR-basierter Detektionsmethoden (JENIKOVA ET AL., 2000).

Die Immunomagnetische Separation dient nicht nur der spezifischen und selektiven Anreicherung des Zielorganismus aus Mischkulturen der Voranreicherung, sondern separiert den nachzuweisenden Keim auch aus die PCR störenden und inhibierenden Matrizes (FLUIT ET AL., 1993; BÄUMLER ET AL., 1997; SPANOVA ET AL., 2001).

Frühere Studien belegen jedoch, dass sowohl ein hoher Fettgehalt des Lebensmittels (SKJERVE UND OLSVIK, 1991; COLEMAN ET AL., 1995a,b) als auch eine hohe Viskosität (UYTTENDAELE ET AL., 2000) sowie Lebensmittelpartikel (JENIKOVA ET AL., 2000) die Immunomagnetische Separation stören. Lebensmittelpartikel blockieren die Antikörper und verhindern deshalb die Bindung der Bakterien und deren Separation (BENOIT UND DONAHUE, 2003). Deshalb ist es Ziel der Probenaufbereitung, diese sowohl die IMS als auch die PCR störende Bestandteile aus der Voranreicherung zu entfernen. In der vorliegenden Arbeit konnten durch die Zentrifugation vor Anwendung der IMS die besten Ergebnisse zur Entfernung von

Fasern und groben Fleischbestandteilen erzielt werden. Die Anwendung des sterilen Edelstahlstempels wurde deshalb nicht weiter verfolgt, da das Sediment, das nach der Zentrifugation relativ instabil ist, dadurch wieder zerstört wurde und die abzentrifugierten Fasern in den Überstand aufgewirbelt wurden. Vor allem die Entfernung von fettigen Bestandteilen erwies sich als schwierig. Die Eliminierung von Fett ist durch Zentrifugation nicht gegeben, da Fett in der oberen Phase verbleibt und sich nicht in das Sediment verschieben läßt. COLEMAN ET AL. (1995a) versuchten, ein Aliquot der Voranreicherung bei 4 °C für 1 h zu kühlen, um Matrixpartikeln die Sedimentation zu erleichtern sowie die Verfestigung des Fetts zu erzielen und somit die störende Wechselwirkung mit den Antikörpern der Beads zu unterbinden. Die Kühlung löste das Problem des Bakterienverlustes während des Separationsschrittes (SKJERVE UND OLSVIK, 1991) durch den hohen Fettgehalt jedoch nur partiell. Zudem ist ein einstündiger Kühlungsschritt während der Probenaufbereitung zu zeitaufwendig und für die Anwendung auf eine Schnellmethode ungeeignet.

In der vorliegenden Arbeit gliedert sich die DNA-Gewinnung in zwei Schritte. Im ersten Schritt erfolgte mittels Lysispuffer-Proteinase K die Lyse der durch IMS konzentrierten *Salmonella spp.*. Das Kochen des Lysats im Anschluß an den Proteinase K-Verdau inaktiviert nicht nur die, die PCR störende Proteinase K (CUI ET AL., 2003), sondern auch hitzelabile PCR-Inhibitoren (LANTZ ET AL., 2000). Außerdem erfolgt eine Aufspaltung unvollständig lysierter Salmonellenzellen. Durch die Säulenaufreinigung mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen Kits werden der Zelldetritus und andere niedermolekulare Bestandteile aus dem Extrakt im zweiten Schritt entfernt und ein für die real-time PCR sehr reines Eluat erhalten. Diese Art der DNA-Extraktion und -Aufreinigung ist nicht nur einfach zu handhaben, sondern auch schnell durchgeführt (Abbildung 7).

Der IMS und DNA-Extraktion sowie -Aufreinigung angeschlossen wird zur spezifischen, sensitiven und schnellen Identifizierung von *Salmonella spp.* die real-time PCR. Der Vorteil der real-time PCR dieser Arbeit liegt in der Verwendung Sequenz-spezifischer Hybridisierungssonden. Bisher kombinieren zwei weitere Studien IMS mit real-time PCR (DE MEDICI ET AL., 2003; MERCANOGLU UND GRIFFITHS, 2005). In beiden Untersuchungen wird jedoch der Sequenz-unspezifische Fluoreszenzfarbstoff SYBR[®] Green verwendet.

Es besteht auch ein Unterschied in der Inkubationsdauer der Voranreicherung. In der vorliegenden Arbeit wird die Voranreicherung 6 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wird ein 20 ml Aliquot zentrifugiert und daraus ein 10 ml Aliquot für IMS verwendet. MERCANOGLU UND GRIFFITHS (2005) inkubieren 10 h bei 37 °C und verwenden für die IMS ein 1 ml Aliquot der Voranreicherung. Ein geringeres Aliquot für die IMS muß, möchte man die gleiche Sensitivität erreichen, durch eine längere Inkubationszeit kompensiert werden und umgekehrt. Durch die Verwendung eines größeren Aliquots für die IMS kann die Inkubationszeit unter Berücksichtigung der Sensitivität verkürzt werden. Gleichzeitig wird die Viskosität der Voranreiche-

rung verringert, wodurch ein Vorteil für die IMS geschaffen wird. Nach artefizieller Kontamination von Fleisch liegt die Nachweisgrenze der vorliegenden Arbeit bei 10 KBE/25 g im Vergleich zu 2,5 KBE/25 g in den Untersuchungen von MERCANOGLU UND GRIFFTHS (2005). Die Unterschiede können auch im gewählten Detektionsformat der real-time PCR begründet liegen. Es ist deshalb ein Kompromiß zwischen Sensitivität und Spezifität zu finden. Der Zeitbedarf ist mit ca. 13 h für beide Methoden gleich.

4 Vergleich der IMS-real-time PCR-Methode mit dem kulturellen Referenzverfahren nach §35 LMBG

Die Leistungsfähigkeit der IMS-real-time PCR-Methode wurde anhand des kulturellen Referenzverfahrens nach §35 LMBG getestet. In diesen Vergleich einbezogen wurden artefiziell kontaminierte Proben sowie nativ kontaminierte Feldproben. Für die Überprüfung der Leistungsfähigkeit ist es wichtig, beide Möglichkeiten der Kontamination zu testen, da sich Salmonellen in Lebensmitteln (native Kontamination) nicht im gleichen physiologischen Stadium befinden wie im Labor angezüchtete Reinkulturen (artefizielle Kontamination). Deshalb besteht durch den Nachweis einer ausschließlich artefiziellen Kontamination die Gefahr, die Sensitivität der zu testenden Methode zu überschätzen (FLUIT ET AL., 1993; RIJPENS ET AL., 1999; SPANOVA ET AL., 2001).

Sowohl die IMS-real-time PCR-Methoden als auch die Referenzmethode wurden aus jeweils der gleichen Voranreicherung bedient, wodurch ein exakter Methodenvergleich gewährleistet wurde.

4.1 Artefiziell kontaminiertes Probenmaterial

Durch die Untersuchung artefiziell kontaminierter Proben wurde die Nachweisgrenze und Übereinstimmung der Schnellmethode mit dem Referenzverfahren anhand definierter Keimzahlen von *S. Enteritidis* DSM 9898 bestimmt. Die Vorgabe der Referenzmethode lautet, dass in 25 g Probenmaterial keine Salmonelle nachweisbar sein darf. Folglich muß durch beide Methoden 1 KBE/25 g detektierbar sein. Definiert man nun nach HÜBNER ET AL. (2002) die Nachweisgrenze eines mikrobiologischen Prüfverfahrens als kleinste Konzentration an Mikroorganismen, die mit genügender statistischer Sicherheit nachgewiesen werden kann, so ergibt sich für beide Methoden eine Nachweisgrenze von 10 KBE/25 g, da bei dieser Keimkonzentration 100 % der inokulierten Proben als *Salmonella*-positiv erkannt wurden. Man muß jedoch beachten, dass lebende Organismen gemessen werden, die sich dynamisch verhalten. Deshalb wäre es präziser, von einer theoretischen Nachweisgrenze zu

sprechen, da aufgrund der Dynamik der Mikroorganismen eine praktische Nachweisgrenze schwer festgestellt werden kann (HÜBNER ET AL., 2002). Auch im kulturellen Verfahren kann die Detektion durch die Anwesenheit anderer Mikroorganismen, die mit den Salmonellen während der Anreicherung konkurrieren, verhindert werden (BECKERS ET AL., 1987).

Wie bereits eingangs erwähnt, befinden sich Salmonellen aus Lebensmitteln nicht in den gleichen physiologischen Verhältnissen wie Reinkulturen. Sie sind meist geschwächt oder gar subletal geschädigt. Dieser Umstand wurde in der Arbeit beachtet, indem die Keime, die zur artefiziellen Kontamination verwendet wurden, vor der Inokulation 12 h bei 4 °C gelagert wurden. Diese Stressbedingung wurde deshalb gewählt, weil sie Lagerungsbedingungen von Fleisch am besten widerspiegelt. RIJPENS ET AL. (1999) untersuchten Milch- und Eiprodukte und wählten sprühgetrocknete *Salmonella* spp. für die artefizielle Kontamination. Diese Stressbedingung kommt Milch- und Eiprodukten, die selbst getrocknet werden, sehr nahe. FLUIT ET AL. (1993) wählten für ihre Untersuchungen von Fleisch mittels IMS-PCR den Gefrier- und Auftau-Zyklus, um die Salmonellen zu schädigen. In dieser Arbeit kam eine Schädigung durch Einfrieren und Auftauen jedoch nicht in Frage, da frisches, gekühlt angebotenes Fleisch untersucht werden sollte.

Als Maßstab für den Vergleich beider Methoden diene das Ergebnis der Referenzmethode, wenn das SC- sowie das RVS-Medium 48 h inkubiert wurde. Während die IMS-real-time PCR eine Sensitivität von 100 % aufweist und damit zum Ausdruck bringt, dass sie kein falsch-negatives Ergebnis geliefert hat, liegt die Falsch-Positiv-Rate bei 20 % (Spezifität: 80 %). Dieser Wert ergibt sich deshalb, weil bei einer Keimkonzentration von 1 KBE/25 g die Referenzmethode im Gegensatz zur Schnellmethode bei 2 von 12 Ansätzen kein Ergebnis erhalten hat, obwohl die Probe mit der angegebenen Keimmenge inokuliert worden war. Die Referenzmethode hätte an dieser Stelle folglich zu einem *Salmonella*-positiven Ergebnis kommen müssen. Vor diesem Hintergrund muß deshalb bei der Beurteilung falsch-positiver Ergebnisse die Differenzierung des erhaltenen Resultats mit beachtet werden (HÜBNER ET AL., 2002).

Für die statistische Übereinstimmung ergab sich ein Wert von $\kappa = 0,85$. Somit kann in Bezug auf artefiziell kontaminierte Proben von einer vollständigen statistischen Übereinstimmung beider Methoden ausgegangen werden (HÜBNER ET AL., 2002). Wie in anderen Arbeiten (HATTENDORF UND BÜLTE, 1997; EROL ET AL., 1999) hat sich auch in der vorliegenden Arbeit die Kopplung von IMS mit PCR für einen schnellen, spezifischen und sensitiven Nachweis von *Salmonella* spp. aus artefiziell kontaminierten Proben bestätigt. Während die Kombinationen aus IMS mit konventioneller PCR nach 20-30 h ein Ergebnis vorlegt (Tabelle 7), ist dies mit einer IMS-real time PCR-Methode, wie man auch aus den Untersuchungen von MERCNOGLU UND GRIFFITHS (2005) erkennbar ist, in 12-13 h möglich.

4.2 Nativ kontaminiertes Probenmaterial

Die Prüfung der Leistungsfähigkeit erfolgte anhand von 491 nativ kontaminierten Feldproben. Den Auswertungsmaßstab setzten SC- sowie RVS-Medium nach 48-stündiger Inkubation, weil mit diesen Bebrütungsbedingungen die meisten *Salmonella*-positiven Resultate durch die Referenzmethode erzielt wurden. Während die Versuchsvorschrift des Referenzverfahrens die Inkubation des SC-Mediums für 48 h verpflichtend vorschreibt, sieht sie eine 48-stündige Inkubation des RVS-Mediums nur optional vor. Deshalb wurden die Ergebnisse der IMS-real-time PCR-Methode auch mit den Ergebnissen des Referenzverfahrens nach SC 48 h/RVS 24 h verglichen. Beim Vergleich der IMS-real-time PCR-Methode mit den beiden Inkubationsbedingungen der Selektivmedien im kulturellen Verfahren ergeben sich unterschiedliche Falsch-Positiv- sowie Falsch-Negativ-Raten.

Im Vergleich zu einer 48-stündigen Inkubation des RVS-Mediums ergeben sich für die Schnellmethode drei falsch-positive Resultate. Nach der Differenzierung der erhaltenen Amplifikate durch Sequenzierung ergab sich, dass in den Proben die *Salmonellen*-spezifische Zielsequenz nachgewiesen wurde. Alle drei falsch-positiven Proben gehören zur Probenmatrix Hackfleisch, die bekanntlich eher fett ist. Der Erfolg der Isolation und Identifikation vor allem niedriger Zahlen an *Salmonella* spp. aus Lebensmitteln ist jedoch abhängig vom Lösen der Keime aus der Fettphase, damit sie sich auf ein detektierbares Maß sowohl in nicht selektiven als auch selektiven Medien vermehren können (D'AOUST ET AL., 1982). Ebenso kann es möglich sein, dass vor allem wuchernde Spezies der Begleitflora, wie *Citrobacter* spp. oder *Proteus* spp. nach 16-20 h die nachzuweisenden *Salmonella* spp. überwachsen haben, während dies nach 6 h Voranreicherungszeit noch nicht gelungen ist, so dass der Nachweis durch die IMS-real-time PCR-Methode erfolgreich war. Durch die sechs-stündige Voranreicherung und der damit verbundenen Vermehrung lebender Zellen, ist es unwahrscheinlich, dass das *Salmonellen*-spezifische Signal in der PCR von toten *Salmonella* spp. stammte.

Im weiteren erkannte die Schnellmethode im Vergleich zum Referenzverfahren bei einer Inkubation des RVS-Mediums für 48 h sieben positive Proben als negativ (falsch-negative Resultate). Fünf der Isolate gehörten dabei dem Serovar *S. Typhimurium* und zwei Isolate *S. Subspezies I* Rauforn an. Alle sieben Isolate ergaben als Reinkultur in der real-time PCR ein eindeutig *Salmonella*-positives Ergebnis (Sequenz-spezifische Hybridisierungssonden). Weil aus den Reinkulturen in der PCR ein positives Resultat erhalten wurde, muß in den vorherigen Verfahrensschritten der Schnellmethode der Grund für den ausbleibenden Nachweis gesucht werden.

So haben Studien belegt, dass sich eine kürzere Inkubationszeit (6h) nachteilig auf die Sensitivität der Methode aufgrund unzureichender Resus-zitation gestresster oder geschädigter Keime auswirken kann (D'AOUST, 1981; D'AOUST ET AL., 1990a). Dies kann zu falsch-

negativen Ergebnisse führen. Grundsätzlich muß man die möglicherweise nachteilige Auswirkung einer reduzierten Voranreicherungszeit auf die Methodensensitivität differenziert bewerten. Die Dauer der Voranreicherung ist auch immer abhängig von der Sensitivität des nachgelagerten Detektionsverfahrens. Deshalb mag diese Aussage in Bezug auf rein kulturelle Methoden zutreffen. Je sensitiver ein Nachweisverfahren ist, desto weniger Keime sind für eine erfolgreiche Detektion nötig. Legt man in einer Modellrechnung für *Salmonella* spp. optimale Wachstumsbedingungen (Generationszeit von 20 min) ohne Einfluß der Begleitflora und Probenmatrix zugrunde und nähme man weiter an, es wäre in der Probe 1 KBE enthalten, wären nach 6 h Voranreicherung ca. 131.000 Keime vorhanden. Für die real-time PCR der vorliegenden Arbeit sind aus Reinkulturen 3 bis 0,15 KBE/PCR-Ansatz für ein positives Resultat erforderlich (SCHMID, 2002). Berücksichtigt man nun den Einfluß von Matrixeffekten und Verluste durch die IMS sowie DNA-Extraktion und –Aufreinigung, sollten dennoch nachweisbare DNA-Mengen vorhanden sein. Es kann jedoch durch den Einfluß von Matrixeffekten die Resusztation und Vermehrung der Salmonellen im Voranreicherungsmedium behindert werden, so dass ein Nachweis nach 6 h noch nicht möglich ist.

Außerdem kann die IMS durch das Fett (SKJERVE UND OLSVIK, 1991) und die Fasern der Probenmatrix behindert worden sein und somit keine detektierbaren Mengen an *Salmonella* spp. separiert haben. Aber nicht nur die Probenmatrix, auch die Begleitflora kann die IMS stören. So berichten COLEMAN ET AL. (1995b), dass mucoide Coliforme, wie *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas* spp. sowie *Proteus* spp. mit den Salmonellen in der Bindung an die Beads interferieren. MOLLA ET AL. (1994) wiesen zwar nach, dass eine unspezifische Bindung an die Beads nicht die Extraktion der Salmonellen stört. Dennoch ist es vorstellbar, dass gerade mucoide Spezies die Bindungsstellen für die Salmonellen besetzen. RIPABELLI ET AL. (1997) erklären die Koloniebildung von nicht-Salmonellen auf Selektivagar durch die Zusammenlagerung von mehreren Zellen zu Beadclustern.

Die ausbleibende Detektion der zwei *S.* Subspezies I Rauform Isolate (Probennummern 288 und 369) ist mit hoher Wahrscheinlichkeit durch die IMS verursacht. Rauformen entstehen aufgrund von Veränderungen in der O-spezifischen Seitenkette (O-Antigen) des LPS-Komplexes. Diese besteht aus repetitierenden Einheiten. Durch Mutationen haben Rauformen die für sie spezifische O-Antigenstruktur verloren. Weil diesen Isolaten die spezifische Antigenstruktur fehlt, kann auch der Antikörper nicht mehr binden und somit erfolgt keine Separation dieser Keime. Trotzdem können Ausnahmen auftreten. Aus Probe 428 konnte ebenfalls eine *S.* Subspezies I Rauform isoliert werden, die jedoch auch mit der Schnellmethode nachweisbar war. Offensichtlich besteht die Möglichkeit der Bindung, wenn Teile dieser sich repetitierenden Einheiten der O-spezifischen Seitenkette vorhanden sind. Denn während die nicht detektierten Rauform-Isolate serologisch negativ blieben und nur biochemisch bestätigt werden konnten, zeigte das detektierte Rauform-Isolat der Probe 428 eine

biochemische sowie eine, wenn auch schwache, Agglutinationsreaktion mit dem eingesetzten Polyvalent I Serum.

Auch während der Extraktion und Aufreinigung der DNA kann es zu Verlusten kommen. Nach der Lysispuffer-Proteinase K-Aufreinigung sind neben dem Zelldetritus auch durch die Waschschriffe der IMS nicht entfernte Bestandteile der Probenmatrix, wie Fett und Fasern enthalten. Deshalb besteht in diesem Schritt der Schnellmethode die Möglichkeit, dass die DNA an diese Lebensmittelbestandteile bindet und für den Nachweis nicht mehr zur Verfügung steht (UYTTENDAELE ET AL., 1999).

Wendet man die im Referenzverfahren geforderten Inkubationsbedingungen (SC 48 h/RVS 24 h) an, steigt die Zahl der in der IMS-real-time PCR-Methoden falsch-positiven Resultate auf sechs an. Unter der reduzierten Inkubation des RVS-Mediums konnte die Referenzmethode im Gegensatz zur Schnellmethode drei Proben (Probennummern 188; 236; 253) nicht als *Salmonella*-positiv detektieren. Dies verdeutlicht wieder, dass bei der Beurteilung von abweichenden Ergebnissen deren Differenzierung für eine korrekte Wertung unerlässlich ist. Eine Verlängerung der Bebrütungszeit des RVS-Mediums auf 48 h ermöglicht die Detektion von fünf mit *Salmonella* spp. kontaminierten Proben, die nach einer 24-stündigen Inkubationszeit unerkannt geblieben wären. Somit ist aus den Ergebnissen dieser Arbeit eine verlängerte Bebrütung des RVS-Mediums zur Erzielung einer erhöhten Sensitivität des kulturellen Verfahrens zu empfehlen. Diese Empfehlung steht im Gegensatz zu den Untersuchungen von D'AOUST ET AL. (1992a), die keine Effizienzsteigerung durch eine verlängerte Bebrütung von Selektivmedien finden konnten, jedoch im Einklang mit den Ergebnissen von HARVEY UND PRICE (1981), die auch eine erhöhte *Salmonella*-Isolationsrate nach einer 48-stündigen Inkubationsdauer des RVS-Mediums erhielten.

Unter den angegebenen reduzierten Inkubationsbedingungen des RVS-Mediums hätte das Referenzverfahren zwei nach SC 48 h/RVS 48 h *Salmonella*-positiven Proben (211 und 369) ebenso wie die IMS-real-time PCR-Methode nicht detektiert. Das heißt, dass diese beiden Proben nicht nur in der IMS-real-time PCR-Methode negativ waren, sondern auch nach einer 48-stündigen Inkubation des SC-Mediums sowie 24-stündigen Inkubation des RVS-Mediums. Die fette Lebensmittelmatrix erschwert nicht nur die Isolation und Detektion von *Salmonella* spp. durch die Schnellmethode, sondern auch das Wachstum der Keime im Selektivmedium des kulturellen Verfahrens (D'AOUST ET AL., 1982).

Nach Überprüfung der Leistungsfähigkeit der IMS-real-time PCR-Methode anhand des kulturellen Referenzverfahrens nach §35 LMBG besteht sowohl bei artefizieller ($\kappa = 0,85$) als auch bei nativer Kontamination ($\kappa = 0,87$, wenn SC 48 h/RVS 48 h) eine statistische Übereinstimmung.

4.3 Zeitbedarf

Der Hauptunterschied beider Methoden ergibt sich aus dem unterschiedlichen Zeitbedarf für ein Ergebnis. Bei Anwendung des kulturellen Verfahrens liegt das serologisch bzw. biochemisch bestätigte Ergebnis, unter Berücksichtigung des Subkultivierungsschrittes nach der Identifizierung, für *Salmonella*-negative Proben nach 6-7 Tagen und für *Salmonella*-positive Proben nach 7-8 Tagen vor. Mit dem IMS-real-time PCR-Verfahren liegt das Ergebnis sowohl für negative als auch positive Proben nach ca. 12-13 h vor. Den unterschiedlichen Zeitanspruch beider Methoden veranschaulicht Abbildung 7 graphisch.

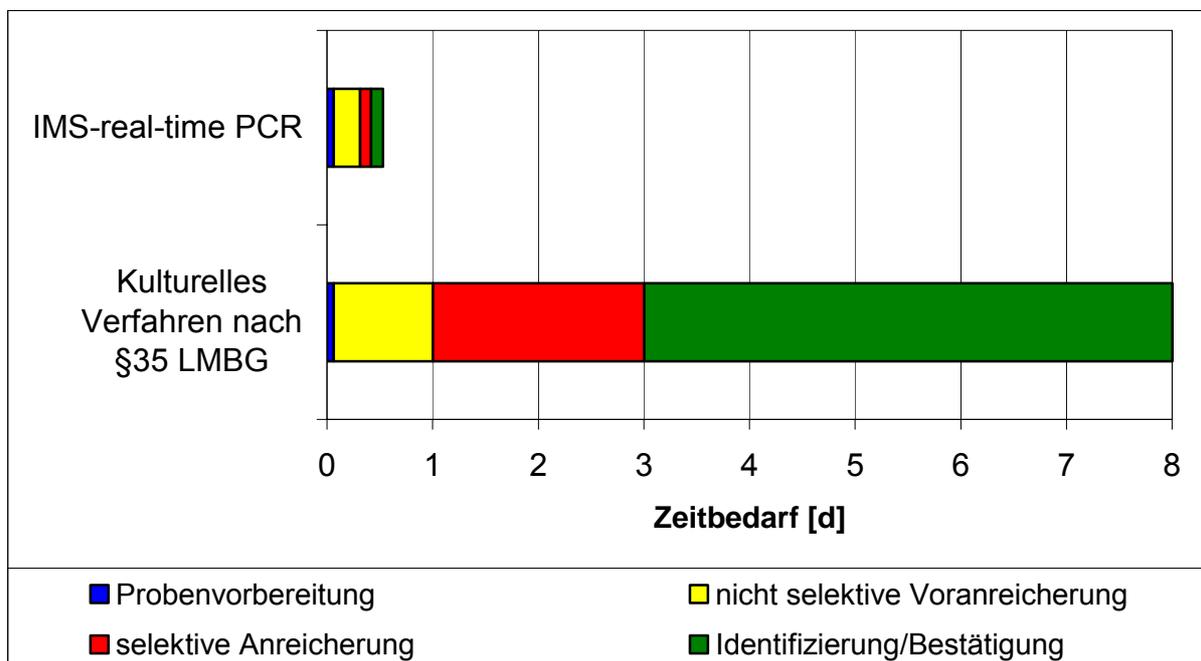


Abbildung 7: Gegenüberstellung des Zeitbedarf der IMS-real-time PCR-Methode im Vergleich zum kulturellen Referenzverfahren nach §35 LMBG.

Aus der graphischen Darstellung (Abbildung 7) ist eindeutig ersichtlich, dass die Schnellmethode nach einem geringeren Zeitaufwand ein mittels Hybridisierungssonden bestätigtes Ergebnis liefert als das kulturelle Referenzverfahren. Ein Anspruch an eine Schnellmethode liegt jedoch auch in ihrer Möglichkeit zur Automatisierung (MALORNY ET AL., 2003). Die Immunomagnetische Separation als zeit- und personalintensivster Arbeitsschritt der Schnellmethode hat deshalb das größte Einsparungspotenzial. Von der Firma Dynal wird der sogenannte BeadRetriever™ angeboten, der die automatisierte IMS (AIMS) ermöglichen soll. Vergleichende Untersuchungen zwischen AIMS und manueller IMS (MIMS) wurden am Prototyp des Gerätes bereits durchgeführt. MASSING UND BÜLTE (2000) stellten fest, dass AIMS im Vergleich zu MIMS zu einem reduzierten Zeit- und Arbeitsaufwand bei einfacher Handha-

bung führt. Dennoch stellten sie fest, dass die Zuverlässigkeit dieser Methode von der Probenmatrix abhängig war. Während sie für die Untersuchung von Schweinehackfleischproben zuverlässig einsetzbar war, ergab sich für die Untersuchungen von Geflügelfleischproben eine schwach signifikante Überlegenheit von MIMS im Vergleich zu AIMS. CHAPMAN UND CUDJOE (2001) stellten zwar keinen signifikanten Unterschied zwischen MIMS und AIMS, aber die Möglichkeit einer Kreuzkontamination zwischen negativen und artefiziell kontaminierten Proben während AIMS fest. In den Untersuchungen von DUNCANSON ET AL. (2003), die AIMS mit einem Enzym-Immunoassay (AIMS-EIA) zum Nachweis von *Salmonella* spp. kombinierten, führt AIMS zu einer Reduktion der Versuchszeit im Vergleich zur kulturellen Methode. LYNCH ET AL. (2004) stellten neben einer 15,5 % höhere Sensitivität von AIMS im Vergleich zur kulturellen Methode auch eine geringere Arbeitsintensivität von AIMS fest.

Der BeadRetrieverTM von Dynal ist jedoch nur für 15 x 1 ml Proben konzipiert. Für die IMS in der vorliegenden Untersuchung wurde ein 10 ml Aliquot verwendet. Um die theoretische Nachweisgrenze von 1 KBE/25 g zu erreichen, muß entweder für die Entnahme eines kleinen Aliquots für die IMS die Voranreicherung länger bebrütet werden oder, wie in der vorliegenden Arbeit, ein größeres Aliquot nach kürzerer Inkubationszeit entnommen werden. Da jedoch für die Entwicklung einer Schnellmethode der Faktor Zeit die entscheidende Größe ist, wäre es wünschenswert, wenn AIMS auch für größeres Volumina (z.B. 10 ml) entwickelt werden würde.

5 Diagnostische PCR

In den vergangenen Jahren hat sich eine Fülle von PCR-basierten Methoden zum Nachweis von pathogenen Mikroorganismen aus Lebensmitteln entwickelt. Nicht selten liegt die Schwierigkeit bei der Anwendung darin, dass die veröffentlichten Verfahren zeitaufwendig auf die jeweiligen Bedingungen der einzelnen Labore angepasst werden müssen (HOORFAR ET AL., 2004). Deshalb wird die Erarbeitung international anerkannter Standards für PCR-basierte Methoden notwendig (HOORFAR UND COOK, 2002). Die Voraussetzung für die Anerkennung einer PCR als Standard, ist, dass sie nicht patentiert und durch einen „multicenter collaborative trial“ entsprechend internationaler Kriterien validiert wurde (HOORFAR ET AL., 2003). Nur IAC (internal amplification control) enthaltende PCRs werden einem „multicenter collaborative trial“ unterzogen, der wieder Voraussetzung für eine Standardisierung ist (HOORFAR ET AL., 2003).

CEN hat in Zusammenarbeit mit ISO eine allgemeine Richtlinie für PCRs zum Nachweis von pathogenen Mikroorganismen aus Lebensmitteln vorgeschlagen, die die Verwendung einer IAC in der PCR als verpflichtend vorsieht (ANONYMUS, 2005d). Gemäß Definition ist die IAC eine nicht-Target DNA-Sequenz, die im gleichen Reaktionsgefäß wie die Zielsequenz enthal-

ten ist und gleichzeitig mit dieser amplifiziert wird (HOORFAR ET AL., 2004). Mit einer reliabel arbeitenden IAC ist es möglich, falsch-negative Resultate, die sich z.B. aufgrund einer Hemmung der PCR ergeben, zu erkennen (PERELLE ET AL., 2004). Der Ausschluß falsch-negativer Ergebnisse ist wichtig, um eine Gefährdung der Bevölkerung zu verhindern.

Das Design der IAC lässt CEN allerdings offen (HOORFAR ET AL., 2004). Nach HOORFAR ET AL. (2004) müssen deshalb in Abhängigkeit der verwendeten IAC-Strategie für die diagnostische PCR verschiedene Kriterien beachtet werden. Verwendet man die kompetitive IAC (Target-DNA und IAC werden mit einem Primersatz amplifiziert) ergeben sich aufgrund der Konkurrenz durch die IAC neben einer niedrigeren Amplifikaitonseffizienz der PCR auch eine niedrigere Nachweisgrenze. Außerdem kann es bei hohen IAC-DNA Konzentrationen durch die Überdeckung des Target Signals oder durch die ausbleibende Detektion einer schwachen Hemmung zu falsch-negativen Resultaten kommen (HOORFAR ET AL., 2004). Bei Verwendung der nichtkompetitiven IAC (Target-DNA und IAC werden durch zwei verschiedene Primersätze amplifiziert) besteht die Schwierigkeit darin, dass die Amplifikation des Targets aufgrund der Unterschiede in der Primersequenz nicht exakt wiedergegeben wird und zwei PCRs optimiert werden müssen, wobei eine von beiden weniger effizient sein wird (HOORFAR ET AL., 2004). Wenn eine PCR-basierte Methode in der Routinediagnostik verwendet wird, zeigt nur eine IAC, deren Konzentration korrekt eingestellt ist, falsch-negative Ergebnisse an (HOORFAR ET AL., 2004). Es ist jedoch bekannt, dass es nicht nur durch die kompetitive PCR zu einer suboptimalen IAC-Template Amplifikation kommen kann, sondern auch Instrument-abhängige Analysemethoden, wie z.B. die real-time PCR durch verschiedene Fluoreszenzmarkierung, zu unterschiedlichen C_T -Werten der gleichen IAC führen können (MALORNY ET AL., 2004).

Die gleichzeitige Detektion von Zielsequenz und IAC wäre durch den Einsatz von zwei unterschiedlich fluoreszenzmarkierten Hybridisierungssonden im LightCycler[®] möglich (HOORFAR ET AL., 2004), aber durch die Verwendung der zweiten Sonde mit zusätzlichen Kosten verbunden.

Vergleicht man die vorliegende IMS-real-time PCR mit den Kriterien einer standardisierten diagnostischen PCR nach MALORNY ET AL. (2003), ergibt sich folgende Einschätzung: Ein hohes Maß an diagnostischer Richtigkeit ist dann gegeben, wenn der Zielmikroorganismus richtig und präzise in Anwesenheit von biologischer Matrix ohne Interferenz von nicht Zielkomponenten nachgewiesen wird (MALORNY ET AL., 2003). Sie zeichnet sich durch eine niedrige Zahl an falsch-positiven (hohe Spezifität) sowie falsch-negativen (hohe Sensitivität) Resultaten aus. Die vorliegende Arbeit weist nach der Untersuchung von nativ kontaminierten Feldproben eine Falsch-Positiv-Rate von 0,7 % (Spezifität: 99,3 %) auf. Das hohe Maß an Spezifität wird nicht zuletzt durch den Einsatz von Sequenz-spezifischen Hybridisierungssonden zum DNA-Nachweis von *Salmonella* spp. gewährleistet. Die Sequenzierung der

falsch-positiven Ergebnisse ergab, dass es sich bei dem nachgewiesenen DNA-Fragment um die spezifische *Salmonella* Zielsequenz gehandelt hat. Die Wahrscheinlichkeit der Detektion von toten Zellen wird durch den Anreicherungsschritt minimiert. Die falsch-negativen Resultate (16,3 %) hätten vermutlich mit einer reliabel arbeitenden IAC ausgeschlossen werden können. Es muß jedoch betont werden, dass der Einsatz einer IAC mit einem Kompromiß zwischen Sensitivität und Nachweisgrenze, die durch ihre Verwendung erhöht wird, verbunden ist. Eine diagnostische PCR sollte allerdings ein Ausgangsinokulum von 10-100 Copies an bakterieller Target-DNA nach einem Anreicherungsschritt nachweisen können (MALORNY ET AL., 2003). Die vorliegende Schnellmethode hat eine Nachweisgrenze von 10 KBE/25 g nach sechsständiger Anreicherung und würde dieses Kriterium erfüllen. Durch den Einsatz der real-time PCR, bei der die gleichzeitige Detektion und Verifizierung des PCR-Produktes stattfindet (MALORNY ET AL., 2004), wird die Kreuzkontamination auf ein Minimum reduziert. Die geforderte Flexibilität in Bezug auf verschiedene Probenmatrizes wird schwer zu realisieren sein, da es nicht möglich ist, eine Probenbearbeitung für alle Lebensmittelmatrizes zu entwickeln (PERELLE ET AL., 2004). Auch die Schnellmethode in dieser Arbeit ist auf die Probenmatrix Fleisch angepasst worden. Vor allem durch Lebensmittelbestandteile wie Fett treten Interferenzen mit der PCR auf, die durch die Probenaufbereitung jedoch schwer auszuschalten sind. Die vorliegende Methode zeichnet sich durch Schnelligkeit aus. Das mittels Hybridisierungssonden bestätigte Ergebnis liegt nach ca. 12-13 h vor. Ein weiteres Kriterium für eine standardisierte diagnostische PCR liegt in ihrer Möglichkeit zur Automatisierung (MALORNY ET AL., 2003). Wie bereits erwähnt, besteht bis zum jetzigen Zeitpunkt keine Möglichkeit, größere Volumina von bis zu 10 ml durch automatisierte immunomagnetische Separation (AIMS) zu bearbeiten. Dies ist noch verbunden mit einem relativ hohen Personal- und Zeitaufwand, der sich in der Bearbeitung eines begrenzten Probenumfangs widerspiegelt. In den 12-13 h können mit der Schnellmethode insgesamt 12 Proben bearbeitet werden. Sowohl die IMS als auch die real-time PCR haben jedoch ein hohes Potenzial zur Automatisierung, so dass sich auf diesem Gebiet sicher eine Weiterentwicklung etablieren wird. Ein weiterer wichtiger Punkt, vor allem im Bezug auf eine quantitative PCR ist die Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen. Nach den Ergebnissen dieser Arbeit zur lebend-tot-Unterscheidung von *Salmonella* spp. ist diese nur durch einen der IMS und PCR vorangehenden Anreicherungsschritt möglich. Ein Voranreicherungsschritt ermöglicht nur lebenden Zellen die Vermehrung und damit auch die Detektion. Somit ist nicht nur der Nachweis von lebenden *Salmonella* spp. in einem PCR-Ansatz möglich, sondern auch eine von Umwelteinflüssen und Genexpressionsregulationen unabhängige Detektion gewährleistet.

Die IMS-real-time PCR weist in einem Vergleich mit der kulturellen Referenzmethode nach §35 LMBG eine durch den Konkordanzindex κ definierte statistische Übereinstimmung an

artefiziell ($\kappa = 0,85$) und nativ ($\kappa = 0,87$) kontaminierten Fleischproben auf. Somit eignet sich die vorgestellte Methode als ein spezifisches, sensitives und schnelles Screeningverfahren zum Nachweis von *Salmonella* spp. aus Fleisch. Es ist jedoch anzumerken, dass durch die Schnellmethode keine lebenden *Salmonella* spp. für eine weitere Typisierung erhalten werden. Dies ist jedoch für epidemiologische Aussagen wichtig. Deshalb ist eine parallele Anwendung des kulturellen Verfahrens mit der Schnellmethode empfohlen. Liefert die IMS-real-time PCR-Methode innerhalb von 12-13 h ein *Salmonella*-positives Ergebnis, ist ein schnelles Eingreifen im Sinne eines vorsorgenden Verbraucherschutzes möglich. Durch die parallele Anwendung des kulturellen Verfahrens wird das positive Screeningergebnis nicht nur kulturell abgesichert (EROL ET AL., 1999), sondern es steht auch ein für epidemiologische Typisierungen lebensfähiges Isolat zur Verfügung.

F Zusammenfassung

Zum Nachweis von *Salmonella* spp. aus Fleisch wurde eine IMS-real-time PCR-Methode etabliert und anhand des kulturellen Referenzverfahrens nach §35 LMBG durch artefiziell sowie nativ kontaminierte Fleischproben validiert.

Die Vorversuche zum Wachstumsverhalten von *S. Enteritidis* DSM 9898 in Anwesenheit von Ferrioxamin E und einem „enterobacterial Autoinducer of Growth“ (AI) ergaben für eine Keimkonzentration von 10 KBE/ml (Reinkulturen) nach kultureller Auswertung keine signifikante ($\alpha = 0,05$) Wachstumsförderung im Vergleich zur Kontrollgruppe. Auch die Bestimmung des DNA-Gehaltes durch real-time PCR zeigte nach einer Inkubation von 4 h sowie 6 h keine deutliche Linksverschiebung der Crossing Points und eine damit angezeigte Zunahme der DNA-Menge im Vergleich zur Kontrolle an.

Untersuchungen zur Unterscheidung zwischen lebenden und toten *S. Enteritidis* DSM 9898 wurde mittels IMS (ohne Voranreicherung) und real-time PCR (4 h Voranreicherung; 37 °C) aus Reinkulturen vorgenommen. IMS ist in der Lage, hitzeinaktivierte (96 °C; 10 min) Zellen zu separieren, die in der real-time PCR auch nachweisbar sind. Ein Voranreicherungsschritt und der damit verbundenen Vermehrung von lebensfähigen Zellen erlaubt durch die Bestimmung der Differenz der Crossing Points vor und nach dem Anreicherungsschritt die Unterscheidung von lebenden und toten Zellen aus Reinkulturen. Für Keimkonzentrationen von 10^5 bis 10^1 KBE/ml besteht ein signifikanter Unterschied ($\alpha = 0,05$) in der Differenz der Crossing Points lebender und toter Zellen vor und nach der Anreicherung.

Für Keimkonzentrationen von 1-100 KBE/25 g ist es nach einer sechsstündigen Voranreicherung möglich, durch die Kombination von IMS und real-time PCR lebende von hitzeinaktivierten (96 °C; 10 min) *S. Enteritidis* DSM 9898 aus Fleisch zu unterscheiden.

Die exakte Vergleichbarkeit der IMS-real-time PCR-Methode mit dem Referenzverfahren nach §35 LMBG wurde erreicht, indem beide Methoden aus einem Ansatz bedient wurden. Die Verfahrensschritte der Schnellmethode schließen eine sechsstündige nicht selektive Voranreicherung, eine immunomagnetische Separation, Lysispuffer-Proteinase-K DNA-Extraktion sowie DNA-Säulenaufreinigung mit anschließender real-time PCR (Detektionsformat: Hybridisierungssonden) ein. Das mittels Hybridisierungssonden bestätigte Ergebnis liegt nach 12-13 h vor.

Artefiziell kontaminierte Fleischproben

Die Leistungsfähigkeit der Schnellmethode wurde anhand des Referenzverfahrens durch artefiziell (*S. Enteritidis* DSM 9898) kontaminierte Fleischproben überprüft (6 Versuche mit 12 Ansätzen für die Keimkonzentrationen 1 KBE/25 g und 10 KBE/25 g; 6 Versuche mit 6 Ansätzen für die Keimkonzentration 100 KBE/25 g und 0 KBE/25 g). Den Auswertungsmaßstab setzten die Ergebnisse des kulturellen Verfahrens nach einer 48-stündigen Inkubation des SC- und RVS-Mediums (SC 48 h/ RVS 48 h). Die Nachweisgrenze für beide Methoden lag bei 10 KBE/25 g (Wiederfindungsrate: 100 % für beide Methoden). Für die Schnellmethode ergab sich eine Spezifität von 80 % (Falsch-Positiv-Rate: 20 %) sowie eine Sensitivität von 100 % (Falsch-Negativ-Rate: 0 %). Die relative Richtigkeit lag bei 94 %. Die durch den Konkordanzindex κ definierte statistische Übereinstimmung lag bei 0,85, so dass eine Übereinstimmung beider Methoden nach statistischen Kriterien gegeben ist.

Nativ kontaminierte Feldproben

Für die Überprüfung der Leistungsfähigkeit der IMS-real-time PCR-Methode im Vergleich zum Referenzverfahren erfolgte auch an nativ kontaminierten Fleischproben ($n = 491$). Legt man im kulturellen Verfahren eine Inkubationsdauer von 48 h sowohl für das SC- als auch das RVS-Medium zugrunde (SC 48 h/RVS 48 h), ergab sich für die Schnellmethode eine Spezifität von 99,3 % (Falsch-Positive Rate: 0,7 %) und eine Sensitivität von 84 % (Falsch-Negativ-Rate: 16 %). Die relative Richtigkeit lag bei 98 %. Der Konkordanzindex κ zeigte mit einem Wert von 0,87 die Übereinstimmung beider Methoden nach statistischen Kriterien an.

Die IMS-real-time PCR-Methode eignet sich als spezifisches, sensitives und schnelles Screeningverfahren für den Nachweis von *Salmonella* spp. aus Fleisch. Da die Schnellmethode kein lebendes Isolat zur epidemiologischen Typisierung liefert, wird die parallele Anwendung des kulturellen Verfahrens mit der Schnellmethode empfohlen. Neben der kulturellen Absicherung eines *Salmonella*-positiven Screeningergebnisses erhält man zusätzlich aus dem kulturellen Verfahren ein lebensfähiges Isolat für weitere epidemiologische Untersuchungen.

G Summary

For the detection of *Salmonella* spp. in meat an IMS-real-time PCR-method was established and validated with the method L 00.00-20 of the Official Collection of Methods of Analysis according to §35 of the German Law on Food and Commodities. The validation was carried out with artificially and naturally contaminated meat samples.

Preliminary tests on the growth behaviour of *S. Enteritidis* DSM 9898 (10 cfu/ml; pure culture) in presence of ferrioxamine E and an “enterobacterial autoinducer of growth” (AI) showed no significant ($\alpha = 0,05$) growth promotion compared with the control group after cultural analysis. After an incubation time of 4 hours as well as 6 hours, the determination of the DNA content by real-time PCR didn't show lower crossing points either and thus no indicated increase of the DNA amount compared with the control.

Tests for the differentiation between viable and dead *S. Enteritidis* DSM 9898 were conducted by IMS (without preenrichment) and real-time PCR (4 hours preenrichment; 37 °C) from pure cultures. IMS was able to separate heat-inactivated (96 °C; 10 min) cells which were detectable with real-time PCR. A preenrichment step and related with it a multiplication of viable cells allows the differentiation between viable and dead cells from pure cultures by the determination of the difference of the crossing points before and after the enrichment step. For a bacterial concentration of 10^5 - 10^1 cfu/ml there is a significant ($\alpha = 0,05$) difference in the differences of the crossing points of viable and dead cells before and after an enrichment step.

It is possible to distinguish between viable and heat-inactivated (96 °C; 10 min) *S. Enteritidis* DSM 9898 from meat by a combination of IMS with real-time PCR after an enrichment of 6 hours for bacterial concentrations of 1-100 cfu/25 g.

An accurate comparison of the IMS-real-time PCR-method with the reference method according to §35 of the German Law on Food and Commodities was achieved because both methods analysed the same preenrichment. The rapid method includes a non-selective preenrichment for 6 hours, an IMS, lysis-buffer proteinase K DNA extraction as well as DNA purification followed by real-time PCR analysis (detection format: hybridisation probes). A result, which is confirmed with the help of hybridisation probes, is available after 12 to 13 hours.

Artificially contaminated meat samples

The efficiency of the IMS-real-time PCR-method was controlled with the reference method with artificially (*S. Enteritidis* DSM 9898) contaminated meat. For bacterial concentrations of 1 cfu/25 g and 10 cfu/25 g, the tests were carried out 12 times and for bacterial concentrations of 100 cfu/25 g and 0 cfu/25 g, the tests were carried out 6 times. The detection limit of both methods was 10 cfu/25 g (recovery rate: 100 % of both methods). Compared with the reference method (SC 48 h/RVS 48 h) the IMS-real-time PCR-method achieved a specificity of 80 % (false-positive-rate of 20 %) and a sensitivity of 100 % (false-negative-rate of 0 %). The relative accuracy was 94 %. The concordance index κ , that defines the statistical accordance showed 0,85 what indicates that the IMS-real-time PCR-method and the cultural reference method agree on statistical criteria.

Naturally contaminated meat samples

The examination of the efficiency of the IMS-real-time PCR-method compared with the reference method was also carried out with naturally contaminated meat samples (n = 491). If an incubation time of 48 hours is based on the reference method for both the Selenite-Cystine medium and the Rappaport-Vassiliadis medium, the real-time PCR showed a specificity of 99,3 % (false-positive-rate of 0,7 %) and a sensitivity of 84 % (false-negative-rate of 16,3 %). The relative accuracy was 98 %. The concordance index κ indicated with a value of 0,87 that both methods statistically agree.

The IMS-real-time PCR-method is suitable as specific, sensitive and rapid screening method for the detection of *Salmonella* spp. from meat. The rapid method provides no viable isolate for epidemiological typing. Therefore the parallel application of the cultural reference method and of the IMS-real-time PCR-method is recommended. Besides the cultural assurance of the *Salmonella*-positive screening results, you get additional viable isolates through the cultural method for further epidemiological examinations.

H Literaturverzeichnis

AABO, S.; J.K. ANDERSEN; J.E. OLSEN (1995)

Research note: Detection of *Salmonella* in minced meat by the polymerase chain reaction method.

Lett Appl Microbiol 21(3), 180-182

ALLEN, G.; V.R. BRUCE; P. STEPHENSON; F.B. SATCHELL; W.H. ANDREWS (1991)

Recovery of *Salmonella* from high-moisture foods by abbreviated selective enrichment.

J Food Prot 54(7), 492-495

ALPERS, K. UND A. JANSEN (2004)

Infektionen mit Salmonellen beim Menschen.

In: HARTUNG, M. (Hrsg.), Epidemiologische Situation der Zoonosen in Deutschland im Jahr 2003. Berlin, 15-18

ALTIER, C. (2005)

Genetic and environmental control of *Salmonella* invasion.

J Microbiol 43(S), 85-92

ANDERSEN, E.S.; S.R. WARD; M.J. DE SAXE; J.D.H. DE SA (1977)

Bacteriophage-typing designations of *Salmonella* Typhimurium.

J Hyg Camb 78, 297-300

ANDREWS, W.H. (1986)

Resuscitation of injured *Salmonella* spp. and coliforms from foods.

J Food Prot 49(1), 62-75

ANONYMUS (1998)

Untersuchung von Lebensmitteln - Horizontales Verfahren für den Nachweis von Salmonellen (L 00.00.20).

In: BUNDESINSTITUT FÜR GESUNDHEITLICHEN VERBRAUCHERSCHUTZ UND VETERINÄRMEDIZIN (Hrsg.), Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §35 LMBG.

Beuth Verlag, Berlin

ANONYMUS (2003a)

Update zu einer Häufung von *Salmonella*-Agona-Infektionen bei Kleinkindern.

Epidem Bull 29, 224

ANONYMUS (2003b)

Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln - Horizontales Verfahren zum Nachweis von *Salmonella* spp. (ISO 6579:2002); Deutsche Fassung EN ISO 6579:2002.

Beuth Verlag GmbH, Berlin

ANONYMUS (2004)

Salmonella Anatum – vermehrte Infektionen im Jahr 2003.

Epidem Bull 7, 53-56

ANONYMUS (2005a)

Aktuelle Statistik meldepflichtiger Infektionskrankheiten.

Epidem Bull 3, 18

ANONYMUS (2005b)

Zum vermehrten Auftreten von *S. Bovismorbificans*.

Epidem Bull 5, 42

ANONYMUS (2005c)

Gebrauchsinformation Dynabeads[®] anti-*Salmonella*.

Dynal Biotech ASA, Oslo, Norwegen

ANONYMUS (2005d)

Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln – Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zum Nachweis von pathogenen Mikroorganismen in Lebensmitteln – Allgemeine Anforderungen und Begriffe (ISO 22174:2005); Deutsche Fassung EN ISO 22174:2005.

Beuth Verlag GmbH, Berlin

ANONYMUS, 1996

Merck Mikrobiologie Handbuch.

Merck KGaA, Darmstadt

- ASHKENAZI, S.; T.G. CLEARY; B.E. MURRAY; A. WAGNER; L.K. PICKERING (1988)
Quantitative analysis and partial characterization of cytotoxin production by *Salmonella* strains.
Infect Immun 56(12), 3089-3094
- BAILEY, J.S.; N.A. COX; L.C. BLANKENSHIP (1991)
A comparison of an enzyme immunoassay, DNA hybridization, antibody immobilization, and conventional methods for recovery of naturally occurring salmonellae from processed broiler carcasses.
J Food Prot 54(5), 354-356
- BAUER, J UND S. HÖRMANSDORFER (1995)
Salmonellose bei Nutztieren.
Fleischwirtschaft 75(8), 958-960
- BÄUMLER, A.J.; F. HEFFRON; R. REISSBRODT (1997)
Rapid detection of *Salmonella enterica* with primers specific for *iroB*.
J Clin Microbiol 35(5), 1224-1230
- BAYLIS, C.L.; S. MACPHEE; R.P. BETTS (2000a)
Comparison of two commercial preparations of buffered peptone water for the recovery and growth of *Salmonella* bacteria from foods.
J Appl Microbiol 89(3), 501-510
- BAYLIS, C.L.; S. MACPHEE; R.P. BETTS (2000b)
Comparison of methods for the recovery and detection of low levels of injured *Salmonella* in ice cream and milk powder.
Lett Appl Microbiol 30, 320-324
- BECKERS, H.J.; J.V.D. HEIDE; U. FENIGSEN-NARUCKA; R. PETERS (1987)
Fate of salmonellas and competing flora in meat sample enrichments in buffered peptone water and in Muller-Kauffmann's tetrathionate medium.
J Appl Bacteriol 62(2), 97-104

BECKERS, H.J.; P.D. TIPS; P.S.S. SOENTORO; E.H.M. DELFGOU-VAN ASCH; R. PETERS (1988)

The efficacy of enzyme immunoassay for the detection of salmonellas.

Food Microbiol 5, 147-156

BEJ, A.K.; M.H. MAHBUBANI; M.J. BOYCE; R.M. ATLAS (1994)

Detection of *Salmonella* spp. in oysters by PCR.

Appl Environ Microbiol 60(1), 368-373

BELL, C. UND A. KYRIAKIDES (2002)

Salmonella.

Blackwell Science Ltd., Oxford

BENOIT, P.W. UND D.W. DONAHUE (2003)

Methods for rapid separation and concentration of bacteria in food that bypass time-consuming cultural enrichment.

J Food Prot 66(10), 1935-1948

BERENDS, B.R.; F. VAN KNAPEN; J.M.A. SNIJDERS; D.A.A. MOSSEL (1997)

Identification and quantification of risk factors regarding *Salmonella* spp. on pork carcasses.

Int J Food Microbiol 36, 199-206

BIRCH, L.; C.E. DAWSON; J.H. CORNETT; J.T. KEER (2001)

A comparison of nucleic acid amplification techniques for the assessment of bacterial viability.

Lett Appl Microbiol 33, 296-301

BIRD, J.A.; M.C. EASTER; S. GAYE HADFIELD; E. MAY; M.F. STRINGER (1989)

Rapid *Salmonella* detection by a combination of conductance and immunological techniques.

In: STANNARD, C.J.; S.B. PETITT; F.A. SKINNER (Hrsg.), Rapid microbiological methods for foods, beverages and pharmaceuticals. Blackwell Scientific Publications, London, 165-183

- BISPING, W. (1993)
Salmonellen in Futtermitteln.
Dtsch Tierärztl Wschr 100(7), 262-263
- BLACKBURN, C. (1993)
Rapid and alternative methods for the detection of salmonellas in food.
J Appl Bacteriol 75, 199-214
- BLACKBURN, W.; P.D. PATEL; P.A. GIBBS (1991)
Separation and detection of salmonellae using immunomagnetic particles.
Biofouling 5, 143-156
- BLASER M.J. UND L.S. NEWMAN (1982)
A review of human salmonellosis: I. Infective dose.
Rev Infect Dis 4(6), 1096-1106
- BLIVET, D.; G. SALVAT; F. HUMBERT; P. COLIN (1998)
Development of a new culture medium for the rapid detection of *Salmonella* by indirect conductance measurement.
J Appl Microbiol 84, 399-403
- BOES, J.; J. DAHL; B. NIELSEN; H.H. KROG (2001)
Effect of separate transport, lairage, and slaughter on occurrence of *Salmonella* Typhimurium on slaughter carcasses.
Berl Münch Tierärztl Wschr 114, 363-365
- BRENNER, D.J. (1984)
Family I. *Enterobacteriaceae*.
In: KRIEG, N.R. UND J.G. HOLT (Hrsg.), Bergey's manual of systematic bacteriology, Volume 1. Williams & Wilkins, Baltimore, 408-420
- BRENNER, F.W.; R.G. VILLAR; F.J. ANGULO; R. TAUXE; B. SWAMINATHAN (2000)
Salmonella nomenclature.
J Clin Microbiol 38(7), 2465-2467

CARON NEBE-VON, G.; P. STEPHENS; R.A. BADLEY (1998)

Assessment of bacterial viability status by flow cytometry and single cell sorting.

J Appl Microbiol 84, 988-998

CHAN, A.B. UND J.D. FOX (1999)

NASBA and other transcription-based amplification methods for research and diagnostic microbiology.

Rev Med Microbiol 10(4), 185-196

CHAPMAN, P.A. UND K.S. CUDJOE (2001)

Evaluation of Beadretreiver™, an automated system for concentration of *Escherichia coli* O157 from enrichment cultures by immunomagnetic separation.

Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology 9, 203-214

CHEN, S.; A. YEE; M. GRIFFITHS; C. LARKIN; C.T. YAMASHIRO; R. BEHARI; C. PASZKO-KOLVA; K. RAHN; S.A. DE GRANDIS (1997)

The evaluation of a fluorogenic polymerase chain reaction assay for the detection of *Salmonella* species in food commodities.

Int J Food Microbiol 35, 239-250

CHEVRIER, D.; M.Y. POPOFF; M.P. DION; D. HERMANT; J.-L. GUESDON (1995)

Rapid detection of *Salmonella* subspecies I by PCR combined with non-radioactive hybridisation using covalently immobilised oligonucleotide on a microplate.

FEMS Immunol Med Microbiol 10, 245-252

CHOPRA, A.K.; C.W. HUSTON; J.W. PETERSON; J.J. MEKALANOS (1987)

Chromosomal DNA contains the gene coding for *Salmonella* enterotoxin.

FEMS Microbiol Lett 43, 345-349

CLAY, C.E. UND R.G. BOARD (1991)

Growth of *Salmonella* Enteritidis in artificially contaminated hens' shell eggs.

Epidemiol Infect 106, 271-281

CLEMENTS, M.; S. ERIKSSON; D. TEZCAN-MERDOL; J.C.D. HINTON; M. RHEN (2001)

Virulence gene regulation in *Salmonella enterica*.

Ann Med 33, 178-185

CLOAK, O.M.; B.T. SOLOW; C.E. BRIGGS; C.-Y. CHEN; P.M. FRATAMICO (2002)

Quorum sensing and production of autoinducer-2 in *Campylobacter* spp., *Escherichia coli* O157:H7, and *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium in foods.

Appl Environ Microbiol 68(9), 4666-4671

COLEMAN, D.J.; K.E. CHICK; K.J. NYE (1995a)

An evaluation of immunomagnetic separation for the detection of salmonellas in raw chicken carcasses.

Lett Appl Microbiol 21, 152-154

COLEMAN, D.J.; K.J. NYE; K.E. CHICK; C.M. GAGG (1995b)

A comparison of immunomagnetic separation plus enrichment with conventional *Salmonella* culture in the examination of raw sausages.

Lett Appl Microbiol 21, 249-251

COLLAZO C.M. UND J.E. GALÁN (1997)

The invasion-associated type-III protein secretion system in *Salmonella* – a review.

Gene 192, 51-59

COOK, V.M.; R.J. MILES; R.G. PRICE; A.C. RICHARDSON (1999)

A novel chromogenic ester agar medium for detection of salmonellae.

Appl Environ Microbiol 65(2), 807-812

COX, N.A.; D.Y.C. FUNG; M.C. GOLDSCHMIDT; J.S. BAILEY; J.E. THOMSON (1984)

Selecting a miniaturized system for identification of *Enterobacteriaceae*.

J Food Prot 47(1), 74-77

CUDJOE, K.S. UND R. KRONA (1997)

Detection of *Salmonella* from raw food samples using Dynabeads® anti-*Salmonella* and a conventional reference method.

Int J Food Microbiol 37, 55-62

CUDJOE, K.S.; L.I. THORSEN; T. SØRENSEN; J. RESELAND; Ø. OLSVIK; P.E. GRANUM (1991)

Detection of *Clostridium perfringens* type A enterotoxin in faecal and food samples using immunomagnetic separation (IMS)-ELISA.

Int J Food Microbiol 12, 313-322

CUDJOE, K.S.; R. KRONA; B. GRØN; E. OLSEN (1994a)

Use of ferrous sulphate and immunomagnetic separation to recover *Salmonella* Enteritidis from raw eggs.

Int J Food Microbiol 23, 149-158

CUDJOE, K.S.; R. KRONA; E. OLSEN (1994b)

IMS: A new selective enrichment technique for detection of *Salmonella* in foods.

Int J Food Microbiol 23, 159-165

CUDJOE, K.S.; TH. HAGTVEDT; R. DAINY (1995)

Immunomagnetic separation of *Salmonella* from foods and their detection using immunomagnetic particle (IMP)-ELISA.

Int J Food Microbiol 27, 11-25

CUI, S.; C.M. SCHROEDER; D.Y. ZHANG; J. MENG (2003)

Rapid sample preparation method for PCR-based detection of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef.

J Appl Microbiol 95, 129-134

D'AOUST, J.-Y. (1981)

Update on preenrichment and selective enrichment conditions for detection of *Salmonella* in foods.

J Food Prot 44(5), 369-374

D'AOUST, J.-Y. (1984)

Salmonella detection in foods: Present status and research needs for the future.

J Food Prot 47(1), 78-81

D'AOUST, J.-Y. (1989)

Salmonella.

In: DOYLE, M.P. (Hrsg.), Foodborne bacterial pathogens. Marcel Dekker, Inc., New York, 327-445

D'AOUST, J.-Y. (1991a)

Pathogenicity of foodborne *Salmonella*.

Int J Food Microbiol 12, 17-40

D'AOUST, J.-Y. (1991b)

Psychrotrophy and foodborne *Salmonella*.

Int J Food Microbiol 13, 207-216

D'AOUST, J.-Y. (1997)

Salmonella Species.

In: DOYLE, M.P.; L.R. BEUCHAT; T.J. MONTVILLE (Hrsg.), Food microbiology: Fundamentals and frontiers. American Society for Microbiology, Washington, 129-158

D'AOUST, J.-Y. UND A.M. SEWELL (1988a)

Detection of *Salmonella* with the BioEnzabeadTM enzyme immunoassay technique.

J Food Prot 51(7), 538-541

D'AOUST, J.-Y. UND A.M. SEWELL (1988b)

Reliability of the immunodiffusion 1-2 TestTM system for detection of *Salmonella* in foods.

J Food Prot 51(11), 853-856

D'AOUST, J.-Y. UND C. MAISHMENT (1979)

Preenrichment conditions for effective recovery of *Salmonella* in foods and feed ingredients.

J Food Prot 42(2), 153-157

D'AOUST, J.-Y.; A. SEWELL; J. JEAN (1990a)

Limited sensitivity of short (6 h) selective enrichment for detection of foodborne *Salmonella*.

J Food Prot 53(7), 562-565

D'AOUST, J.-Y.; A.M. SEWELL; A. JEAN (1992a)

Efficacy of prolonged (48 h) selective enrichment for the detection of foodborne *Salmonella*.

Int J Food Microbiol 15, 121-130

D'AOUST, J.-Y.; A.M. SEWELL; D.W. WARBURTON (1992b)

A comparison of standard cultural methods for the detection of foodborne *Salmonella*.

Int J Food Microbiol 16, 41-50

D'AOUST, J.-Y.; C. MAISHMENT; P. STOTLAND; A. BOVILLE (1982)

Surfactants for the effective recovery of *Salmonella* in fatty foods.

J Food Prot 45(3), 249-252

D'AOUST, J.-Y.; E. DALEY; A.M. SEWELL (1990b)

Performance of the microplate BacTrace™ ELISA technique for detection of foodborne *Salmonella*.

J Food Prot 53(10), 841-845

DANIELS, M.J.; M.R. HUTCHINGS; A. GREIG (2003)

The risk of disease transmission to livestock posed by contamination of farm stored feed by wildlife excreta.

Epidemiol Infect 130, 561-568

DAVIS, B.D.; S.M. LUGER; P.C. TAI (1986)

Role of ribosome degradation in the death of starved *Escherichia coli* cells.

J Bacteriol 166(2), 439-445

DE BOER, E. (1998)

Update on media for isolation of *Enterobacteriaceae* from foods.

Int J Food Microbiol 45, 43-53

- DE MEDICI, D.; S. CROCI; E. DELIBATO; S. DI PASQUALE; E. FILATICI; L. TOTI (2003)
Evaluation of DNA extraction methods for use in combination with SYBR Green I real-time PCR to detect *Salmonella enterica* Serotype Enteritidis in poultry.
Appl Environ Microbiol 69(6), 3456-3461
- DE SILVA, D.; A. REISER; M. HERRMANN; K. TABITI; C. WITWER (1998)
Rapid genotyping and quantification on the LightCycler™ with hybridization probes.
Biochemica 2, 12-15
- DE SMEDT, J.M.; R.F. BOLDERDIJK, H. RAPPOLD; D. LAUTENSCHLAEGER (1986)
Rapid *Salmonella* detection in foods by motility enrichment on a modified semi-solid Rappaport-Vassiliadis medium.
J Food Prot 49(7), 510-514
- DEVENISH, J.A.; B.W. CIEBIN; M.H. BRODSKY (1986)
Novobiocin-Brilliant Green-Glucose agar: New medium for isolation of salmonellae.
Appl Environ Microbiol 52(3), 539-545
- DIDENKO, V.V. (2001)
DNA probes using fluorescence resonance energy transfer (FRET): Design and applications.
Biotechniques 31(5), 1106-1121
- DIRITA, V.J. UND P.A. COTTER (2000)
Bacterial virulence gene regulation: An evolutionary perspective.
Annu Rev Microbiol 54, 519-565
- DOCHERTY, L.; M.R. ADAMS; P. PATEL; J. MCFADDEN (1996)
The magnetic immuno-polymerase chain reaction assay for the detection of *Campylobacter* in milk and poultry.
Lett Appl Microbiol 22, 288-292
- DONAGHY, J.A. UND R.H. MADDEN (1993)
Detection of *Salmonella* in animal protein by Rappaport-Vassiliadis broth using indirect impedimetry.
Int J Food Microbiol 17, 281-288

DUNCANSON, P.; D.R.A. WAREING; O. JONES (2003)

Application of an automated immunomagnetic separation-enzyme immunoassay for the detection of *Salmonella* spp. during an outbreak associated with a retail premises.

Lett Appl Microbiol 37, 144-148

DZIADKOWIEC, D.; L.P. MANSFIELD; S.J. FORSYTHE (1995)

The detection of *Salmonella* in skimmed milk powder enrichments using conventional methods and immunomagnetic separation.

Lett Appl Microbiol 20, 361-364

EASTER, M.C. (1985)

Rapid and automated detection of *Salmonella* by electrical measurements.

J Hyg Camb 94, 245-262

ECKNER, K.F.; R.S. FLOWERS; B.J. ROBINSON; J.A. MATTINGLY; D.A. GABIS; J.H. SILLIKER (1987)

Comparison of *Salmonella* BioEnzaBead™ immunoassay method and conventional culture procedure for detection of *Salmonella* in foods.

J Food Prot 50(5), 379-385

EDEL, W. UND E.H. KAMPELMACHER (1969)

Salmonella isolation in nine european laboratories using a standardized technique.

Bull Wld Hlth Org 41, 297-306

ELLINGSON, J.L.E.; J.L. ANDERSON; S.A. CARLSON; V.K. SHARMA (2004)

Twelve hour real-time PCR technique for the sensitive and specific detection of *Salmonella* in raw and ready-to-eat meat products.

Mol Cell Probes 18, 51-57

ERIKSSON, S. (2003)

Unravelling the biology of macrophages infection by gene expression profiling of intracellular *Salmonella enterica*.

Mol Microbiol 47(1), 103-118

- EROL, I.; J. KLEER; G. HILDEBRANDT; A. YURTYERI (1999)
Kopplung von immunomagnetischer Separation und Polymerase-Kettenreaktion zum Schnellnachweis von Salmonellen in Hackfleisch und Geflügelinnereien.
Berl Münch Tierärztl Wschr 112, 100-103
- FAGERBERG, D.J. UND J.S. AVENS (1976)
Enrichment and plating methodology for *Salmonella* detection in food. A review.
J Milk Food Technol 39(9), 628-646
- FAVRIN, S.J.; S.A. JASSIM; M.W. GRIFFITHS (2001)
Development and optimization of a novel immunomagnetic separation-bacteriophage assay for detection of *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis in broth.
Appl Environ Microbiol 67(1), 217-224
- FEY, A.; S. EICHLER; S. FLAVIER; R. CHRISTEN; M.G. HÖFLE; C.A. GUZMÁN (2004)
Establishment of a real-time PCR-based approach for accurate quantification of bacterial RNA targets in water, using *Salmonella* as a model organism.
Appl Environ Microbiol 70(6), 3618-3623
- FINLAY, B.B. UND S. FALKOW (1997)
Common themes in microbial pathogenicity revisited.
Microbiol Mol Biol Rev 61(2), 136-169
- FITTS, R.; M. DIAMOND; C. HAMILTON; M. NERI (1983)
DNA-DNA hybridization assay for detection of *Salmonella* spp. in food.
Appl Environ Microbiol 46(5), 1146-1151
- FLOWERS, R. UND M.J. KLATT (1989)
Immunodiffusion screening method for detection of motile *Salmonella* in foods: Collaborative study.
J Assoc Off Anal Chem 72(2), 303-311
- FLOWERS, R.S.; M.A. MOZOLA; M.S. CURIALE; D.A. GABIS; J.H. SILLIKER (1987)
Comparative study of a DNA hybridization method and the conventional culture procedure for detection of *Salmonella* in foods.
J Food Sci 52(3), 781-785

- FLUIT A.C.; M.N. WIDJOJOATMODJO; A.T.A. BOX; R. TORENSMA; J. VERHOEF (1993)
Rapid detection of salmonellae in poultry with the magentic immuno-polymerase chain reaction assay.
Appl Environ Microbiol 59(5), 1342-1346
- FREESTONE, P.P.E.; M. LYTE; C.P. NEAL; A.F. MAGGS; R.D. HAIGH; P.H. WILLIAMS (2000)
The mammilian neuroendocrine hormone norepinephrine supplies iron for bacterial growth in the presence of transferrin or lactoferrin.
J Bacteriol 182(21), 6091-6098
- FREESTONE, P.P.E.; R.D. HAIGH; P.H. WILLIAMS; M. LYTE (1999)
Stimulation of bacterial growth by heat-stable, norepinephrine-induced autoinducers.
FEMS Microbiol Lett 172, 53-60
- FRIES, R. UND U. STEINHOF (1997)
Growth kinetics of *Salmonella* in mixed cultures incubated in Rappaport-Vassiliadis medium.
Food Microbiol 14, 505-513
- FROMM, D.; R.A. GIANELLA; S.B. FORMAL; R. QUIJANO; H. COLLINS (1974)
Ion transport across isolated ileal mucosa invaded by *Salmonella*.
Gastroenterology 66, 215-225
- FUJII, S; M. TAKAI; T. MAKI (2002)
Wet heat inactivation of lipopolysaccharide from *E. coli* Serotype O55:B5.
PDA J Pharm Sci Technol 56(4), 220-227
- GALÁN, J.E. (2001)
Salmonella interactions with host cells: Type III secretion at work.
Annu Rev Cell Dev Biol 17, 53-86
- GAREIS, M. (1995)
Salmonellen – ein Überblick.
Fleischwirtschaft 75(8), 954-957

GARIBALDI, J.A. (1960)

Factors in egg white which control growth of bacteria.

Food Res 25, 337-344

GISSEL, C. (1993)

Keimvermehrung in Lebensmitteln.

Dtsch Tierärztl Wschr 100(7), 280-282

GRAY, J.T. UND P. FEDORKA-CRAY (2002)

Salmonella.

In: CLIVER, D.O. UND H.P. RIEMANN (Hrsg.), Foodborne diseases. Academic Press, London, 55-68

GROSSMAN, N; M.A. SCHMETZ; J. FOULDS; E.N. KLIMA; V. JIMINEZ; L.L. LEIVE; K.A. JOINER (1987)

Lipopolysaccharide size and distribution determine serum resistance in *Salmonella* Montevideo.

J Bacteriol 169(2), 856-863

GULIG, P.A.; H. DANBARA; D.G. GUINEY; A.J. LAX; F. NOREL; M. RHEN (1993)

Molecular analysis of *spv* virulence genes of the *Salmonella* virulence plasmids.

Mol Microbiol 7(6), 825-830

HALD, T.; A. WINGSTRAND; M. SWANENBURG; A. VON ALTROCK; B.-M. THORBERG (2003)

The occurrence and epidemiology of *Salmonella* in european pig slaughterhouses.

Epidemiol Infect 131, 1187-1203

HANSEN-WESTER, I. UND M. HENSEL (2001)

Salmonella pathogenicity islands encoding type III secretion systems.

Microbes Infect 3, 549-559

HARTUNG, M. (2004)

Mitteilungen der Länder über *Salmonella*-Nachweis in Deutschland.

In: HARTUNG, M. (Hrsg.), Epidemiologische Situation der Zoonosen in Deutschland im Jahr 2003. Berlin, 21-114

HARVEY, W.S. UND T.H. PRICE (1981)

Comparison of selenite F, Muller-Kauffmann tetrathionate and Rappaport's medium for *Salmonella* isolation from chicken giblets after pre-enrichment in buffered peptone water.

J Hyg Camb 87, 219-224

HASHIMOTO, Y.; Y. ITHO; Y. FUJINAGA; A.Q. KHAN; F. SULTANA; M. MIYAKE; K. HIROSE; H. YAMAMOTO; T. EZAKI (1995)

Development of nested PCR based on the *viaB* sequence to detect *Salmonella* Typhi.

J Clin Microbiol 33(3), 775-777

HATTENDORF, P. UND M. BÜLTE (1997)

Vergleichende Untersuchungen zum Nachweis von Salmonellen aus Hackfleisch mit Immunomagnetischer Separation (IMS) und Polymerase-Kettenreaktion (PCR).

In: 38. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes „Lebensmittelhygiene“ der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft e.V. vom 29.9.-2.10.1997 in Garmisch-Partenkirchen, 122-129

HELLYER, T.J. (2001)

Detection of viable *Mycobacterium tuberculosis* by reverse transcriptase-strand displacement amplification of mRNA.

Methods Mol Med 48, 141-155

HENSIEK, R. (1994)

Magnetische Separationstechnologie als neue Methode in der Mikrobiologie.

In: Schnellmethoden und Automatisierung in der Lebensmittel-Mikrobiologie. Symposium, 29.6. bis 1.7.1994, Lemgo, 41-44

HERMAN, L. (1997)

Detection of viable and dead *Listeria monocytogenes* by PCR.

Food Microbiol 14, 103-110

HILL, W.E. UND S.P. KEASLER (1991)

Identification of foodborne pathogens by nucleic acid hybridization.

Int J Food Microbiol 12, 67-76

HOLT, P.S.; R.K. GAST; C.R. GREENE (1995)

Rapid detection of *Salmonella* Enteritidis in pooled liquid egg samples using a magnetic bead-ELISA system.

J Food Prot 58(9), 967-972

HOORFAR, J. UND N. COOK (2002)

Critical aspects of standardization of PCR.

Methods Mol Biol 216, 51-64

HOORFAR, J.; B. MALORNY; A. ABDULMAWJOOD; N. COOK; M. WAGNER; P. FACH (2004)

Practical considerations in design of internal amplification controls for diagnostic PCR assays.

J Clin Microbiol 42(5), 1863-1868

HOORFAR, J.; N. COOK; B. MALORNY; M. WAGNER; D. DE MEDICI; A. ABDULMAWJOOD; P. FACH (2003)

Making internal amplification control mandatory for diagnostic PCR.

J Clin Microbiol 41(12), 5835

HORNES, E.; Y. WASTESON; Ø. OLSVIK (1991)

Detection of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin genes in pig stool specimens by an immobilized, colorimetric, nested polymerase chain reaction.

J Clin Microbiol 29(11), 2375-2379

HÜBNER, P.; S. GAUTSCH; T. JEMMI (2002)

In house-Validierung mikrobiologischer Prüfverfahren.

Mitt Lebensm Hyg 93, 118-139

HURD, H.S.; J.D. MCKEAN; I.V. WESLEY; L.A. KARRIKER (2001)

The effect of lairage on *Salmonella* isolation from market swine.

J Food Prot 64(7), 939-944

JEFFRIES, L. (1959)

Novobiocin-tetrathionate broth: A medium of improved selectivity for the isolation of salmonellae from faeces.

J Clin Path 12, 568-571

JENÍKOVA, G.; A.N. JENSEN; K. DEMNEROVÁ; J. HOORFAR (2001)

Rapid purification of *Salmonella* DNA in minced meat and detection by real-time PCR.

Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology 9, 135-141

JENÍKOVA, G.; J. PAZLAROVÁ; K. DEMNEROVÁ (2000)

Detection of *Salmonella* in food samples by the combination of immunomagnetic separation and PCR assay.

Int Microbiol 3, 225-229

JITRAPAKDEE, S.; A. TASSANAKAJON; V. BOONSAENG; S. PIANKIJAGUM; S. PANYIM (1995)

A simple, rapid and sensitive detection of *Salmonella* in food by polymerase chain reaction.

Mol Cell Probes 9, 375-382

JOHNE, B. UND J. JARP (1988)

A rapid assay for protein-A in *Staph. aureus* strains, using immunomagnetic monosized polymer particles.

APMIS 96, 43-49

JOHNE, B.; J. JARP; L.R. HAAHEIM (1989)

Staphylococcus aureus exopolysaccharide in vivo demonstrated by immunomagnetic separation and electron microscopy.

J Clin Microbiol 27(7), 1631-1635

JOINER, K.A. (1985)

Studies on the mechanism of bacterial resistance to complement-mediated killing and on the mechanism of action of bactericidal antibody.

Curr Top Microbiol Immunol 121, 99-133

JOOSTEN, H.M.L.J.; W.G.F.M. VAN DIJCK; F. VAN DER VELDE (1994)

Evaluation of motility enrichment on modified semisolid Rappaport-Vassiliadis medium (MSRV) and automated conductance in combination with Rambach agar for *Salmonella* detection in environmental samples of a milk powder factory.

Int J Food Microbiol 22, 201-206

JOSEPHSON, K.L.; C.P. GERBA; I.L. PEPPER (1993)

Polymerase chain reaction detection of nonviable bacterial pathogens.

Appl Environ Microbiol 59(10), 3513-3515

JUNE, G.A.; P.S. SHERROD; T.S. HAMMACK; R.M. AMAGUANA; W.H. ANDREWS (1996)

Relative effectiveness of Selenite Cystine broth, tetrathionate broth, and Rappaport-Vassiliadis medium for recovery of *Salmonella* spp. from raw flesh, highly contaminated foods, and poultry feed: Collaborative study.

J AOAC Int 79(6), 1307-1323

JUNE, G.A.; P.S. SHERROD; W.H. ANDREWS (1992)

Comparison of two enzyme immunoassays for recovery of *Salmonella* spp. from four low-moisture foods.

J Food Prot 55(8), 601-604

KAUFFMANN, F. (1930)

Ein kombiniertes Anreicherungsverfahren für Typhus- und Paratyphusbazillen.

Zbl Bakt I Abt Orig 119, 148-152

KAUFFMANN, F. (1935)

Weitere Erfahrungen mit dem kombinierten Anreicherungsverfahren für Salmonellabacillen.

Z Hyg Infekt Krkh 117, 26-32

KAYSER, F.H.; K.A. BIENZ; J. ECKERT; R.M. ZINKERNAGEL (1998)

Medizinische Mikrobiologie.

Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 9. Auflage

KEER, J.T. UND L. BIRCH (2003)

Molecular methods for the assessment of bacterial viability.

J Microbiol Methods 53, 175-183

KIMBROUGH, T.G. UND S.I. MILLER (2002)

Assembly of the type III secretion needle complex of *Salmonella* Typhimurium.

Microbes Infect 4, 75-82

KINGSLEY, R.; W. RABSCH; P. STEPHENS; M. ROBERTS; R. REISSBRODT; P.H. WILLIAMS (1995)

Iron supplying systems of *Salmonella* in diagnostics, epidemiology and infection.

FEMS Immunol Med Microbiol 11, 257-264

KINGSLEY, R.; W. RABSCH; P.H. WILLIAMS; R. REISSBRODT (1994)

Eisenversorgung bei Salmonellen in Diagnostik, Epidemiologie und im Infektionsprozeß.

Immun Infekt 22(1), 10-14

KINGSLEY, R.A.; R. REISSBRODT; W. RABSCH; J.M. KETLEY; R.M. TSOLIS; P. EVERST; G. DOUGAN; A.J. BÄUMLER; M. ROBERTS; P.H. WILLIAMS (1999)

Ferrioxamine-mediated iron(III) utilization by *Salmonella enterica*.

Appl Environ Microbiol 65(4), 1610-1618

KRÄMER, J. (1992)

Lebensmittelmikrobiologie.

Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart, 2. Auflage

KUBORI, T.; Y. MATSUSHIMA; D. NAKAMURA; J. URALIL; M. LARA-TEJERO; A. SUKHAN; J.E. GALÁN; S.-I. AIZAWA (1998)

Supramolecular structure of the *Salmonella* Typhimurium type III protein secretion system.

Science 280, 602-605

KUSHNER, S.R. (1996)

mRNA decay.

In: NEIDHARDT, F.C. (Hrsg.), *Escherichia coli* and *Salmonella* – cellular and molecular biology. ASM Press, Washington, 849-860

- KWANG, J.; E.T. LITTLEDIKE; J.E. KEEN (1996)
Use of the polymerase chain reaction for *Salmonella* detection.
Lett Appl Microbiol 22, 46-51
- LANTZ, P.-G.; B. HAHN-HÄGERDAL; P. RÅDSTRÖM (1994)
Sample preparation methods in PCR-based detection of food pathogens.
Trends in Food Science & Technology 5, 384-389
- LANTZ, P.-G.; W. ABU AL-SOUD; R. KNUTSSON; B. HAHN-HÄGERDAL; R. RÅDSTRÖM (2000)
Biotechnical use of polymerase chain reaction for microbiological analysis of biological samples.
Biotechnol Annu Rev 5, 87-130
- LE MINOR, L. (1984)
Genus III. *Salmonella*.
In: KRIEG, N.R. UND J.G. HOLT (Hrsg.), Bergey's manual of systematic bacteriology, Volume 1. Williams & Wilkins, Baltimore, 427-458
- LE MINOR, L. UND M.Y. POPOFF (1987)
Designation of *Salmonella enterica* sp. nov., nom. rev., as the type and only species of the genus *Salmonella*.
Int. J. Syst. Bact. 37, 465-468
- LEE, H.A.; G.M. WYATT; S. BRAMHAM; M.R.A. MORGAN (1990)
Enzyme-linked immunosorbent assay for *Salmonella* Typhimurium in food: Feasibility of 1-day *Salmonella* detection.
Appl Environ Microbiol 56(6), 1541-1546
- LILIC, M. UND C.E. STEBBINS (2004)
Re-structuring the host cell: Up close with *Salmonella*'s molecular machinery.
Microbes Infect 6, 1205-1211
- LIN, J.-S. UND H.-Y. TSEN (1999)
Development and use of polymerase chain reaction for the specific detection of *Salmonella* Typhimurium in stool and food samples.
J Food Prot 62(10), 1103-1110

LOSTROH, C.P. UND C.A. LEE (2001)

The *Salmonella* pathogenicity island-1 type III secretion system.

Microbes Infect 3, 1281-1291

LUCAS, R.L. UND C.A. LEE (2000)

Unravelling the mysteries of virulence gene regulation in *Salmonella* Typhimurium.

Mol Microbiol 36(5), 1024-1033

LUK, J.M.C. UND A.A. LINDBERG (1991)

Rapid and sensitive detection of *Salmonella* (O:6,7) by immunomagnetic monoclonal antibody-based assays.

J Immunol Methods 137, 1-8

LUND, A.; A.L. HELLEMANN; F. VARTDAL (1988)

Rapid isolation of K88⁺ *Escherichia coli* by using immunomagnetic particles.

J Clin Microbiol 26(12), 2572-2575

LYNCH, M.J.B.; C.G. LEON-VELARDE; S. MCEWEN; J.A. ODUMERU (2004)

Evaluation of an automated immunomagnetic separation method for the rapid detection of *Salmonella* species in poultry environmental samples.

J Microbiol Methods 58, 285-288

LYTE, M. UND S. ERNST (1992)

Catecholamine induced growth of Gram-negative bacteria.

Life Sci 50, 203-212

LYTE, M. UND S. ERNST (1993)

Alpha and beta adrenergic receptor involvement in catecholamine-induced growth of Gram-negative bacteria.

Biochem Biophys Res Commun 190(2), 447-452

LYTE, M.; C.D. FRANK; B.T. GREEN (1996)

Production of an autoinducer of growth by norepinephrine cultured *Escherichia coli* O157:H7.

FEMS Microbiol Lett 139, 155-159

MAHON, J. UND A.J. LAX (1993)

A quantitative polymerase chain reaction method for the detection in avian faeces of salmonellas carrying the *spvR* gene.

Epidemiol Infect 111, 455-464

MAHON, J.; C.K. MURPHY; P.W. JONES; P.A. BARROW (1994)

Comparison of multiplex PCR and standard bacteriological methods of detecting *Salmonella* on chicken skin.

Lett Appl Microbiol 19, 169-172

MAIJALA, R.; T. JOHANSSON; J. HIRN (1992)

Growth of *Salmonella* and competing flora in five commercial Rappaport-Vassiliadis (RV)-media.

Int J Food Microbiol 17, 1-8

MAKINO, S.; H. KURAZONO; M. CHONGSANGUAM; H. HAYASHI; H. CHEUN; S. SUZUKI; T. SHIRAHATA (1999)

Establishment of the PCR system specific to *Salmonella* spp. and its application for the inspection of food and fecal samples.

J Vet Med Sci 61(11), 1245-1247

MALORNY, B.; E. PACCASSONI; P. FACH; C. BUNGE; A. MARTIN; R. HELMUTH (2004)

Diagnostic real-time PCR for detection of *Salmonella* in food.

Appl Environ Microbiol 70(12), 7046-7052

MALORNY, B.; P.T. TASSIOS; P. RADSTRÖM; N. COOK; M. WAGNER; J. HOORFAR (2003)

Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens.

Int J Food Microbiol 83, 39-48

MANAFI, M. (2000)

New development in chromogenic and fluorogenic culture media.

Int J Food Microbiol 60, 205-218

MANSFIELD, L. UND S. FORSYTHE (1996)

Collaborative ring-trial of Dynabeads® anti-*Salmonella* for immunomagnetic separation of stressed *Salmonella* cells from herbs and spices.

Int J Food Microbiol 29, 41-47

MANSFIELD, L.P. UND S.J. FORSYTHE (1993)

Immunomagnetic separation as an alternative to enrichment broths for *Salmonella* detection.

Lett Appl Microbiol 16, 122-125

MANSFIELD, L.P. UND S.J. FORSYTHE (2000)

The detection of *Salmonella* using a combined immunomagnetic separation and ELISA end-detection procedure.

Lett Appl Microbiol 31, 279-283

MASSING, S. UND M. BÜLTE (2000)

Eine automatisierte immunomagnetische Separation (AIMS) zum Nachweis von Salmonellen.

In: 41. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes „Lebensmittelhygiene“ der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft e.V. vom 25.9.-28.9.2000 in Garmisch-Partenkirchen, 430-435

MASTERS, C.I.; J.A. SHALLCROSS; B.M. MACKEY (1994)

Effect of stress treatments on the detection of *Listeria monocytogenes* and enterotoxigenic *Escherichia coli* by the polymerase chain reaction.

J Appl Bacteriol 77, 73-79

MCINGVALE, S.C.; D. ELHANAFI; M.A. DRAKE (2002)

Optimization of reverse transcriptase PCR to detect viable shiga-toxin-producing *Escherichia coli*.

Appl Environ Microbiol 68(2), 799-806

- MCKILLIP, J.L.; L.-A. JAYKUS; M. DRAKE (1999)
Nucleic acid persistence in heat-killed *Escherichia coli* O157:H7 from contaminated skim milk.
J Food Prot 62(8), 839-844
- MCKILLIP, J.L. UND M. DRAKE (2000)
Molecular beacon polymerase chain reaction detection of *Escherichia coli* O157:H7 in milk.
J Food Prot 63(7), 855-859
- MCKILLIP, J.L. UND M. DRAKE (2004)
Real-time nucleic acid-based detection methods for pathogenic bacteria in food.
J Food Prot 67(4), 823-832
- MCKILLIP, J.L.; L.-A. JAYKUS; M. DRAKE (1998)
rRNA stability in heat-killed and UV-irradiated enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157:H7.
Appl Environ Microbiol 64(11), 4264-4268
- MEHNERT, W.H.; I. SCHÖNEBERG; A. AMMON (2001)
Infektionen mit Salmonellen beim Menschen.
In: HARTUNG, M. (Hrsg.), Bericht über die epidemiologische Situation der Zoonosen in Deutschland für 2000. Berlin, 23-26
- MERCANOGLU, B. UND M.W. GRIFFITHS (2005)
Combination of immunomagnetic separation with real-time PCR for rapid detection of *Salmonella* in milk, ground beef, and alfalfa sprouts.
J Food Prot 68(3), 557-561
- MILLER, R.G. UND E.T. MALLISON (2000)
Improved detection of nontyphoid and typhoid salmonellae with balanced agar formulations.
J Food Prot 63(10), 1443-1446

MOLLA, B.; J. KLEER; H.-J. SINELL (1994)

Detection of *Salmonella* in foods by immunomagnetic separation.

Archiv für Lebensmittelhygiene 45(5), 110-113

MOLLA, B.; J. KLEER; H.-J. SINELL (1996)

Kopplung von immunomagnetischer Separation und ELISA zum Schnelldachweis von Salmonellen in Lebensmitteln.

Fleischwirtschaft 76(7), 749-751

MULINDWA, D.K. UND O. PIETZSCH (1979)

Studies on the influence of competitive *Enterobacteriaceae* flora on *Salmonella* isolation.

Zbl Bakt Hyg I Abt Orig A 243, 336-348

MÜLLER, H.E. (2002)

Lebensmittelinfektionen und –vergiftungen.

Behr's Verlag, Hamburg, 1. Auflage

MULLER, L. (1923)

Un nouveau milieu d'enrichissement pour la recherche du bacille typhique et des paratyphiques.

Comp rend Soc biol 89, 434-437

MÜLLER, R.G. UND C.R. TATE (1991)

Xylose-Lysine-Tergitol 4: An improved selective agar medium for the isolation of *Salmonella*.

Poultry Sci 70, 2429-2432

NORTH, W.R. UND M.T. BARTRAM (1953)

The efficiency of Selenite broth of different compositions in the isolation of *Salmonella*.

Appl Microbiol 1, 130-134

O'DONOGHUE, D. UND E. WINN (1993)

Comparison of the MSRV method with an in-house conventional method for the detection of *Salmonella* in various high and low moisture foods.

Lett Appl Microbiol 17, 174-177

OBOEGBULEM, S.I. (1993)

Comparison of two enrichment media and three selective media for isolation of salmonellae from fresh chicken carcass rinse fluids and sewer swabs.

Int J Food Microbiol 18, 167-170

PARMAR, N.; M.C. EASTER; S.J. FORSYTHE (1992)

The detection of *Salmonella* Enteritidis and *S.*Typhimurium using immunomagnetic separation and conductance microbiology.

Lett Appl Microbiol 15, 175-178

PATEL, P.D. UND C. DE W. BLACKBURN (1991)

Detection of food-poisoning agents using immunomagnetic particles.

In: KEMSHEAD, J.T. (Hrsg.), Magnetic separation techniques applied to cellular and molecular biology. Wordsmiths' Conference Publications, Somerset, 93-105

PAYNE, M.J.; S. CAMPBELL; R.A. PATCHETT; R.G. KROLL (1992)

The use of immobilized lectins in the separation of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria* and *Salmonella* spp. from pure cultures and foods.

J Appl Bacteriol 73, 41-52

PERELLE, S.; F. DILASSER; B. MALORNY; J. GROUT; J. HOORFAR; P. FACH (2004)

Comparison of PCR-ELISA and LightCycler real-time PCR assays for detecting *Salmonella* spp. in milk and meat samples.

Mol Cell Probes 18, 409-420

PETERSON, J.W UND P.D. SANDEFUR (1979)

Evidence of a role for permeability factors in the pathogenesis of salmonellosis.

Am J Clin Nutr 32, 197-209

PLESS, P. UND R. REISSBRODT (1995)

Improvement of *Salmonella* detection on motility enrichment media by ferrioxamine E-supplementation of pre-enrichment culture.

Int J Food Microbiol 27, 147-159

POISSON, D.M.; N.D. BERTIN; E.A. PARIENTE; G. CALAMY (1988)

Salmonella Agona saccharose-positive: Etude bactériologique succincte et épidémiologique rétrospective a propos de 10 souches isolées au CHR d'Orléans.

Médecine et Maladies Infectieuses 10, 433-439

POPOFF, M.Y.; J. BOCKEMÜHL; L.L. GHEESLING (2002)

Supplement 2002 (no. 46) to the Kauffmann-White scheme.

Res Microbiol 155, 568-570

POPPE, C.; L.A. ELLIOT; C.L. DUNCAN (1996)

Evaluation of immunomagnetic separation in combination with modified semi-solid Rappaport Vassiliadis medium and Rambach agar for the isolation of *Salmonella*.

J Microbiol Methods 25, 237-244

RABSCH, W.; H. TSCHÄPE; A.J. BÄUMLER (2001)

Non-typhoidal salmonellosis: Emerging problems.

Microbes Infect 3, 237-247

RABSCH, W.; W. VOIGT; R. REISSBRODT; R.M. TSOLIS; A.J. BÄUMLER (1999)

Salmonella Typhimurium iroN and fepA proteins mediate uptake of enterobactin but differ in their specificity for other siderophores.

J Bacteriol 181(11), 3610-3612

RAHMAN, H.; R. REISSBRODT; H. TSCHÄPE (2000)

Effect of norepinephrine on growth of *Salmonella* and its enterotoxin production.

Indian J Exp Biol 38, 285-286

RAHN, K.; S.A. DE GRANDIS; R.C. CLARKE; S.A. MCEWEN; J.E. GALÁN; C. GINOCCHIO; R. CURTIS III; C.L. GYLES (1992)

Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella* Typhimurium by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*.

Mol Cell Probes 6, 271-279

RAMBACH, A. (1990)

New plate medium for facilitated differentiation of *Salmonella* spp. from *Proteus* spp. and other enteric bacteria.

Appl Environ Microbiol 56(1), 301-303

RAPPAPORT, F.; N. KONFORTI; B. NAVON (1956)

A new enrichment medium for certain salmonellae.

J Clin Path 9, 261-266

RASMUSSEN, R. (2001)

Quantification on the LightCycler.

In: MEUER, S.; C. WITTE; K. NAKAGAWARA (Hrsg.), Rapid cycle real-time PCR: Methods and applications. Springer Verlag, Berlin, 21-34

RASMUSSEN, R.; T. MORRISON; M. HERRMANN; C. WITTE (1998)

Quantitative PCR by continuous fluorescence monitoring of a double strand DNA specific binding dye.

Biochemica 2, 8-11

REISSBRODT, R. (1995)

Conventional and alternative methods for isolation and identification of *Salmonella* – an overview.

Biotest Bull 5, 143-156

REISSBRODT, R.; E. VIELITZ; E. KORMANN; W. RABSCH; H. KÜHN (1996)

Ferrioxamine E-supplemented pre-enrichment and enrichment media improve various isolation methods for *Salmonella*.

Int J Food Microbiol 29, 81-91

REISSBRODT, R.; H. HEIER; H. TSCHÄPE; R.A. KINGSLEY; P.H. WILLIAMS (2000)

Resuscitation by ferrioxamine E of stressed *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium from soil and water microcosms.

Appl Environ Microbiol 66(9), 4128-4130

REISSBRODT, R.; I. RIENAECKER; J.M. ROMANOVA; P.P.E. FREESTONE; R.D. HAIGH; M. LYTE; H. TSCHÄPE; P.H. WILLIAMS (2002)

Resuscitation of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium and enterohemorrhagic *Escherichia coli* from the viable but nonculturable state by heat-stable enterobacterial autoinducer. *Appl Environ Microbiol* 68(10), 4788-4794

REISSBRODT, R. UND W. RABSCH (1993)

Selective pre-enrichment of *Salmonella* from eggs by siderophore supplements. *Zbl Bakt* 279, 344-353

REXACH, L.; F. DILASSER; P. FACH (1994)

Polymerase chain reaction for *Salmonella* virulence-associated plasmid genes detection: A new tool in *Salmonella* epidemiology. *Epidemiol Infect* 112, 33-43

RHEN, M. UND C.J. DORMAN (2005)

Hierarchical gene regulators adapt *Salmonella enterica* to its host milieus. *Int J Med Microbiol* 294, 487-502

RHEN, M.; P. RIIKONEN; S. TAIRA (1993)

Transcriptional regulation of *Salmonella enterica* virulence plasmid genes in cultured macrophages. *Mol Microbiol* 10(1), 45-56

RICHTER, J.; H. BECKER; E. MÄRTLBAUER (2000)

Improvement in *Salmonella* detection in milk and dairy products: Comparison between the ISO method and the Oxoid SPRINT *Salmonella* test. *Lett Appl Microbiol* 31, 443-448

RIJPENS, N.; L. HERMAN; F. VEREECKEN; G. JANNES; J. DE SMEDT; L. DE ZUTTER (1999)

Rapid detection of stressed *Salmonella* spp. in dairy and egg products using immunomagnetic separation and PCR. *Int J Food Microbiol* 46, 37-44

RIJPENS, N.P. UND L.M.F. HERMAN (2002)

Molecular methods for identification and detection of bacterial food pathogens.

J AOAC Int 85(4), 984-995

RIPABELLI, G.; M.L. SAMMARCO; A. RUBERTO; G. IANNITTO; G.M. GRASSO (1997)

Immunomagnetic separation and conventional culture procedure for detection of naturally occurring *Salmonella* in raw pork sausages and chicken meat.

Lett Appl Microbiol 24, 493-497

RIRIE, K.M.; R.P. RASMUSSEN; C.T. WITWER (1997)

Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction.

Anal Biochem 245, 154-160

ROLLE, M. UND A. MAYR (2002)

Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre.

Enke Verlag, Stuttgart, 7. Auflage

ROSSEN, L.; P. NØRSKOV; K. HOLMSTRØM; O.F. RASMUSSEN (1992)

Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions.

Int J Food Microbiol 17, 37-45

RUIZ, J.; M.L. NÚÑEZ; J. DÍAZ; M.A. SEMPERE; J. GÓMEZ; M.A. USERA (1996)

Note: Comparison of media for the isolation of lactose-positive *Salmonella*.

J Appl Bacteriol 81, 571-574

RUIZ, J.; M.L. NÚÑEZ; M.A. SEMPERE; J. DÍAZ; J. GÓMEZ (1995)

Systemic infections in three infants due to a lactose-fermenting strain of *Salmonella* Virchow.

Eur J Clin Microbiol Infect Dis 14, 454-456

SAFARÍK, I.; M. SAFARÍKOVÁ; S.J. FORSYTHE (1995)

The application of magnetic separation in applied microbiology.

J Appl Bacteriol 78, 575-585

SCHAUDER, S. UND B.L. BASSLER (2001)

The languages of bacteria.

Genes Dev 15(12), 1468-1480

SCHEU, P.M.; K. BERGHOF; U. STAHL (1998)

Detection of pathogenic and spoilage microorganisms in food with the polymerase chain reaction.

Food Microbiol 15, 13-31

SCHMID, S. (2002)

Nachweis von *Salmonella* spp. aus Fleisch mittels immunomagnetischer Separation und real-time PCR.

Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, München

SCHÖNENBRÜCHER, V.; P. HATTENDORF, M. BÜLTE (2004)

Neue chromogene Nährmedien zum Nachweis von Salmonellen.

Fleischwirtschaft 5, 218-220

SCHROETER, A.; C. DORN; R. HELMUTH (2004)

Weitere Beiträge.

In: HARTUNG, M. (Hrsg.), Epidemiologische Situation der Zoonosen in Deutschland im Jahr 2003. Berlin, 115-125

SEIDLER, T.; T. ALTER; M. KRÜGER; K. FEHLHABER (2001)

Transport stress – consequences for bacterial translocation, endogenous contamination and bactericidal activity of serum of slaughter pigs.

Berl Münch Tierärztl Wschr 114, 375-377

SHERIDAN, G.E.C.; C.I. MASTERS; J.A. SHALLCROSS; B.M. MACKEY (1998)

Detection of mRNA by reverse transcription-PCR as an indicator of viability in *Escherichia coli* cells.

Appl Environ Microbiol 64(4), 1313-1318

SHERIDAN, G.E.C.; E.A. SZABO; B.M. MACKEY (1999)

Effect of post-treatment holding conditions on detection of *tufA* mRNA in ethanol-treated *Escherichia coli*: Implications for RT-PCR-based indirect viability tests.

Lett Appl Microbiol 29, 375-379

SIMPKINS, S.A.; A.B. CHAN; J. HAYS; B. PÖPPING; N. COOK (2000)

An RNA transcription-based amplification technique (NASBA) for the detection of viable *Salmonella enterica*.

Lett Appl Microbiol 30, 75-79

SKJERVE, E. UND Ø. OLSVIK (1991)

Immunomagnetic separation of *Salmonella* from foods.

Int J Food Microbiol 14, 11-18

SKJERVE, E.; L.M. RØRVIK; Ø. OLSVIK (1990)

Detection of *Listeria monocytogenes* in foods by immunomagnetic separation.

Appl Environ Microbiol 56(11), 3478-3481

SPANOVÁ, A.; B. RITTICH; R. KARPÍSKOVÁ; L. CECHOVÁ; D. SKAPOVÁ (2001)

PCR identification of *Salmonella* cells in food and stool samples after immunomagnetic separation.

Bioseparation 9, 379-384

ST. CLAIR, V.J. UND M.M. KLENK (1990)

Performance of three methods for the rapid identification of *Salmonella* in naturally contaminated foods and feeds.

J Food Prot 53(11), 961-964

STEEGE, D.A. (2000)

Emerging features of mRNA decay in bacteria.

RNA 6, 1079-1090

STEPHENS, P.J.; P. DRUGGAN; G. NEBE-VON CARON (2000)

Stressed *Salmonella* are exposed to reactive oxygen species from two independent sources during recovery in conventional culture media.

Int J Food Microbiol 60, 269-285

STONE, G.G.; R.D. OBERST; M.P. HAYS; S. MCVEY; M.M. CHENGAPPA (1994)

Detection of *Salmonella* serovars from clinical samples by enrichment broth cultivation-PCR procedure.

J Clin Microbiol 32(7), 1742-1749

SWANENBURG, M.; B.R. BERENDS; H.A.P. URLINGS; J.M.A. SNIJDERS; F. VAN KNAPEN (2001)

Epidemiological investigations into the sources of *Salmonella* contamination of pork.

Berl Münch Tierärztl Wschr 114, 356-359

SWIFT, S.; N.J. BAINTON; M.K. WINSON (1994)

Gram-negative bacterial communication by *N*-acyl homoserine lactones: A universal language?

Trends Microbiol 2(6), 193-198

SZABO, E.A. UND B.M. MACKEY (1999)

Detection of *Salmonella* Enteritidis by reverse transcription-polymerase chain reaction (PCR).

Int J Food Microbiol 51, 113-122

TOLKER-NIELSEN, T.; M. HALBERG LARSEN; H. KYED; S. MOLIN (1997)

Effects of stress treatments on the detection of *Salmonella* Typhimurium by in situ hybridization.

Int J Food Microbiol 35, 251-258

TONG, J.; S. BENDAHHOU; H. CHEN; W.S. AGNEW (1994)

A simplified method for single-cell RT-PCR that can detect and distinguish genomic DNA and mRNA transcripts.

Nucleic Acids Res 22(15), 3253-3254

TSUJI, K. UND S.J. HARRISON (1978)

Dry-heat destruction of lipopolysaccharide: Dry-heat destruction kinetics.

Appl Environ Microbiol 36(5), 710-714

TURNER, K.; J. PORTER; R. PICKUP; C. EDWARD (2000)

Changes in viability and macromolecular content of long-term batch cultures of *Salmonella* Typhimurium measured by flow cytometry.

J Appl Microbiol 89, 90-99

UYTTENDAELE, M.; A. BASTIAANSEN; J. DEBEVERE (1997)

Evaluation to the NASBA[®] nucleic acid amplification system for assessment of the viability of *Campylobacter jejuni*.

Int J Food Microbiol 37, 13-20

UYTTENDAELE, M.; I. VAN HOORDE; J. DEBEVERE (2000)

The use of immunomagnetic separation (IMS) as a tool in a sample preparation method for direct detection of *L. monocytogenes* in cheese.

Int J Food Microbiol 54, 205-212

UYTTENDAELE, M.; S. VAN BOXSTAELE; J. DEBEVERE (1999)

PCR assay for detection of the *E. coli* O157:H7 *eae*-gene and effect of the sample preparation method on PCR detection of heat-killed *E. coli* O157:H7 in ground beef.

Int J Food Microbiol 52, 85-95

VAN DER ZEH, H. (1994)

Conventional methods for the detection and isolation of *Salmonella* Enteritidis.

Int J Food Microbiol 21, 41-46

VAN SCHOTHORST, M. UND A.M. RENAUD (1983)

Dynamics of *Salmonella* isolation with modified Rappaport's medium (R10).

J Appl Bacteriol 54, 209-215

VAN SCHOTHORST, M. UND F.M. VAN LEUDSEN (1975)

Comparison of several methods for the isolation of salmonellae from egg products.

Can J Microbiol 21, 1041-1045

VARNAM, A.H. UND M.G. EVANS (1991)

Foodborne pathogenes.

Wolfe Publishing Ltd., London

VASSILIADIS, P. (1983)

The Rappaport-Vassiliadis (RV-) enrichment medium for the isolation of salmonellas: An overview.

J Appl Bacteriol 54, 69-76

VASSILIADIS, P.; D. TRICHOPOULOS; G. PAPOUTSAKIS; E. PALLANDIOU (1979)

A note on the comparison of two modifications of Rappaport's medium with Selenite broth in the isolation of salmonellas.

J Appl Bacteriol 46, 567-569

VASSILIADIS, P.; E. PATERAKI; N. PAPAICONOMOU; J.A. PAPADAKIES; D. TRICHOPOULOS (1976)

Nouveau procédé d'enrichissement de *Salmonella*.

Ann Microbiol (Inst. Pasteur) 127 B, 195-200

VERMUNT, A.E.M.; A.A.J.M. FRANKEN; R.R. BEUMER (1992)

Isolation of salmonellas by immunomagnetic separation.

J Appl Bacteriol 72, 112-118

VON ALTROCK, A.; A. SCHÜTTE; G. HILDEBRANDT (1999)

Untersuchungsergebnisse aus Deutschland zu dem EU-Projekt „*Salmonella* in Pork (Salin-pork)“ – 2. Mitteilung: Untersuchungen am Schlachthof.

Berl Münch Tierärztl Wschr 112, 225-233

WANG, X.; N. JOTHIKUMAR; M.W. GRIFFITHS (2004)

Enrichment and DNA extraction protocols for the simultaneous detection of *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* in raw sausage meat with multiplex real-time PCR.

J Food Prot 67(1), 189-192

WARD, L.R.; J.D.H. DE SA; B. ROWE (1987)

A phage-typing scheme for *Salmonella* Enteritidis.

Epidem Inf 99, 291-294

WATERMAN, S.R. UND D.W. HOLDEN (2003)

Functions and effectors of the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system.

Cell Microbiol 5(8), 501-511

WHITEHEAD, N.A.; A.M.L. BARNARD; H. SLATER; N.J.L. SIMPSON; G.P.C. SALMOND (2001)

Quorum-sensing in Gram-negative bacteria.

FEMS Microbiol Rev 25, 365-404

WICHMANN-SCHAUER, H.; L. ELLERBROEK; F. DELBECK; C. DORN; S. FORSTER; M. HAARMANN;
U. METHNER; G. SCHWARZ (2000)

Untersuchungen zum Vorkommen von Salmonellen in deutschem Nutzgeflügel und Geflü-
gelfleisch.

In: 41. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes „Lebensmittelhygiene“ der Deutschen Veterinär-
medizinischen Gesellschaft e.V. vom 25.-28.9.2000 in Garmisch-Partenkirchen, 110-115

WIDJOJOATMODJO, M.N.; A.C. FLUIT; R. TORENSMA; B.H.I. KELLER; J. VERHOEF (1991)

Evaluation of the magnetic immuno PCR assay for rapid detection of *Salmonella*.

Eur J Clin Microbiol Infect Dis 10(11), 935-938

WILSON, C.R.; W.H. ANDREWS; P.L. POELMA (1980)

Recovery of *Salmonella* from milk chocolate using a chemically defined medium and five
nondefined broths.

J Food Sci 45, 310-313, 316

WILSON, I.G. (1997)

Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification.

Appl Environ Microbiol 63(10), 3741-3751

WILSON, W.J. UND E.M. BLAIR (1927)

Use of a glucose bismuth sulphite iron medium for the isolation of *B. Typhosus* and *B. Pro-*
teus.

Journal of Hygiene 26, 374-391

WITTWER, C. (2001)

Introduction.

In: MEUER, S.; C. WITTWER; K. NAKAGAWARA (Hrsg.), Rapid cycle real-time PCR: Methods and applications. Springer Verlag, Berlin, 1-8

WITTWER, C.T.; M.G. HERRMANN; A.A. MOSS; R.P. RASMUSSEN (1997)

Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification.

Biotechniques 22(1), 130-138

WOLCOTT, M.J. (1991)

DNA-based rapid methods for the detection of foodborne pathogens.

J Food Prot 54(5), 387-401

WRIGHT, D.J.; P.A. CHAPMAN; C.A. SIDONS (1994)

Immunomagnetic separation as a sensitive method for isolating *Escherichia coli* O157 from food samples.

Epidemiol Infect 113, 31-39

YARON, S. UND K.R. MATTHEWS (2002)

A reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay for detection of viable *Escherichia coli* O157:H7: Investigation of specific target genes.

J Appl Microbiol 92, 633-640

YU, S.L.; J. UKNALIS; S.-I. TU (2001)

Immunomagnetic separation methods for the isolation of *Campylobacter jejuni* from ground poultry meats.

J Immunol Methods 256, 11-18

ZHOU, D. UND J. GALÁN (2001)

Salmonella entry into host cells: The work in concert of type III secreted effector proteins.

Microbes Infect 3, 1293-1298

I Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Edelstahlstempel schräge Seitenansicht und Ansicht von oben.....	49
Abbildung 2:	Graphische Darstellung der Methodenschritte des amtlichen Verfahrens nach § 35 LMBG.	56
Abbildung 3:	Wachstumskinetik von <i>S. Enteritidis</i> DSM 9898 mit und ohne Wachstumsstimulierung (MW; n = 4).	63
Abbildung 4:	Amplifikationskurven verschiedener Mischverhältnisse lebender und toter <i>S. Enteritidis</i> vor und nach einem Anreicherungsschritt (4 h; 37 °C).....	70
Abbildung 5:	Aufteilung der Gesamtprobenzahl auf die untersuchten Fleischarten.	85
Abbildung 6:	Serovarverteilung in Abhängigkeit von der Fleischart.	87
Abbildung 7:	Gegenüberstellung des Zeitbedarf der IMS-real-time PCR-Methode im Vergleich zum kulturellen Referenzverfahren nach §35 LMBG.	107

K Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Taxonomie der Gattung <i>Salmonella</i> (verändert nach POPOFF ET AL., 2004).	6
Tabelle 2: Charakteristische Stoffwechseleigenschaften des Genus <i>Salmonella</i> (basierend auf BRENNER, 1984; LE MINOR, 1984; ROLLE UND MAYR, 2002).....	8
Tabelle 3: Vorkommen von <i>Salmonella</i> spp. in Fleisch (Auszug aus HARTUNG, 2004).	16
Tabelle 4: Feste Selektivmedien zur Isolation von <i>Salmonella</i> spp. (nach VARNAM UND EVANS, 1991; DE BOER, 1998; MANAFI, 2000; SCHÖNENBRÜCHER ET AL., 2004)...	21
Tabelle 5: Einsatz der IMS zum Nachweis von lebensmittelrelevanten Keimen.....	28
Tabelle 6: Detektionssysteme in Verbindung mit IMS.....	29
Tabelle 7: IMS-PCR zum Nachweis von <i>Salmonella</i> spp. aus Lebensmitteln tierischen Ursprungs.....	33
Tabelle 8: Darstellung der vier untersuchten Matrizes.....	43
Tabelle 9: Einstellungen des LightCycler® (SCHMID, 2002).....	45
Tabelle 10: Zusammensetzung des MasterMix der real-time PCR (SCHMID, 2002).....	45
Tabelle 11: Basensequenz der Primer und Hybridisierungs sonden.....	46
Tabelle 12: Optimierungsschritte zur Anpassung der IMS-real-time PCR-Methode an die Vorgaben des amtlichen Verfahrens.	50
Tabelle 13: Methodenschritte der IMS-real-time PCR-Methode zur Verbesserung der DNA-Aufreinigung.....	52
Tabelle 14: Methodenschritte der IMS-real-time PCR-Methode zur Validierung anhand des amtlichen Verfahrens nach §35 LMBG.....	57
Tabelle 15: Auswertungsschema für qualitative mikrobiologische Nachweisverfahren (HÜBNER ET AL., 2002).	58
Tabelle 16: Methodenschritte zur Unterscheidung einer Kontamination von lebenden und toten <i>Salmonella</i> spp. mittels IMS-real-time PCR.....	59
Tabelle 17: Methodenschritte des IMS-real-time PCR-Verfahrens zur Untersuchung von nativ kontaminierten Fleischproben.	61
Tabelle 18: Crossing Points nach Supplementierung des Voranreicherungsmediums mit Ferrioxamin E und/oder eines „enterobacterial Autoinducer of Growth“.....	64
Tabelle 19: Crossing Points lebender und toter <i>S. Enteritidis</i> nach IMS.	66
Tabelle 20: Arithmetische Mittelwerte der Crossing Points nach DNA-Extraktion von lebenden und toten <i>S. Enteritidis</i> vor und nach Anreicherung (4 h; 37 °C; n = 5).	67
Tabelle 21: Differenz der Crossing Points lebender und toter <i>S. Enteritidis</i> vor und nach Anreicherung (4 h; 37 °C; n = 5).	68

Tabelle 22:	Arithmetische Mittelwerte der Crossing Points nach DNA-Extraktion unterschiedlicher Mischverhältnisse von lebenden und toten <i>S. Enteritidis</i> vor und nach Anreicherung (4 h; 37 °C; n = 3).	69
Tabelle 23:	Differenz der Crossing Points nach DNA-Extraktion unterschiedlicher Mischverhältnisse von lebenden und toten <i>S. Enteritidis</i> vor und nach Anreicherung (4 h; 37 °C; n = 3).	71
Tabelle 24:	Detektion abgestufter Konzentrationen von <i>S. Enteritidis</i> in Abhängigkeit verschiedener Voranreicherungszeiten.	73
Tabelle 25:	Einfluß der Probenfiltration auf die Resultate der IMS-real-time PCR-Methode (Keimkonzentration 100 KBE/ml).....	74
Tabelle 26:	Crossing Points nach Zentrifugation im Vergleich zur Sedimentation (Keimkonzentration 100 KBE/ml).....	74
Tabelle 27:	Vergleich der Crossing Points abgestufter Gehalte des Referenzkeims nach Zentrifugation mit und ohne Anwendung des Edelstahlstempels zur Verbesserung der Sedimentausprägung.	76
Tabelle 28:	Vergleich der Crossing Points nach Anwendung von DNA-Extraktion bzw. einer zusätzlichen DNA-Aufreinigung.	78
Tabelle 29:	Darstellung der Crossing Points nach artefizieller Kontamination abgestufter Keimgehalte von <i>S. Enteritidis</i>	80
Tabelle 30:	Vergleich der prozentualen Wiederfindungshäufigkeit der IMS-real-time PCR-Methode und des kulturellen Verfahrens nach § 35 LMBG (SC 48 h/RVS 48 h).	81
Tabelle 31:	Auswertungsschema zur Bewertung der IMS-real-time PCR-Methode anhand des Referenzverfahrens nach §35 LMBG (SC 48 h/RVS 48 h).....	82
Tabelle 32:	Häufigkeit des DNA-Nachweises von lebenden und toten <i>S. Enteritidis</i> vor und nach einem Anreicherungsschritt (6 h; 37 °C; n = 6).	83
Tabelle 33:	Arithmetische Mittelwerte der Crossing Points lebender <i>S. Enteritidis</i> nach Anreicherung (6 h; 37 °C).	84
Tabelle 34:	Anteil positiver Proben an der Gesamtprobenzahl je Fleischart (§35 LMBG). .	86
Tabelle 35:	Häufigkeit und Verteilung der Serovare nativ kontaminierter Feldproben.	86
Tabelle 36:	Auswertungsschema zur Bewertung der IMS-real-time PCR-Methode anhand des Referenzverfahrens nach §35 LMBG (SC 48 h/RVS 48 h).....	88
Tabelle 37:	Validierungsparameter der IMS-real-time PCR-Methode im Vergleich zum kulturellen Verfahren nach §35 LMBG (SC 48 h/RVS 48 h).	88
Tabelle 38:	Auswertungsschema zur Bewertung der IMS-real-time PCR-Methode anhand des Referenzverfahrens nach §35 LMBG (SC 48 h/RVS 24 h).....	89

Tabelle 39:	Validierungsparameter der IMS-real-time PCR-Methode im Vergleich zum kulturellen Verfahren nach §35 LMBG (SC 48 h/RVS 24 h).....	89
Tabelle 40:	Im Vergleich zum Referenzverfahren nach §35 LMBG (SC 48 h/RVS 48 h) in der IMS-real-time PCR-Methode falsch-positive Ergebnisse.	90
Tabelle 41:	Im Vergleich zum Referenzverfahren nach 35 LMBG (SC 48 h/RVS 48 h) in der IMS-real-time PCR-Methode falsch-negative Ergebnisse.	91
Tabelle 42:	Im Vergleich zum Referenzverfahren nach §35 LMBG (SC 48 h/RVS 24 h) in der IMS-real-time PCR-Methode falsch-positive Ergebnisse.	91
Tabelle 43:	Im Vergleich zum Referenzverfahren nach §35 LMBG (SC 48 h/RVS 24 h) in der IMS-real-time PCR-Methode falsch-negative Ergebnisse.	92
Tabelle 44:	Im Vergleich zum Referenzverfahren nach §35 LMBG (SC48 h/RVS 48 h) in der IMS-real-time PCR-Methode sowie nach einer Inkubationsdauer von SC 48 h/RVS24 h des kulturellen Verfahrens falsch-negative Ergebnisse.	92

L Anhang

Die Befunde der untersuchten Feldproben werden nachfolgend im einzelnen tabellarisch aufgelistet.

Laufende Nummer	Datum des Ansatzes	Fleischart	Verpackungsart	Befund		
				§35 LMBG SC 48 h/RVS 48 h	§35 LMBG SC 48 h/RVS 24 h	IMS-real-time PCR
1	20.04.2004	Rinderhüftsteak	frisch	-	-	-
2	20.04.2004	Rinderhüftsteak	frisch	-	-	-
3	20.04.2004	Schweinebauch	frisch	-	-	-
4	20.04.2004	Schweinebauch	frisch	-	-	-
5	20.04.2004	Rinderhackfleisch	frisch	-	-	-
6	20.04.2004	Rinderhackfleisch	frisch	-	-	-
7	20.04.2004	Schweinehackfleisch	frisch	-	-	-
8	20.04.2004	Schweinehackfleisch	frisch	-	-	-
9	20.04.2004	gemischtes Hackfleisch	frisch	-	-	-
10	20.04.2004	gemischtes Hackfleisch	frisch	-	-	-
11	21.04.2004	Rinderhüftsteak	verpackt	-	-	-
12	21.04.2004	Schweinebauch	verpackt	-	-	-
13	21.04.2004	Hähnchenschenkel	verpackt	-	-	-
14	21.04.2004	Hähnchenschenkel	verpackt	-	-	-
15	21.04.2004	Rinderhackfleisch	verpackt	-	-	-

Laufende Nummer	Datum des Ansatzes	Fleischart	Verpackungsart	Befund		
				§35 LMBG SC 48 h/RVS 48 h	§35 LMBG SC 48 h/RVS 24 h	IMS-real-time PCR
16	21.04.2004	Rinderhackfleisch	verpackt	-	-	-
17	21.04.2004	Schweinehackfleisch	verpackt	-	-	-
18	21.04.2004	Schweinehackfleisch	verpackt	-	-	-
19	21.04.2004	gemischtes Hackfleisch	verpackt	+	+	+
20	21.04.2004	gemischtes Hackfleisch	verpackt	-	-	-
21	27.04.2004	Rinderhüftsteak	frisch	-	-	-
22	27.04.2004	Rinderhüftsteak	frisch	-	-	-
23	27.04.2004	Schweinebauch	frisch	-	-	-
24	27.04.2004	Schweinebauch	frisch	-	-	-
25	27.04.2004	Rinderhackfleisch	frisch	-	-	-
26	27.04.2004	Rinderhackfleisch	frisch	-	-	-
27	27.04.2004	Schweinehackfleisch	frisch	-	-	-
28	27.04.2004	Schweinehackfleisch	frisch	-	-	-
29	27.04.2004	gemischtes Hackfleisch	frisch	-	-	-
30	27.04.2004	gemischtes Hackfleisch	frisch	-	-	-
31	28.04.2004	Rinderhüftsteak	verpackt	-	-	-
32	28.04.2004	Rinderhüftsteak	verpackt	-	-	-
33	28.04.2004	Schweinebauch	verpackt	-	-	-
34	28.04.2004	Schweinebauch	verpackt	-	-	-
35	28.04.2004	Rinderhackfleisch	verpackt	-	-	-

Laufende Nummer	Datum des Ansatzes	Fleischart	Verpackungsart	Befund		
				§35 LMBG SC 48 h/RVS 48 h	§35 LMBG SC 48 h/RVS 24 h	IMS-real-time PCR
36	28.04.2004	Rinderhackfleisch	verpackt	-	-	-
37	28.04.2004	Schweinehackfleisch	verpackt	-	-	-
38	28.04.2004	Schweinehackfleisch	verpackt	-	-	-
39	28.04.2004	gemischtes Hackfleisch	verpackt	-	-	-
40	28.04.2004	gemischtes Hackfleisch	verpackt	-	-	-
41	04.05.2004	Rinderhüftsteak	frisch	-	-	-
42	04.05.2004	Rinderhüftsteak	frisch	-	-	-
43	04.05.2004	Hähnchenschenkel	frisch	-	-	-
44	04.05.2004	Hähnchenschenkel	frisch	-	-	-
45	04.05.2004	Rinderhackfleisch	frisch	-	-	-
46	04.05.2004	Rinderhackfleisch	frisch	-	-	-
47	04.05.2004	Schweinehackfleisch	frisch	-	-	-
48	04.05.2004	Schweinehackfleisch	frisch	-	-	-
49	04.05.2004	gemischtes Hackfleisch	frisch	-	-	-
50	04.05.2004	gemischtes Hackfleisch	frisch	-	-	-
51	05.05.2004	Rinderhüftsteak	verpackt	-	-	-
52	05.05.2004	Rinderhüftsteak	verpackt	-	-	-
53	05.05.2004	Hähnchenschenkel	verpackt	-	-	-
54	05.05.2004	Hähnchenschenkel	verpackt	-	-	-
55	05.05.2004	Rinderhackfleisch	verpackt	-	-	-

Laufende Nummer	Datum des Ansatzes	Fleischart	Verpackungsart	Befund		
				§35 LMBG SC 48 h/RVS 48 h	§35 LMBG SC 48 h/RVS 24 h	IMS-real-time PCR
56	05.05.2004	Rinderhackfleisch	verpackt	-	-	-
57	05.05.2004	Schweinehackfleisch	verpackt	-	-	-
58	05.05.2004	Schweinehackfleisch	verpackt	-	-	-
59	05.05.2004	gemischtes Hackfleisch	verpackt	-	-	-
60	05.05.2004	gemischtes Hackfleisch	verpackt	-	-	-
61	11.05.2004	Rinderhüftsteak	frisch	-	-	-
62	11.05.2004	Rinderhüftsteak	frisch	-	-	-
63	11.05.2004	Hähnchenschenkel	frisch	-	-	-
64	11.05.2004	Hähnchenschenkel	frisch	-	-	-
65	11.05.2004	Rinderhackfleisch	frisch	-	-	-
66	11.05.2004	Rinderhackfleisch	frisch	-	-	-
67	11.05.2004	Schweinehackfleisch	frisch	-	-	-
68	11.05.2004	Schweinehackfleisch	frisch	-	-	-
69	11.05.2004	gemischtes Hackfleisch	frisch	-	-	-
70	11.05.2004	gemischtes Hackfleisch	frisch	-	-	-
71	12.05.2004	Rinderhüftsteak	verpackt	-	-	-
72	12.05.2004	Rinderhüftsteak	verpackt	-	-	-
73	12.05.2004	Hähnchenschenkel	verpackt	-	-	-
74	12.05.2004	Hähnchenschenkel	verpackt	-	-	-
75	12.05.2004	Rinderhackfleisch	verpackt	-	-	-

Laufende Nummer	Datum des Ansatzes	Fleischart	Verpackungsart	Befund		
				§35 LMBG SC 48 h/RVS 48 h	§35 LMBG SC 48 h/RVS 24 h	IMS-real-time PCR
76	12.05.2004	Rinderhackfleisch	verpackt	-	-	-
77	12.05.2004	Schweinehackfleisch	verpackt	-	-	-
78	12.05.2004	Schweinehackfleisch	verpackt	-	-	-
79	12.05.2004	gemischtes Hackfleisch	verpackt	-	-	-
80	12.05.2004	gemischtes Hackfleisch	verpackt	-	-	-
81	25.05.2004	Schweinebauch	frisch	-	-	-
82	25.05.2004	Schweinebauch	frisch	-	-	-
83	25.05.2004	Hähnchenschenkel	frisch	-	-	-
84	25.05.2004	Hähnchenschenkel	frisch	-	-	-
85	25.05.2004	Rinderhackfleisch	frisch	-	-	-
86	25.05.2004	Rinderhackfleisch	frisch	-	-	-
87	25.05.2004	Schweinehackfleisch	frisch	-	-	-
88	25.05.2004	Schweinehackfleisch	frisch	-	-	-
89	25.05.2004	gemischtes Hackfleisch	frisch	-	-	-
90	25.05.2004	gemischtes Hackfleisch	frisch	-	-	-
93	26.05.2004	Hähnchenschenkel	verpackt	-	-	-
94	26.05.2004	Hähnchenschenkel	verpackt	-	-	-
95	26.05.2004	Rinderhackfleisch	verpackt	-	-	-
96	26.05.2004	Rinderhackfleisch	verpackt	-	-	-
97	26.05.2004	Schweinehackfleisch	verpackt	-	-	-

Laufende Nummer	Datum des Ansatzes	Fleischart	Verpackungsart	Befund		
				§35 LMBG SC 48 h/RVS 48 h	§35 LMBG SC 48 h/RVS 24 h	IMS-real-time PCR
98	26.05.2004	Schweinehackfleisch	verpackt	-	-	-
99	26.05.2004	gemischtes Hackfleisch	verpackt	-	-	-
100	26.05.2004	gemischtes Hackfleisch	verpackt	-	-	-
101	02.06.2004	Schweinebauch	verpackt	-	-	-
102	02.06.2004	Schweinebauch	frisch	-	-	-
105	02.06.2004	Hähnchenschenkel	verpackt	+	+	+
111	08.06.2004	Rinderhüftsteak	frisch	-	-	-
112	08.06.2004	Rinderhüftsteak	frisch	-	-	-
113	08.06.2004	Schweinebauch	frisch	-	-	-
114	08.06.2004	Schweinebauch	frisch	-	-	-
115	08.06.2004	Hähnchenschenkel	frisch	+	+	+
116	08.06.2004	Hähnchenschenkel	frisch	-	-	-
117	08.06.2004	Schweinehackfleisch	frisch	-	-	-
118	08.06.2004	Schweinehackfleisch	frisch	-	-	-
119	08.06.2004	gemischtes Hackfleisch	frisch	-	-	-
120	08.06.2004	gemischtes Hackfleisch	frisch	-	-	-
121	09.06.2004	Rinderhüftsteak	verpackt	-	-	-
122	09.06.2004	Rinderhüftsteak	verpackt	-	-	-
123	09.06.2004	Schweinebauch	frisch	-	-	-
124	09.06.2004	Schweinebauch	verpackt	-	-	-

Laufende Nummer	Datum des Ansatzes	Fleischart	Verpackungsart	Befund		
				§35 LMBG SC 48 h/RVS 48 h	§35 LMBG SC 48 h/RVS 24 h	IMS-real-time PCR
125	09.06.2004	Hähnchenschenkel	verpackt	+	+	+
126	09.06.2004	Hähnchenschenkel	verpackt	-	-	-
127	09.06.2004	Schweinehackfleisch	verpackt	-	-	-
128	09.06.2004	Schweinehackfleisch	verpackt	-	-	-
129	09.06.2004	gemischtes Hackfleisch	verpackt	-	-	-
130	09.06.2004	gemischtes Hackfleisch	verpackt	-	-	-
131	15.06.2004	Rinderhüftsteak	frisch	-	-	-
132	15.06.2004	Rinderhüftsteak	frisch	-	-	-
133	15.06.2004	Schweinebauch	frisch	-	-	-
134	15.06.2004	Schweinebauch	frisch	-	-	-
135	15.06.2004	Hähnchenschenkel	frisch	+	+	+
136	15.06.2004	Hähnchenschenkel	frisch	-	-	-
137	15.06.2004	Rinderhackfleisch	frisch	-	-	-
138	15.06.2004	Rinderhackfleisch	frisch	-	-	-
139	15.06.2004	Schweinehackfleisch	frisch	-	-	-
140	15.06.2004	Schweinehackfleisch	frisch	-	-	-
141	16.06.2004	Rinderhüftsteak	verpackt	-	-	-
142	16.06.2004	Rinderhüftsteak	verpackt	-	-	-
143	16.06.2004	Schweinebauch	verpackt	-	-	-
144	16.06.2004	Schweinebauch	verpackt	-	-	-

Laufende Nummer	Datum des Ansatzes	Fleischart	Verpackungsart	Befund		
				§35 LMBG SC 48 h/RVS 48 h	§35 LMBG SC 48 h/RVS 24 h	IMS-real-time PCR
145	16.06.2004	Hähnchenschenkel	verpackt	-	-	-
146	16.06.2004	Hähnchenschenkel	verpackt	-	-	-
147	16.06.2004	Rinderhackfleisch	verpackt	-	-	-
148	16.06.2004	Rinderhackfleisch	verpackt	-	-	-
149	16.06.2004	Schweinehackfleisch	verpackt	-	-	-
150	16.06.2004	Schweinehackfleisch	verpackt	-	-	-
151	22.06.2004	Rinderhüftsteak	frisch	-	-	-
152	22.06.2004	Rinderhüftsteak	frisch	-	-	-
153	22.06.2004	Schweinebauch	frisch	-	-	-
154	22.06.2004	Schweinebauch	frisch	-	-	-
155	22.06.2004	Hähnchenschenkel	frisch	+	+	-
156	22.06.2004	Hähnchenschenkel	frisch	-	-	-
157	22.06.2004	Rinderhackfleisch	frisch	+	+	-
158	22.06.2004	Rinderhackfleisch	frisch	-	-	-
159	22.06.2004	gemischtes Hackfleisch	frisch	-	-	-
160	22.06.2004	gemischtes Hackfleisch	frisch	-	-	-
161	23.06.2004	Rinderhüftsteak	verpackt	-	-	-
162	23.06.2004	Rinderhüftsteak	verpackt	-	-	-
163	23.06.2004	Schweinebauch	frisch	-	-	-
164	23.06.2004	Schweinebauch	verpackt	+	+	-

Laufende Nummer	Datum des Ansatzes	Fleischart	Verpackungsart	Befund		
				§35 LMBG SC 48 h/RVS 48 h	§35 LMBG SC 48 h/RVS 24 h	IMS-real-time PCR
165	23.06.2004	Hähnchenschenkel	verpackt	+	+	+
166	23.06.2004	Hähnchenschenkel	verpackt	-	-	-
167	23.06.2004	Rinderhackfleisch	verpackt	-	-	-
168	23.06.2004	Rinderhackfleisch	verpackt	-	-	-
169	23.06.2004	gemischtes Hackfleisch	verpackt	-	-	-
170	23.06.2004	gemischtes Hackfleisch	verpackt	-	-	-
171	29.06.2004	Schweinebauch	frisch	+	+	+
172	29.06.2004	Schweinebauch	frisch	-	-	-
173	29.06.2004	Hähnchenschenkel	frisch	-	-	-
174	29.06.2004	Hähnchenschenkel	frisch	+	+	+
175	29.06.2004	Rinderhackfleisch	frisch	-	-	-
176	29.06.2004	Rinderhackfleisch	frisch	-	-	-
177	29.06.2004	Schweinehackfleisch	frisch	-	-	-
178	29.06.2004	Schweinehackfleisch	frisch	-	-	-
179	29.06.2004	gemischtes Hackfleisch	frisch	-	-	-
180	29.06.2004	gemischtes Hackfleisch	frisch	-	-	-
181	30.06.2004	Schweinebauch	frisch	-	-	-
182	30.06.2004	Schweinebauch	verpackt	-	-	-
183	30.06.2004	Hähnchenschenkel	verpackt	-	-	-
184	30.06.2004	Hähnchenschenkel	verpackt	+	+	+

Laufende Nummer	Datum des Ansatzes	Fleischart	Verpackungsart	Befund		
				§35 LMBG SC 48 h/RVS 48 h	§35 LMBG SC 48 h/RVS 24 h	IMS-real-time PCR
185	30.06.2004	Rinderhackfleisch	verpackt	-	-	-
186	30.06.2004	Rinderhackfleisch	verpackt	-	-	-
187	30.06.2004	Schweinehackfleisch	verpackt	-	-	-
188	30.06.2004	Schweinehackfleisch	verpackt	+	-	+
189	30.06.2004	gemischtes Hackfleisch	verpackt	-	-	-
190	30.06.2004	gemischtes Hackfleisch	verpackt	-	-	-
191	06.07.2004	Rinderhüftsteak	frisch	-	-	-
192	06.07.2004	Rinderhüftsteak	frisch	-	-	-
193	06.07.2004	Schweinebauch	frisch	-	-	-
194	06.07.2004	Schweinebauch	frisch	-	-	-
195	06.07.2004	Hähnchenschenkel	frisch	-	-	-
196	06.07.2004	Hähnchenschenkel	frisch	+	+	+
197	06.07.2004	Schweinehackfleisch	frisch	-	-	-
198	06.07.2004	Schweinehackfleisch	frisch	-	-	-
199	06.07.2004	gemischtes Hackfleisch	frisch	-	-	-
200	06.07.2004	gemischtes Hackfleisch	frisch	-	-	-
201	07.07.2004	Rinderhüftsteak	verpackt	-	-	-
202	07.07.2004	Rinderhüftsteak	verpackt	-	-	-
203	07.07.2004	Schweinebauch	verpackt	-	-	-
204	07.07.2004	Schweinebauch	verpackt	-	-	-

Laufende Nummer	Datum des Ansatzes	Fleischart	Verpackungsart	Befund		
				§35 LMBG SC 48 h/RVS 48 h	§35 LMBG SC 48 h/RVS 24 h	IMS-real-time PCR
205	07.07.2004	Hähnchenschenkel	verpackt	+	+	+
206	07.07.2004	Hähnchenschenkel	verpackt	+	+	+
207	07.07.2004	Schweinehackfleisch	verpackt	-	-	-
208	07.07.2004	Schweinehackfleisch	verpackt	-	-	-
209	07.07.2004	gemischtes Hackfleisch	verpackt	-	-	-
210	07.07.2004	gemischtes Hackfleisch	verpackt	-	-	-
211	13.07.2004	Rinderhüftsteak	frisch	+	-	-
212	13.07.2004	Rinderhüftsteak	frisch	-	-	-
213	13.07.2004	Schweinebauch	frisch	-	-	-
214	13.07.2004	Schweinebauch	frisch	-	-	-
215	13.07.2004	Hähnchenschenkel	frisch	+	+	+
216	13.07.2004	Hähnchenschenkel	verpackt	+	+	+
217	13.07.2004	Rinderhackfleisch	frisch	-	-	-
218	13.07.2004	Rinderhackfleisch	frisch	-	-	-
219	13.07.2004	Schweinehackfleisch	frisch	-	-	-
220	13.07.2004	Schweinehackfleisch	frisch	-	-	-
221	14.07.2004	Rinderhüftsteak	verpackt	-	-	-
222	14.07.2004	Rinderhüftsteak	verpackt	-	-	-
223	14.07.2004	Schweinebauch	frisch	-	-	-
224	14.07.2004	Schweinebauch	verpackt	-	-	-

Laufende Nummer	Datum des Ansatzes	Fleischart	Verpackungsart	Befund		
				§35 LMBG SC 48 h/RVS 48 h	§35 LMBG SC 48 h/RVS 24 h	IMS-real-time PCR
225	14.07.2004	Hähnchenschenkel	verpackt	-	-	-
226	14.07.2004	Hähnchenschenkel	verpackt	+	+	+
227	14.07.2004	Rinderhackfleisch	verpackt	-	-	-
228	14.07.2004	Rinderhackfleisch	verpackt	-	-	-
229	14.07.2004	Schweinehackfleisch	verpackt	-	-	-
230	14.07.2004	Schweinehackfleisch	verpackt	-	-	-
231	20.07.2004	Rinderhüftsteak	frisch	-	-	-
232	20.07.2004	Rinderhüftsteak	frisch	-	-	-
233	20.07.2004	Schweinebauch	frisch	-	-	-
234	20.07.2004	Schweinebauch	frisch	-	-	-
235	20.07.2004	Hähnchenschenkel	frisch	-	-	-
236	20.07.2004	Hähnchenschenkel	frisch	+	-	+
237	20.07.2004	Rinderhackfleisch	frisch	-	-	-
238	20.07.2004	Rinderhackfleisch	frisch	-	-	-
239	20.07.2004	gemischtes Hackfleisch	frisch	-	-	-
240	20.07.2004	gemischtes Hackfleisch	frisch	-	-	-
241	21.07.2004	Rinderhüftsteak	verpackt	-	-	-
242	21.07.2004	Rinderhüftsteak	verpackt	-	-	-
243	21.07.2004	Schweinebauch	frisch	-	-	-
244	21.07.2004	Schweinebauch	verpackt	-	-	-

Laufende Nummer	Datum des Ansatzes	Fleischart	Verpackungsart	Befund		
				§35 LMBG SC 48 h/RVS 48 h	§35 LMBG SC 48 h/RVS 24 h	IMS-real-time PCR
245	21.07.2004	Hähnchenschenkel	verpackt	+	+	+
246	21.07.2004	Hähnchenschenkel	verpackt	+	+	+
247	21.07.2004	Rinderhackfleisch	verpackt	-	-	-
248	21.07.2004	Rinderhackfleisch	verpackt	-	-	-
249	21.07.2004	gemischtes Hackfleisch	verpackt	-	-	-
250	21.07.2004	gemischtes Hackfleisch	verpackt	+	+	+
251	27.07.2004	Schweinebauch	frisch	-	-	-
252	27.07.2004	Schweinebauch	frisch	-	-	-
253	27.07.2004	Hähnchenschenkel	frisch	+	-	+
254	27.07.2004	Hähnchenschenkel	frisch	-	-	-
255	27.07.2004	Rinderhackfleisch	frisch	-	-	-
256	27.07.2004	Rinderhackfleisch	frisch	-	-	-
257	27.07.2004	Schweinehackfleisch	frisch	-	-	-
258	27.07.2004	Schweinehackfleisch	frisch	-	-	-
259	27.07.2004	gemischtes Hackfleisch	frisch	-	-	-
260	27.07.2004	gemischtes Hackfleisch	frisch	-	-	-
261	28.07.2004	Rinderhüftsteak	verpackt	-	-	-
262	28.07.2004	Rinderhüftsteak	verpackt	-	-	-
263	28.07.2004	Hähnchenschenkel	verpackt	-	-	-
264	28.07.2004	Hähnchenschenkel	verpackt	-	-	-

Laufende Nummer	Datum des Ansatzes	Fleischart	Verpackungsart	Befund		
				§35 LMBG SC 48 h/RVS 48 h	§35 LMBG SC 48 h/RVS 24 h	IMS-real-time PCR
265	28.07.2004	Rinderhackfleisch	verpackt	-	-	-
266	28.07.2004	Rinderhackfleisch	verpackt	-	-	-
267	28.07.2004	Schweinehackfleisch	verpackt	-	-	-
268	28.07.2004	Schweinehackfleisch	verpackt	+	+	+
269	28.07.2004	gemischtes Hackfleisch	verpackt	+	+	+
270	28.07.2004	gemischtes Hackfleisch	verpackt	-	-	-
271	03.08.2004	Rinderhüftsteak	frisch	-	-	-
272	03.08.2004	Rinderhüftsteak	frisch	-	-	-
273	03.08.2004	Schweinebauch	frisch	-	-	-
274	03.08.2004	Schweinebauch	frisch	-	-	-
275	03.08.2004	Rinderhackfleisch	frisch	-	-	-
276	03.08.2004	Rinderhackfleisch	frisch	-	-	-
277	03.08.2004	Schweinehackfleisch	frisch	-	-	-
278	03.08.2004	Schweinehackfleisch	frisch	-	-	-
279	03.08.2004	gemischtes Hackfleisch	frisch	-	-	-
280	03.08.2004	gemischtes Hackfleisch	frisch	-	-	-
281	04.08.2004	Rinderhüftsteak	frisch	-	-	-
282	04.08.2004	Rinderhüftsteak	verpackt	-	-	-
283	04.08.2004	Schweinebauch	frisch	-	-	-
284	04.08.2004	Schweinebauch	verpackt	-	-	-

Laufende Nummer	Datum des Ansatzes	Fleischart	Verpackungsart	Befund		
				§35 LMBG SC 48 h/RVS 48 h	§35 LMBG SC 48 h/RVS 24 h	IMS-real-time PCR
285	04.08.2004	Rinderhackfleisch	verpackt	-	-	-
286	04.08.2004	Rinderhackfleisch	verpackt	-	-	-
287	04.08.2004	Schweinehackfleisch	verpackt	+	+	+
288	04.08.2004	Schweinehackfleisch	verpackt	+	+	-
289	04.08.2004	gemischtes Hackfleisch	verpackt	-	-	-
290	04.08.2004	gemischtes Hackfleisch	verpackt	-	-	-
291	10.08.2004	Rinderhüftsteak	frisch	-	-	-
292	10.08.2004	Rinderhüftsteak	frisch	-	-	-
293	10.08.2004	Schweinebauch	frisch	-	-	-
294	10.08.2004	Schweinebauch	frisch	-	-	-
295	10.08.2004	Hähnchenschenkel	frisch	+	+	+
296	10.08.2004	Hähnchenschenkel	verpackt	-	-	-
297	10.08.2004	Schweinehackfleisch	frisch	-	-	-
298	10.08.2004	Schweinehackfleisch	frisch	-	-	-
299	10.08.2004	gemischtes Hackfleisch	frisch	-	-	-
300	10.08.2004	gemischtes Hackfleisch	frisch	-	-	-
301	11.08.2004	Rinderhüftsteak	verpackt	-	-	-
302	11.08.2004	Rinderhüftsteak	verpackt	-	-	-
303	11.08.2004	Schweinebauch	frisch	-	-	-
304	11.08.2004	Schweinebauch	verpackt	-	-	-

Laufende Nummer	Datum des Ansatzes	Fleischart	Verpackungsart	Befund		
				§35 LMBG SC 48 h/RVS 48 h	§35 LMBG SC 48 h/RVS 24 h	IMS-real-time PCR
305	11.08.2004	Hähnchenschenkel	verpackt	+	+	+
306	11.08.2004	Hähnchenschenkel	verpackt	-	-	-
307	11.08.2004	Schweinehackfleisch	verpackt	-	-	-
308	11.08.2004	Schweinehackfleisch	verpackt	-	-	-
309	11.08.2004	gemischtes Hackfleisch	verpackt	-	-	-
310	11.08.2004	gemischtes Hackfleisch	verpackt	-	-	-
311	07.09.2004	Rinderhüftsteak	frisch	-	-	-
312	07.09.2004	Rinderhüftsteak	frisch	-	-	-
313	07.09.2004	Schweinebauch	frisch	-	-	-
314	07.09.2004	Schweinebauch	frisch	-	-	-
315	07.09.2004	Hähnchenschenkel	frisch	-	-	-
316	07.09.2004	Hähnchenschenkel	frisch	+	+	-
317	07.09.2004	Rinderhackfleisch	frisch	-	-	-
318	07.09.2004	Rinderhackfleisch	frisch	-	-	-
319	07.09.2004	Schweinehackfleisch	frisch	-	-	-
320	07.09.2004	Schweinehackfleisch	frisch	-	-	-
321	08.09.2004	Rinderhüftsteak	verpackt	-	-	-
322	08.09.2004	Rinderhüftsteak	verpackt	-	-	-
323	08.09.2004	Schweinebauch	frisch	-	-	-
324	08.09.2004	Schweinebauch	verpackt	-	-	-

Laufende Nummer	Datum des Ansatzes	Fleischart	Verpackungsart	Befund		
				§35 LMBG SC 48 h/RVS 48 h	§35 LMBG SC 48 h/RVS 24 h	IMS-real-time PCR
325	08.09.2004	Hähnchenschenkel	verpackt	-	-	-
326	08.09.2004	Hähnchenschenkel	verpackt	+	+	+
327	08.09.2004	Rinderhackfleisch	verpackt	-	-	-
328	08.09.2004	Rinderhackfleisch	verpackt	-	-	-
329	08.09.2004	Schweinehackfleisch	verpackt	-	-	-
330	08.09.2004	Schweinehackfleisch	verpackt	-	-	-
331	14.09.2004	Rinderhüftsteak	frisch	-	-	-
332	14.09.2004	Rinderhüftsteak	frisch	-	-	-
333	14.09.2004	Schweinebauch	frisch	-	-	-
334	14.09.2004	Schweinebauch	frisch	-	-	-
335	14.09.2004	Hähnchenschenkel	frisch	-	-	-
336	14.09.2004	Hähnchenschenkel	verpackt	-	-	-
337	14.09.2004	Rinderhackfleisch	frisch	-	-	-
338	14.09.2004	Rinderhackfleisch	frisch	-	-	-
339	14.09.2004	gemischtes Hackfleisch	frisch	-	-	-
340	14.09.2004	gemischtes Hackfleisch	frisch	-	-	-
341	15.09.2004	Rinderhüftsteak	verpackt	-	-	-
342	15.09.2004	Rinderhüftsteak	verpackt	-	-	-
343	15.09.2004	Schweinebauch	frisch	-	-	-
344	15.09.2004	Schweinebauch	verpackt	-	-	-

Laufende Nummer	Datum des Ansatzes	Fleischart	Verpackungsart	Befund		
				§35 LMBG SC 48 h/RVS 48 h	§35 LMBG SC 48 h/RVS 24 h	IMS-real-time PCR
345	15.09.2004	Hähnchenschenkel	verpackt	-	-	-
346	15.09.2004	Hähnchenschenkel	verpackt	+	+	+
347	15.09.2004	Rinderhackfleisch	verpackt	-	-	-
348	15.09.2004	Rinderhackfleisch	verpackt	-	-	-
349	15.09.2004	gemischtes Hackfleisch	verpackt	-	-	-
350	15.09.2004	gemischtes Hackfleisch	verpackt	-	-	-
351	21.09.2004	Rinderhüftsteak	frisch	-	-	-
352	21.09.2004	Rinderhüftsteak	frisch	-	-	-
353	21.09.2004	Hähnchenschenkel	frisch	-	-	-
354	21.09.2004	Hähnchenschenkel	verpackt	-	-	-
355	21.09.2004	Rinderhackfleisch	frisch	-	-	-
356	21.09.2004	Rinderhackfleisch	frisch	-	-	-
357	21.09.2004	Schweinehackfleisch	frisch	-	-	-
358	21.09.2004	Schweinehackfleisch	frisch	-	-	-
359	21.09.2004	gemischtes Hackfleisch	frisch	-	-	-
360	21.09.2004	gemischtes Hackfleisch	frisch	-	-	-
361	22.09.2004	Rinderhüftsteak	verpackt	-	-	-
362	22.09.2004	Rinderhüftsteak	verpackt	-	-	-
363	22.09.2004	Hähnchenschenkel	verpackt	-	-	-
364	22.09.2004	Hähnchenschenkel	verpackt	-	-	-

Laufende Nummer	Datum des Ansatzes	Fleischart	Verpackungsart	Befund		
				§35 LMBG SC 48 h/RVS 48 h	§35 LMBG SC 48 h/RVS 24 h	IMS-real-time PCR
365	22.09.2004	Rinderhackfleisch	verpackt	-	-	-
366	22.09.2004	Rinderhackfleisch	verpackt	-	-	-
367	22.09.2004	Schweinehackfleisch	verpackt	+	+	+
368	22.09.2004	Schweinehackfleisch	verpackt	-	-	-
369	22.09.2004	gemischtes Hackfleisch	verpackt	+	-	-
370	22.09.2004	gemischtes Hackfleisch	verpackt	-	-	-
371	28.09.2004	Schweinebauch	frisch	-	-	-
372	28.09.2004	Schweinebauch	frisch	-	-	-
373	28.09.2004	Hähnchenschenkel	verpackt	-	-	-
374	28.09.2004	Hähnchenschenkel	frisch	-	-	-
375	28.09.2004	Rinderhackfleisch	frisch	-	-	-
376	28.09.2004	Rinderhackfleisch	frisch	-	-	-
377	28.09.2004	Schweinehackfleisch	frisch	-	-	-
378	28.09.2004	Schweinehackfleisch	frisch	-	-	-
379	28.09.2004	gemischtes Hackfleisch	frisch	-	-	-
380	28.09.2004	gemischtes Hackfleisch	frisch	-	-	-
381	29.09.2004	Schweinebauch	frisch	-	-	-
382	29.09.2004	Schweinebauch	verpackt	-	-	-
383	29.09.2004	Hähnchenschenkel	verpackt	-	-	-
384	29.09.2004	Hähnchenschenkel	verpackt	-	-	-

Laufende Nummer	Datum des Ansatzes	Fleischart	Verpackungsart	Befund		
				§35 LMBG SC 48 h/RVS 48 h	§35 LMBG SC 48 h/RVS 24 h	IMS-real-time PCR
385	29.09.2004	Rinderhackfleisch	verpackt	-	-	-
386	29.09.2004	Rinderhackfleisch	verpackt	-	-	-
387	29.09.2004	Schweinehackfleisch	verpackt	-	-	-
388	29.09.2004	Schweinehackfleisch	verpackt	-	-	-
389	29.09.2004	gemischtes Hackfleisch	verpackt	-	-	-
390	29.09.2004	gemischtes Hackfleisch	verpackt	+	+	+
391	05.10.2004	Rinderhüftsteak	frisch	-	-	-
392	05.10.2004	Rinderhüftsteak	frisch	-	-	-
393	05.10.2004	Schweinebauch	frisch	-	-	-
394	05.10.2004	Schweinebauch	frisch	-	-	-
395	05.10.2004	Rinderhackfleisch	frisch	-	-	-
396	05.10.2004	Rinderhackfleisch	frisch	-	-	-
397	05.10.2004	Schweinehackfleisch	frisch	-	-	-
398	05.10.2004	Schweinehackfleisch	frisch	-	-	-
399	05.10.2004	gemischtes Hackfleisch	frisch	-	-	-
400	05.10.2004	gemischtes Hackfleisch	frisch	-	-	-
401	06.10.2004	Rinderhüftsteak	verpackt	-	-	-
402	06.10.2004	Rinderhüftsteak	verpackt	-	-	-
403	06.10.2004	Schweinebauch	frisch	-	-	-
404	06.10.2004	Schweinebauch	verpackt	-	-	-

Laufende Nummer	Datum des Ansatzes	Fleischart	Verpackungsart	Befund		
				§35 LMBG SC 48 h/RVS 48 h	§35 LMBG SC 48 h/RVS 24 h	IMS-real-time PCR
405	06.10.2004	Rinderhackfleisch	verpackt	-	-	-
406	06.10.2004	Rinderhackfleisch	verpackt	-	-	-
407	06.10.2004	Schweinehackfleisch	verpackt	-	-	-
408	06.10.2004	Schweinehackfleisch	verpackt	-	-	-
409	06.10.2004	gemischtes Hackfleisch	verpackt	-	-	-
410	06.10.2004	gemischtes Hackfleisch	verpackt	-	-	+
411	12.10.2004	Rinderhüftsteak	frisch	-	-	-
412	12.10.2004	Rinderhüftsteak	frisch	-	-	-
413	12.10.2004	Schweinebauch	frisch	-	-	-
414	12.10.2004	Schweinebauch	frisch	-	-	-
415	12.10.2004	Hähnchenschenkel	frisch	-	-	-
416	12.10.2004	Hähnchenschenkel	frisch	-	-	-
417	12.10.2004	Schweinehackfleisch	frisch	-	-	-
418	12.10.2004	Schweinehackfleisch	frisch	-	-	-
419	12.10.2004	gemischtes Hackfleisch	frisch	-	-	-
420	12.10.2004	gemischtes Hackfleisch	frisch	-	-	-
421	13.10.2004	Rinderhüftsteak	verpackt	-	-	-
422	13.10.2004	Rinderhüftsteak	verpackt	-	-	-
423	13.10.2004	Schweinebauch	frisch	-	-	-
424	13.10.2004	Schweinebauch	verpackt	-	-	-

Laufende Nummer	Datum des Ansatzes	Fleischart	Verpackungsart	Befund		
				§35 LMBG SC 48 h/RVS 48 h	§35 LMBG SC 48 h/RVS 24 h	IMS-real-time PCR
425	13.10.2004	Hähnchenschenkel	verpackt	+	+	+
426	13.10.2004	Hähnchenschenkel	verpackt	-	-	-
427	13.10.2004	Schweinehackfleisch	verpackt	-	-	-
428	13.10.2004	gemischtes Hackfleisch	verpackt	+	+	+
429	13.10.2004	gemischtes Hackfleisch	verpackt	-	-	-
430	13.10.2004	gemischtes Hackfleisch	verpackt	-	-	-
431	19.10.2004	Hähnchenschenkel	verpackt	+	+	+
432	19.10.2004	Hähnchenschenkel	frisch	-	-	-
433	19.10.2004	Schweinebauch	frisch	-	-	-
434	19.10.2004	Schweinebauch	frisch	-	-	-
435	19.10.2004	Schweinehackfleisch	frisch	-	-	-
436	19.10.2004	gemischtes Hackfleisch	frisch	-	-	+
437	19.10.2004	Rinderhackfleisch	frisch	-	-	-
438	19.10.2004	Schweinehackfleisch	frisch	-	-	-
439	19.10.2004	gemischtes Hackfleisch	frisch	-	-	-
440	19.10.2004	Rinderhackfleisch	frisch	-	-	-
441	20.10.2004	Hähnchenschenkel	verpackt	+	+	+
442	20.10.2004	Hähnchenschenkel	verpackt	-	-	-
443	20.10.2004	Schweinebauch	verpackt	-	-	-
444	20.10.2004	Schweinebauch	verpackt	-	-	-

Laufende Nummer	Datum des Ansatzes	Fleischart	Verpackungsart	Befund		
				§35 LMBG SC 48 h/RVS 48 h	§35 LMBG SC 48 h/RVS 24 h	IMS-real-time PCR
445	20.10.2004	Schweinehackfleisch	verpackt	-	-	-
446	20.10.2004	Rinderhackfleisch	verpackt	-	-	-
447	20.10.2004	Schweinehackfleisch	verpackt	-	-	-
448	20.10.2004	Schweinehackfleisch	verpackt	-	-	-
449	20.10.2004	gemischtes Hackfleisch	verpackt	-	-	-
450	20.10.2004	Rinderhackfleisch	verpackt	-	-	-
451	03.11.2004	Schweinebauch	verpackt	-	-	-
452	03.11.2004	Schweinebauch	frisch	-	-	-
453	03.11.2004	Hähnchenschenkel	verpackt	+	+	+
454	03.11.2004	Hähnchenschenkel	verpackt	+	+	+
455	03.11.2004	Rinderhackfleisch	verpackt	-	-	-
456	03.11.2004	Rinderhackfleisch	verpackt	-	-	-
457	03.11.2004	Schweinehackfleisch	verpackt	-	-	-
458	03.11.2004	Schweinehackfleisch	verpackt	-	-	-
459	03.11.2004	gemischtes Hackfleisch	verpackt	-	-	+
460	03.11.2004	gemischtes Hackfleisch	verpackt	-	-	-
461	09.11.2004	Rinderhüftsteak	frisch	-	-	-
462	09.11.2004	Rinderhüftsteak	frisch	-	-	-
463	09.11.2004	Schweinebauch	frisch	-	-	-
464	09.11.2004	Schweinebauch	frisch	-	-	-

Laufende Nummer	Datum des Ansatzes	Fleischart	Verpackungsart	Befund		
				§35 LMBG SC 48 h/RVS 48 h	§35 LMBG SC 48 h/RVS 24 h	IMS-real-time PCR
465	09.11.2004	Rinderhackfleisch	frisch	-	-	-
466	09.11.2004	Rinderhackfleisch	frisch	-	-	-
467	09.11.2004	Schweinehackfleisch	verpackt	-	-	-
468	09.11.2004	Schweinehackfleisch	frisch	-	-	-
469	09.11.2004	gemischtes Hackfleisch	frisch	-	-	-
470	09.11.2004	gemischtes Hackfleisch	frisch	-	-	-
471	10.11.2004	Rinderhüftsteak	verpackt	-	-	-
472	10.11.2004	Rinderhüftsteak	verpackt	-	-	-
473	10.11.2004	Schweinebauch	frisch	-	-	-
474	10.11.2004	Schweinebauch	verpackt	-	-	-
475	10.11.2004	Rinderhackfleisch	verpackt	-	-	-
476	10.11.2004	Rinderhackfleisch	verpackt	-	-	-
477	10.11.2004	Schweinehackfleisch	frisch	-	-	-
478	10.11.2004	Schweinehackfleisch	verpackt	-	-	-
479	10.11.2004	gemischtes Hackfleisch	verpackt	-	-	-
480	10.11.2004	gemischtes Hackfleisch	verpackt	-	-	-
481	16.11.2004	Rinderhüftsteak	verpackt	-	-	-
482	16.11.2004	Rinderhüftsteak	verpackt	-	-	-
483	16.11.2004	Schweinebauch	frisch	-	-	-
484	16.11.2004	Schweinebauch	verpackt	-	-	-

Laufende Nummer	Datum des Ansatzes	Fleischart	Verpackungsart	Befund		
				§35 LMBG SC 48 h/RVS 48 h	§35 LMBG SC 48 h/RVS 24 h	IMS-real-time PCR
485	16.11.2004	Hähnchenschenkel	verpackt	-	-	-
486	16.11.2004	Hähnchenschenkel	verpackt	-	-	-
487	16.11.2004	Rinderhackfleisch	verpackt	-	-	-
488	16.11.2004	Rinderhackfleisch	verpackt	-	-	-
489	16.11.2004	Schweinehackfleisch	verpackt	-	-	-
490	16.11.2004	Schweinehackfleisch	verpackt	-	-	-
491	24.11.2004	Schweinebauch	verpackt	-	-	-
492	24.11.2004	Schweinebauch	verpackt	-	-	-
493	24.11.2004	Hähnchenschenkel	verpackt	-	-	-
494	24.11.2004	Hähnchenschenkel	verpackt	-	-	-
495	24.11.2004	Rinderhackfleisch	verpackt	-	-	-
496	24.11.2004	Rinderhackfleisch	verpackt	-	-	-
497	24.11.2004	Schweinehackfleisch	verpackt	-	-	-
498	24.11.2004	Schweinehackfleisch	verpackt	-	-	-
499	24.11.2004	gemischtes Hackfleisch	verpackt	-	-	-
500	24.11.2004	gemischtes Hackfleisch	verpackt	-	-	-

+: *Salmonella*-positiver Befund
-: *Salmonella*-negativer Befund

Danksagung

Im Zeitraum von Mai 2002 bis Juli 2005 habe ich meine Promotionsarbeit am Lehrstuhl für Tierhygiene der Technischen Universität München, Freising-Weihenstephan, angefertigt. Den Menschen, die mich auf diesem Weg unterstützt haben, möchte ich diese Seite widmen.

Meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr. Johann Bauer, gilt mein ganz besonderer Dank. Durch die freundliche Überlassung des Themas und die optimalen Arbeitsbedingungen ermöglichte er mir, diese Arbeit anzufertigen. Für seine geduldige und motivierende Unterstützung sowohl während der praktischen als auch schriftlichen Ausarbeitung danke ich ihm von Herzen. Dass ich seiner Unterstützung in allen Phasen dieser Arbeit sicher sein konnte, gab mir den Rückhalt für die Erstellung der Arbeit.

Besonders danke ich dem Bayerischen Staatsministerium für Umwelt, Gesundheit und Verbraucherschutz für die Bereitstellung der finanziellen Mittel.

Herrn Dr. Beck und Herrn Dr. Kämpf vom Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, danke ich sehr herzlich für die Überlassung von *Salmonella*-positiven Fleischproben.

In ganz besonderer Weise möchte ich mich bei Frau Dr. Putnik, von Roche Diagnostics GmbH, bedanken. Durch ihre freundliche Hilfsbereitschaft und konstruktiven Ratschläge half sie mir auch in aussichtslos erscheinenden Phasen der Arbeit weiter. Von ihrem Wissen und ihrer Erfahrung über DNA und real-time PCR konnte ich viel lernen.

Für ihre geduldige Hilfsbereitschaft bei Fragen zu IMS und real-time PCR danke ich von Herzen Frau Dr. Silke Schmid, die mir oft auch zu später Stunde ihr offenes Ohr schenkte. Mit ihren wertvollen Ratschlägen hat sie mir vor allem in der Einarbeitungsphase dieser Arbeit sehr weitergeholfen.

Den Mitarbeitern und Kollegen des Lehrstuhls für Tierhygiene danke ich an dieser Stelle ganz besonders für das freundschaftliche Arbeitsklima und die konstruktive Zusammenarbeit. Zwei technischen Assistentinnen möchte ich an dieser Stelle meine ganz besondere Wertschätzung entgegenbringen. Frau Andrea Kolm, die mich in die real-time PCR einwies, verdanke ich das praktische Grundwissen. Durch ihre fundierten Kenntnisse und ihre Erfahrungen half sie mir gerade in der Anfangsphase der Arbeit ein großes Stück weiter. Auch

Frau Barbara Dörr danke ich auf diesem Weg in besonderer Weise für ihre freundliche Zusammenarbeit. Sie unterstützte mich durch ihre Tips und Tricks zu bakteriologischen Arbeitsweisen sowie ihr präzises Arbeiten und ließ durch ihre humorvolle Art manch langen Tag im Labor oder am Flow kurzweilig werden. Für ihre Ausdauer, mit mir zusammen bei brütender Hitze in liebevoller Handarbeit hunderte von Feldproben zu schütteln, bedanke ich mich sehr herzlich bei ihr.

Ganz herzlich bedanke ich mich bei unserer Sekretärin, Frau Margret Laubmeier, die in unkomplizierter und hilfsbereiter Weise bei allen organisatorischen Problemen weiterhalf.

Mein ganz besonderer und liebevoller Dank gilt meinen Eltern. Sie ermöglichten mir diese Ausbildung nicht nur finanziell, sondern unterstützten mich auch in allen Phasen der Arbeit uneingeschränkt.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Notzon
Vorname	Angelika, Christiane
geboren am	01.12.1975 in Altötting

Schulbildung

09/1982 – 07/1986	Grundschule, Altötting Süd
09/1986 – 07/1987	Hauptschule, Altötting
09/1987 – 06/1996	Neusprachliches und Wirtschaftswissenschaftliches Gymnasium der Englischen Fräulein, Altötting

Hochschulausbildung

11/1996 – 03/2002	Studium der Ökotrophologie an der Technischen Universität München, Freising-Weihenstephan
05/2002 – 12/2005	Promotion am Lehrstuhl für Tierhygiene der Technischen Universität München, Freising-Weihenstephan