

Institut für Ernährungs- und Lebensmittelwissenschaften  
Lebensmittel-Mikrobiologie und Hygiene

---

Oberflächen als Übertragungswege für Salmonellen  
in der Fleischgewinnung beim Schwein

**I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n**

zur  
Erlangung des Grades

Doktor der Ernährungs- und Haushaltswissenschaft  
(Dr. oec. troph.)

der  
Hohen Landwirtschaftlichen Fakultät  
der  
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität  
zu Bonn

vorgelegt im Dezember 2005

von Katja Dünnebier

aus Krefeld

Referent: Prof. Dr. J. Krämer  
Korreferenten: Prof. Dr. B. Kunz  
Prof. Dr. R. Fries  
Tag der mündlichen Prüfung: 03. Mai. 2006  
Gedruckt bei: Mensch & Buch Verlag, Berlin

*Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver  
der ULB Bonn [http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss\\_online](http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online) elektronisch publiziert*

Dissertation,  
Landwirtschaftliche Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität zu Bonn, 2006

**D 98**

Teile der vorliegenden Arbeit wurden erstellt am

Institut für Fleischhygiene und -technologie  
Wissenschaftliche Einrichtungen Veterinary Public Health  
Freie Universität Berlin  
Brümmerstr. 10  
14195 Berlin

Leiter: Univ.-Prof. Dr. R. Fries



**Meinen Eltern**



---

## Inhaltsverzeichnis

		<b>Seite</b>
<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Literatur</b>	<b>3</b>
2.1	<i>Salmonella</i> : Systematik und Eigenschaften	3
2.2	<i>Salmonella</i> als Krankheitserreger beim Menschen	7
2.2.1	Auftreten / Häufigkeit der humanen Salmonellose in Deutschland	8
2.2.2	Bedeutung von Salmonellen aus Schweinefleisch als Erreger humaner Salmonellosen	11
2.3	Salmonellen beim Schwein	18
2.3.1	Prävalenz von Salmonellen beim Schwein	20
2.3.2	Salmonellen auf Oberflächen in der Fleischgewinnung beim Schwein	27
2.4	Typisierungsverfahren für <i>Salmonella</i> spp.	31
2.4.1	Phänotypische Methoden zur Identifizierung und Differenzierung von Salmonellen	34
2.4.2	Pulsfeld-Gelelektrophorese als eine genotypische Methode zur Identifizierung und Differenzierung von Salmonellen	38
2.4.2.1	Grundlegendes Prinzip	38
2.4.2.2	Auswahl der Endonukleasen	41
2.4.2.3	Technische Parameter	43
2.4.2.4	Darstellung und Interpretation der Makrorestriktionsfragmente	46
2.4.2.5	Anwendungen der PFGE	50
<b>3</b>	<b>Eigene Untersuchungen</b>	<b>55</b>
3.1	Material	55
3.1.1	Betriebsablauf und Bedingungen im Schlachtbetrieb	55
3.1.2	Geräte und Hilfsmittel zur Probenahme	56
3.1.3	Nährmedien, Chemikalien und Reagenzien	57
3.1.3.1	Nährmedien, Chemikalien und Reagenzien für phänotypische Untersuchungen	57
3.1.3.2	Nährmedien und Chemikalien für genotypische Untersuchungen	59

3.2	Methoden	59
3.2.1	Vorbereitende Maßnahmen und Untersuchungen	59
3.2.2	Probenumfang, Probenahmedesign, Transport	59
3.2.3	Gewinnung der Proben von den Geräteoberflächen (Tupferproben)	66
3.2.4	Gewinnung der Proben von Geweben und von Wasserproben	67
3.2.5	Mikrobiologische Untersuchungen	69
3.2.5.1	Bezugsgrößen	71
3.2.5.2	Ermittlung der aeroben Gesamtkeimzahl	72
3.2.5.3	Untersuchung auf Enterobacteriaceae	73
3.2.5.4	Untersuchung auf <i>Salmonella</i>	76
3.3	Ergebnisse	83
3.3.1	Messerflächen	83
3.3.2	Wasser	84
3.3.2.1	Temperaturen in den Sterilisationsbecken	84
3.3.2.2	Keimzahlen in den Sterilisationsbecken	85
3.3.3	Mikrobiologische Ergebnisse (quantitativ)	85
3.3.3.1	Aerobe Gesamtkeimzahl	85
3.3.3.1.1	Messer	85
3.3.3.1.2	Beile	87
3.3.3.2	Enterobacteriaceae	88
3.3.3.2.1	Messer	90
3.3.3.2.2	Beile	90
3.3.3.2.3	Handflächen/Kettenhandschuhe	91
3.3.4	<i>Salmonella</i> -Nachweise (qualitativ)	92
3.3.4.1	Anzahl, Anteil und Herkunft <i>Salmonella</i> -positiver Proben	92
3.3.4.2	Phänotypische und genotypische Charakterisierung der <i>Salmonella</i> -Isolate	95
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>102</b>
4.1	Diskussion von Material und Methoden	102
4.1.1	Vorgehen bei Probenahme und Transport	102
4.1.2	Auswahl der Untersuchungsverfahren	104
4.1.2.1	Kulturelle Untersuchungsmethoden	104



---

4.1.2.2	Molekularbiologische Untersuchungsmethoden: PFGE	105
4.1.2.2.1	Auswahl der Endonukleasen	108
4.1.2.2.2	Vorgehensweise/Ablaufprotokoll	110
4.1.2.2.3	Interpretation der PFGE-Muster	111
4.2	Diskussion der Ergebnisse	113
4.2.1	Diskussion der quantitativen Ergebnisse	113
4.2.1.1	Temperaturen in den Sterilisationsbecken	113
4.2.1.2	Aerobe Gesamtkeimzahl	114
4.2.1.3	Enterobacteriaceae	116
4.2.2	Die qualitativen Ergebnisse ( <i>Salmonella</i> )	119
4.2.2.1	Salmonellen auf den Oberflächen von Geräten	121
4.2.2.2	Salmonellen auf Oberflächen und Organen der geschlachteten Tiere	126
4.2.3	Verteilung von <i>Salmonella</i> in der Fleischgewinnungslinie beim Schwein	128
4.2.3.1	Auftreten von <i>Salmonella</i> innerhalb eines Probenahmetages	128
4.2.3.2	Wiederholtes Auftreten von <i>Salmonella</i> an verschiedenen Probenahmetagen	134
4.2.3.3	Wiederholtes Auftreten von <i>Salmonella</i> in einer Probe	137
4.2.3.4	Wiederholtes Auftreten von <i>Salmonella</i> in den Arbeitsabläufen der Fleischgewinnungslinie	138
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>144</b>
<b>6</b>	<b>Summary</b>	<b>146</b>
<b>7</b>	<b>Anhang</b>	<b>148</b>
7.1	Vorversuche / Qualitätssicherung	148
7.1.1	Maßnahmen zur Qualitätssicherung	148
7.1.2	Vorversuch: Tupfer	148
7.1.2.1	Ermittlung einer sachgerechten Befeuchtungsmethode der Tupfer	148
7.1.2.2	Isolierung von Keimen aus experimentell kontaminierten Tupfern	150
7.1.3	Interne Qualitätssicherung (qualitativ und quantitativ)	151
7.2	Ablaufübersichten / Protokolle	153
7.2.1	Untersuchungsgang <i>Salmonella</i>	153

7.2.2	Durchführung einer Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE)	154
7.3	Rezepturen von Medien, Chemikalien und Reagenzien	158
7.3.1	Rezepturen der Medien aus Tabelle 3.1	158
7.3.2	Chemikalien und Reagenzien zur phänotypischen Untersuchung von Isolaten	166
7.3.3	Chemikalien und Reagenzien zur genotypischen Untersuchung von Isolaten	169
7.4	Dokumentationsvorlagen	170
7.4.1	Vorversuche (interne Qualitätssicherung)	170
7.4.2	Gesamtkeimzahl	171
7.4.3	Enterobacteriaceae (Bestätigung)	172
7.4.4	<i>Salmonella</i> (Anwesenheit/Abwesenheit)	173
7.4.5	<i>Salmonella</i> (Bestätigung)	174
7.4.5	<i>Salmonella</i> (Biochemie)	175
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>176</b>

**Danksagung**

**Lebenslauf**

**Selbständigkeitserklärung**

## ABKÜRZUNGEN

Abb.	Abbildung
Art. Nr.	Artikelnummer
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
BgVV	Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin
BMVEL	Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft
BPLS	Brilliantgrün-Phenolrot-Lactose-Saccharose
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (-acetat)
et al.	et alii
ES	ETDA/Sarkosin
ESP	ETDA/Sarkosin/Proteinase K
Fa.	Firma
FIU	Fleischuntersuchung
GKZ	Gesamtkeimzahl
IfSG	Infektionsschutzgesetz
LMBG	Lebensmittel- und Bedarfsgegenstände-gesetz
LMP	low melting point
MHK	Minimale Hemmstoffkonzentration
MLCB	Mannit-Lysin-Kristallviolett-Brilliantgrün
MRVP	Methylrot-Voges-Proskauer
n.G.	nach Gebrauch
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
Nll.	Lymphknoten (Nodi lymphatici)
Nr.	Nummer
O/F	oxidativ/fermentativ
PFGE	Pulsfeldgelelektrophorese
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA oder Random Amplification of Polymorphic DNA
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
rpm	rounds per minute
S.	<i>Salmonella</i>
SCVPH	Scientific Committee on Veterinary Measures relating to Public Health
SIM	Schwefel, Indol, Motility (= Beweglichkeit)
STSal	Stammsammlung Salmonellen
Tab.	Tabelle
TBE	Tris/Borat/EDTA
TBG	Tetrathionat-Brilliantgrün-Galle
TSI	Triple Sugar Iron
U	Unit
u.a.	unter anderem
v.G.	vor Gebrauch
z.B.	zum Beispiel

**EINHEITEN und SYMBOLE**

cm	Zentimeter
cm <sup>2</sup>	Quadratcentimeter
g	Gramm
KbE	Koloniebildende Einheiten
log	Logarithmus zur Basis 10
mm	Milimeter
m <sup>2</sup>	Quadratmeter
min	Minute(n)
ml	Milliliter
sek	Sekunde(n)
U	Unit(s)
°C	Grad Celsius
%	Prozent
§	Paragraph
Ø	Durchschnitt
Σ	Summe

**LÄNDERKÜRZEL (Tab. 2.6 und 2.7)**

BE	Berlin
BW	Baden-Württemberg
BY	Bayern
HB	Bremen
HE	Hessen
HH	Hamburg
MV	Mecklenburg-Vorpommern
NI	Niedersachsen
NW	Nordrhein-Westfalen
RP	Rheinland-Pfalz
SH	Schleswig-Holstein
SL	Saarland
SN	Sachsen
ST	Sachsen-Anhalt

## 1. EINLEITUNG

Mit der Überschrift „*Salmonellen aus Schweinefleisch – nach wie vor ein Risiko*“ hat im Februar 2005 das Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) vor dem Verzehr von rohem Schweinefleisch gewarnt. Anlass war das gehäufte Auftreten einer seltenen Salmonellen-Serovar im Januar 2005 als Ursache für humane Salmonellosen, die auf den Verzehr von rohem Schweinefleisch zurückzuführen waren. In einigen Hinweisen zum sachgerechten, hygienischen Umgang mit Lebensmitteln, insbesondere mit rohem Fleisch, zur Verhütung einer Salmonellen-Kreuzkontamination bzw. -infektion wird der Endverbraucher angesprochen und auf die gesundheitliche Gefahr aufmerksam gemacht, die von Schweinefleisch ausgehen kann (BfR 2005).

Die Salmonellose beim Menschen ist trotz rückläufiger Meldezahlen in Deutschland immer noch eine der am häufigsten auftretenden bakteriellen Erkrankungen (BfR 2005; RKI 2003). Bei einer Anzahl von 56.273 gemeldeten Erkrankungen in 2004 und der Berücksichtigung einer Dunkelziffer von 80-90% (RKI 1998, 1999, 2000) ist neben dem gesundheitlichen Aspekt und der Gefahr von chronifizierenden Folgeerkrankungen der wirtschaftliche Folgeschaden (Behandlungskosten, Arbeitsausfall) erheblich.

So ist es im Sinne eines präventiven gesundheitlichen Verbraucherschutzes in der Bundesrepublik Deutschland ein Ziel der Rechtsprechung, die Bevölkerung vor einer Infektion mit Salmonellen zu schützen: Laut § 8 des Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetzes (LMBG) ist es verboten, „Stoffe, deren Verzehr geeignet ist, die Gesundheit zu schädigen, als Lebensmittel in Verkehr zu bringen“. Demnach dürfen Lebensmittel, auf oder in denen Salmonellen nachgewiesen wurden, nicht in die Nahrungskette gelangen.

Dennoch können - wie die Meldung des BfR zeigt - immer wieder *Salmonella*-Infektionen beim Menschen auf den Verzehr verschiedener Lebensmittel zurückgeführt werden. Auch in der Fleischgewinnungslinie beim Schwein ist das Vorkommen von Salmonellen in der Literatur mehrfach belegt. Beginnend im Pre-Harvest-Bereich, über die Fleischgewinnung im Schlachthof (LEUE et al. 2004) bis hin zum Erzeugnis (BOUGHTON et al. 2004) werden Salmonellen auf oder in dem Tier bzw. Produkt nachgewiesen. Zudem konnten *Salmonella*-Nachweise aus dem

Umfeld der Schweinefleischgewinnung geführt werden (z.B. LIMPITAKIS et al. 1999). STEINBACH und HARTUNG (1999) sehen in Kreuzkontaminationen innerhalb der Fleischgewinnungslinie zu 20% die Ursache für das Auftreten von Salmonellen auf den Karkassen bzw. dem Endprodukt Fleisch.

Vor diesem Hintergrund soll in der vorliegenden Arbeit der Frage nachgegangen werden, inwieweit die Produkt berührenden Oberflächen der Prozesslinie an der Verteilung von Salmonellen in der Fleischgewinnungslinie beim Schwein beteiligt sind.

Neben der Erhebung des Hygienestatus erfolgte hierzu die Erfassung und Charakterisierung von Salmonellen auf Oberflächen einer Fleischgewinnungslinie beim Schwein. Es werden sowohl die Produkt berührenden Oberflächen des Umfeldes als auch die jeweils kontaktierten Stellen der Tierkörper auf das Vorhandensein von Salmonellen untersucht.

## 2 LITERATUR

### 2.1 *Salmonella*: Systematik und Eigenschaften

Salmonellen wurden nach dem amerikanischen Bakteriologen Daniel Elmer SALMON benannt, der erstmals im Jahre 1890 von Mikroorganismen berichtet, die er als *Salmonella choleraesuis* bezeichnete (LE MINOR 1984).

Salmonellen können bei Menschen und Tieren Darminfektionen sowie Septikämien hervorrufen. Die Mikroorganismen können vom Tier auf den Menschen übertragen werden und zählen somit zu den Erregern von Zoonosen (SINELL 1992).

Das Genus *Salmonella* gehört zur Familie der Enterobacteriaceae. Es werden die beiden Spezies *Salmonella bongori* und *Salmonella enterica* unterschieden, die sich jeweils in Serovaren bzw. Subspezies und Serovaren untergliedern (WIELER und BAUERFEIND 1999). Abbildung 2.1 zeigt schematisch die weitere Unterteilung und Benennung der Mikroorganismen des Genus.

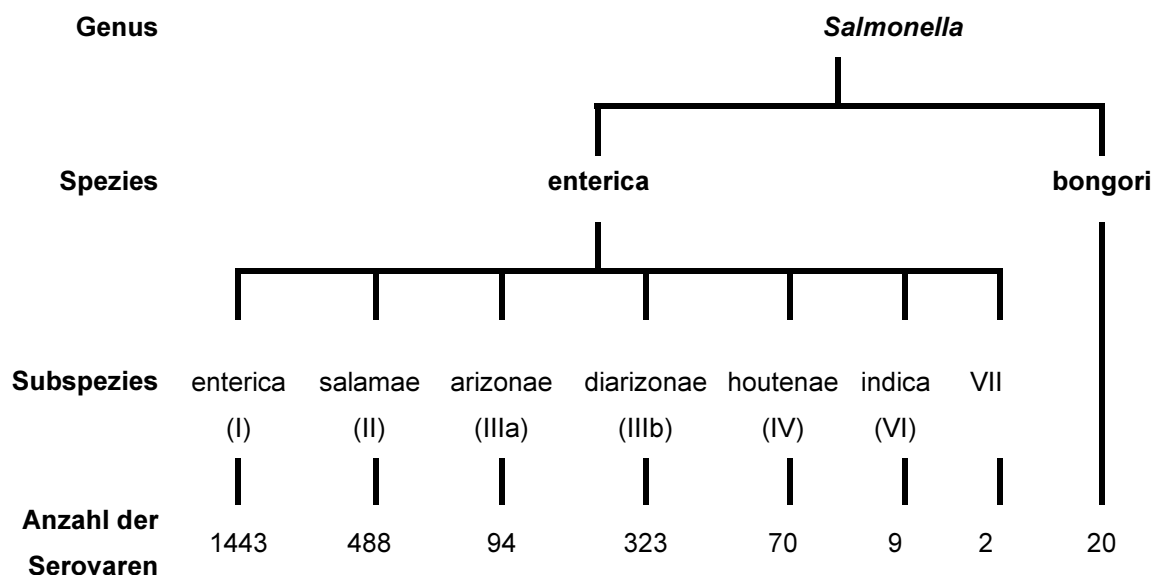


Abbildung 2.1: Taxonomie und Nomenklatur der Gattung *Salmonella* (WIELER und BAUERFEIND 1999)

Die Salmonellen der Spezies *Salmonella enterica* zeigen eine deutlich größere veterinär- und humanmedizinische Relevanz als die der Spezies *Salmonella bongori*. Subspezies I (*Salmonella enterica* subsp. *enterica*) ist hauptsächlich bei Warmblütern nachzuweisen, Subspezies II (*Salmonella enterica* subsp. *salamae*) und Subspezies III a und b (*Salmonella enterica* subsp. *arizonae* (a) und *diarizonae* (b)) kommen vorwiegend bei wechselwarmen Tieren vor. Vertreter der Subspezies IV (*Salmonella enterica* subsp. *houtenae*) sind überwiegend Umweltkeime, von denen nur wenige für Warmblüter pathogen sind. Die ehemalige Subspezies V erhielt den Status der eigenständigen Spezies *Salmonella bongori* und Subspezies VI wird als *Salmonella enterica* subsp. *indica* bezeichnet. (LE MINOR 1984; DEDIE et al. 1993; JAY 1996; KRÄMER 2002). Praxisrelevante Salmonellen stammen somit vorwiegend aus der Subspezies I (*Salmonella enterica* subsp. *enterica*). Der Trend zum Halten exotischer Haustiere lässt jedoch auch den Vertretern der Subspezies III und IV vermehrt Bedeutung zukommen (WOODWARD et al. 1997).

Um bei der Benennung von Serovaren unübersichtliche und lange Wortgebilde zu umgehen, wird für häufig auftretende Serovaren eine binominale Bezeichnung bevorzugt, bei der auf die Genusbezeichnung *Salmonella* direkt der Name der Serovar folgt. Zur Kenntlichmachung dieser Bezeichnungsform beginnt die Serovarbezeichnung mit Großbuchstaben. Nach dieser Übereinkunft wird beispielsweise *Salmonella enterica* subspezies *enterica* serovar *infantis* als *Salmonella* *Infantis* bezeichnet (LE MINOR und POPOFF 1987; SINELL 1992; DEDIE et al. 1993; KRÄMER 2002). Diese binominale Bezeichnung wird auch im Text der vorliegenden Arbeit verwendet.

Die Morphologie der Salmonellen zeigt gerade, sporenlose, gramnegative Stäbchen von 0,7 - 1,5 x 2,0 - 5,0 µm Umfang, die in der Regel peritrich begeißelt, demnach beweglich sind (Ausnahme: Serovar Gallinarum) (LE MINOR 1984).

Auf einfachen Nährmedien im aeroben oder fakultativ anaeroben Milieu bilden Salmonellen durchschnittlich 2 bis 4 mm große Kolonien, gelegentlich werden nur etwa 1 mm große Kolonien gebildet (LE MINOR 1984).

Die optimalen Wachstumstemperaturen für Salmonellen liegen bei 10 - 47°C. In einigen Fällen zeigen Salmonellen bereits bei 6 - 8°C Wachstum (RKI 2002a).



Der Stoffwechsel der Salmonellen ist fermentativ. Ihr Verhalten in charakteristischen biochemischen Reaktionen ist in Tabelle 2.1 dargestellt. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass, bedingt durch die große Anzahl an unterschiedlichen Serovaren (bis Ende 1996 waren über 2 400 bekannt, heute kennen wir über 2.500) (BOCKEMÜHL 1997, KRÄMER 2002), einige Salmonellen in ihrem Verhalten von diesem Reaktionsschema abweichen können.

Tabelle 2.1: Charakteristisches Verhalten von Salmonellen in ausgewählten biochemischen Reaktionen (nach LE MINOR 1984)

<b>Substrat bzw. Reaktion</b>	<b>Reaktionsverhalten</b>
Glukose, Mannit	Abbau unter Gasbildung
Arabinose, Maltose, Rhamnose, Sorbit, Xylose	Abbau
Adonit, Laktose, Raffinose, Saccharose, Salicin	kein Abbau
Methylrot-Reaktion	positiv
Nitratreduktion	positiv
Citrat	kann als alleinige Kohlenstoffquelle dienen
Schwefelwasserstoffbildung	positiv z.B. im Dreizucker-Eisen-Medium
Indolbildung, Voges-Proskauer-Reaktion, Äskulinspaltung, Ureasespaltung	negativ
Lysin, Ornithin, Arginin	Spaltung durch Decarboxylasen

Serologisch können Salmonellen anhand ihrer antigenen Eigenschaften unterschieden werden. Alle Salmonellen verfügen über somatische O-Antigene (Lipopolysaccharide als Bestandteil der Zellwand), H-Antigene (Proteine auf den Geißeln), Kapsel- (Vi- bzw. K-) Antigene und Fimbrien- (F-) Antigene (LE MINOR 1984; DEDIE 1993; KRÄMER 2002). Diese Antigene bzw. die Kombination ihres Auftretens machen die Serovar-Spezifität aus.

O-, H- und Vi-Antigene liegen als Merkmale der Einteilung von Salmonellen in die Antigen-Tabelle nach Kauffmann und White (Kauffmann-White-Schema) zugrunde. Den verschiedenen O-Antigenen werden Ziffern zugeordnet. H-Antigene erhalten je

nach Phase bzw. Zustand einen kleinen Buchstaben bzw. eine Ziffer. So kann jede *Salmonella*-Serovar mit einer spezifischen Bezeichnung der O- und H-Antigene eindeutig serologisch charakterisiert werden.

In Tabelle 2.2 sind ausgewählte human- und veterinärmedizinisch relevante Salmonellen in ihrer Einteilung nach dem Kauffmann-White-Schema dargestellt.

Tabelle 2.2: Einteilung ausgewählter Salmonellen in serologische Gruppen nach dem Kauffmann-White-Schema (LE MINOR 1984)

Gruppe	Serovar	O-Antigen	H-Antigen	
			Phase 1	Phase 2
<b>A</b>	S. Paratyphi A	1, 2, 12	a	[1,5] <sup>1)</sup>
<b>B</b>	S. Paratyphi B	1, 4, [5], 12	b	1, 2
	S. Derby	1, 4, [5], 12	f, g	[1, 2]
	S. Typhimurium	1, 4, [5], 12	i	1, 2
<b>C<sub>1</sub></b>	S. Paratyphi C	6, 7, [Vi]	c	1, 5
	S. Infantis	6, 7	r	1, 5
<b>C<sub>2</sub></b>	S. Newport	6, 8	e, h	1, 2
<b>D<sub>1</sub></b>	S. Typhi	1, 9, 12, [Vi]	d	-
	S. Enteritidis	1, 9, 12	g, m	[1, 7]
	S. Gallinarum-pullorum	1, 9, 12	-	-
<b>E<sub>1</sub></b>	S. Anatum	3, 10	e, h	1, 6

<sup>1)</sup> [...] = kann fehlen

## 2.2. *Salmonella* als Krankheitserreger beim Menschen

Salmonellen sind als ubiquitäre Erreger sowohl für Menschen als auch für Tiere pathogen. Die Mikroorganismen als Zoonosenerreger können vom Tier auf den Menschen übertragen werden und verursachen dort vorwiegend eine infektiöse Darmerkrankung (SINELL 1992).<sup>1</sup>

Die Infektion mit Salmonellen erfolgt überwiegend auf oralem Wege entweder direkt durch den Verzehr von *Salmonella*-kontaminierten Lebensmitteln oder indirekt (Schmierinfektion) durch den Kontakt mit kontaminierten Lebensmitteln bzw. anderen kontaminierten Gegenständen. Der direkte Übertragungsweg ist, mit Ausnahme von Kleinkindern, eher von nachrangiger Bedeutung (BgVV 2001).

Die Inkubationszeit bei der Salmonellose beträgt typischerweise 5 - 48 bzw. 72 Stunden. Die akuten Symptome einer Enteritis infectiosa sind Übelkeit, Erbrechen, Leibschmerzen sowie anhaltende Durchfälle (BAIRD-PARKER 1990, BOCKEMÜHL 1997), die in der Regel selbständig nach 2 - 4 Tagen wieder abklingen (JAY 1996). Der Erreger wird jedoch im Anschluss für kurze Zeit bis hin zu Monaten weiterhin ausgeschieden. Durchschnittlich 3 - 4 Wochen nach Abklingen der Infektion sind die Betroffenen wieder *Salmonella*-frei. 90% der Erkrankten scheiden nach etwa 9 Wochen den Erreger nicht mehr aus (DE WIT und ROMBOOTS 1992). Der Stuhl von zeitweisen Trägern bleibt bis zu 12 Monaten infektiös. 0,3 - 0,7% der Infizierten werden zu chronischen Trägern („Dauerausscheider“), bei denen über ein Jahr nach Erkrankung noch Salmonellen im Stuhl nachweisbar sind, ohne dass akute Krankheitssymptome auftreten (DE WIT und ROMBOOTS 1992).

Die Infektion mit nicht typhoiden Salmonellen kann auch chronische systemische Erkrankungen, wie beispielsweise eine reaktive Arthritis, nach sich ziehen (D'AUOST 1991, 1997 und 2000 in SCVPH 2003).

Bei manchen Infizierten verläuft die Infektion vollständig asymptomatisch, was offenbar in der individuellen Abwehrlage sowie der Infektionsdosis begründet ist (BOCKEMÜHL 1997).

Als Risikogruppe für eine *Salmonella*-Infektion gelten Säuglinge und Kleinkinder, alte Menschen, immunsupprimierte Patienten sowie Personen, die einer möglichen Erregerbelastung vermehrt ausgesetzt sind, z.B. Angehörige von Pflegeberufen, im

---

<sup>1</sup> Im Kontext der vorliegenden Arbeit werden ausschließlich nicht typhoide Salmonellosen erläutert.

landwirtschaftlichen Bereich Tätige oder Familienangehörige von Ausscheidern (BOCKEMÜHL 1997).

### **2.2.1 Auftreten / Häufigkeit der humanen Salmonellose in Deutschland**

Bei der Salmonellose des Menschen handelt es sich nach wie vor um die am häufigsten nach dem Infektionsschutzgesetz erfasste Krankheit (RKI 2003).

In Deutschland unterliegt ein Auftreten der Salmonellose bei indirektem oder direktem Nachweis der Meldepflicht nach § 7 IfSG. Die Meldung hat unverzüglich und namentlich beim zuständigen Gesundheitsamt (§ 8 (3) IfSG) zu erfolgen, wobei alle verfügbaren Patientendaten anzugeben sind (§ 9 (2) IfSG). Die zentrale Dokumentation der Meldungen sowie die Veröffentlichung der Daten erfolgt durch das Robert-Koch-Institut in Berlin (§ 4 IfSG).

Mit dem 01.01.2001 ist das Bundesseuchengesetz durch das Seuchenrechtsneuordnungsgesetz ersetzt worden, dessen Artikel 1 das Gesetz zur Verhütung und Bekämpfung von Infektionskrankheiten (Infektionsschutzgesetz, IfSG) darstellt. Damit haben sich die Meldemodalitäten für Salmonellosen geändert.

Während nach dem Bundesseuchengesetz der Verdacht auf akute infektiöse Gastroenteritis in jedem Falle meldepflichtig war, beschränkt sich im Infektionsschutzgesetz die Meldepflicht auf bestimmte Personenkreise bzw. ist an Bedingungen geknüpft (§ 6 IfSG). Der Verdacht auf eine akute infektiöse Gastroenteritis ist derzeit lediglich bei Personen meldepflichtig, die mit dem Herstellen, Behandeln oder Inverkehrbringen von Lebensmitteln betraut und/oder in Küchen von Gaststätten oder Gemeinschaftseinrichtungen tätig sind (§ 6 und § 43 IfSG). Sind Personen außerhalb dieses Kreises betroffen, so ist der Verdacht erst meldepflichtig, wenn zwei oder mehr gleichartige Erkrankungen mit wahrscheinlichem oder vermutetem epidemiologischen Zusammenhang auftreten und eine Erregerverbreitung vermutet werden kann (§ 6 IfSG).

Demnach sind die Zahlen ab 2001 unter veränderten Bedingungen zustande gekommen und nur bedingt mit der Anzahl der gemeldeten Fällen der Vorjahre vergleichbar.

Seit einem Höchststand im Jahre 1992 ist die Anzahl der gemeldeten Salmonellenerkrankungen in Deutschland rückläufig. Die Zahl der gemeldeten Salmonellosen seit 1992 ist in Abbildung 2.2 dargestellt.

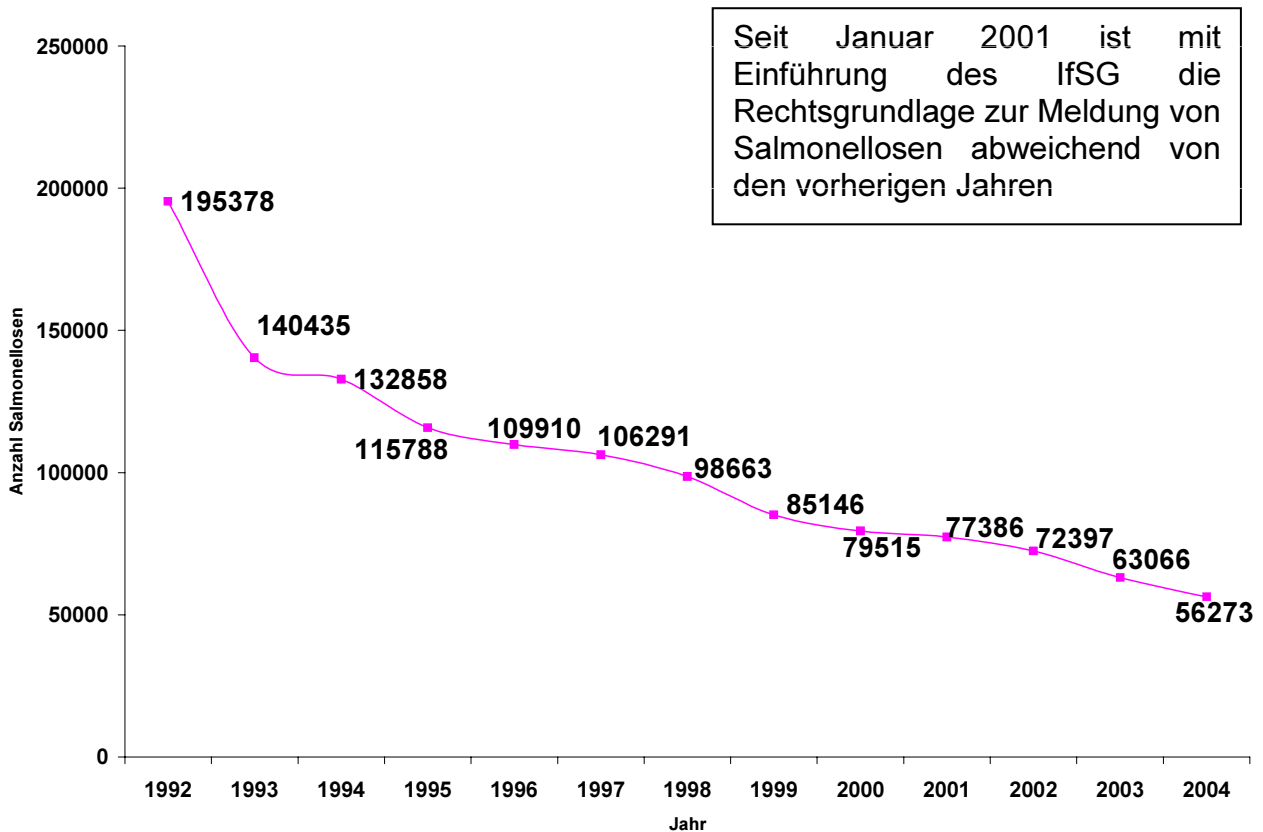


Abbildung 2.2: Anzahl der gemeldeten Salmonellosen seit 1992 (STATISTISCHES BUNDESAMT; ROBERT-KOCH-INSTITUT 2001 a und b, 2002, 2003, 2004, 2005)

Bei der Betrachtung der Daten ist zu berücksichtigen, dass nach Schätzungen des ROBERT-KOCH-INSTITUTs lediglich 10-20% der tatsächlichen Erkrankungen gemeldet werden. Die hohe Dunkelziffer von 80-90% lässt sich damit erklären, dass viele Infektionsfälle wegen eines milden Verlaufs nicht erkannt werden oder dass es trotz Diagnose nicht zur Meldung kommt (RKI 1998, 1999, 2000).

Im *Infektionsepidemiologischen Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2002* (RKI 2003) werden die Meldezahlen aus dem Jahr 2002 kritisch betrachtet und mit dem Datensatz aus 2001 verglichen. Daraus ergeben sich nähere Informationen zur jahreszeitlichen, geographischen und demographischen Verteilung von Salmonellosen sowie eine nähere Charakterisierung des Erregervorkommens.

Auch im Jahr 2002 traten Salmonellosen gehäuft in den warmen Sommermonaten auf, so dass in dieser Jahreszeit bis zu viermal mehr gemeldete Fälle je Meldewoche als in den Wintermonaten zu verzeichnen waren.

Entsprechend dem Vorjahr wurden aus den „neuen Bundesländern“ mehr Salmonellosen gemeldet als aus den alten. So hatte beispielsweise Mecklenburg-Vorpommern als Spitzenreiter nahezu doppelt so viele Salmonellose-Fälle je 100.000 Einwohner zu verzeichnen wie der bundesweite Durchschnitt. Ob dies in einer tatsächlich höheren Inzidenz oder in einer erhöhten Aufmerksamkeit gegenüber dem Krankheitsbild (und demnach einer geringeren Dunkelziffer) begründet liegt, bleibt ungeklärt.

In 89% der Fälle erfolgte die Meldung unter Angabe des Landes, in dem die Infektion stattgefunden hatte. Bei 6% davon hatte die Infektion mit Salmonellen im Ausland stattgefunden.

Die größte altersspezifische Häufung lag bei Säuglingen, Kleinkindern und Kindern bis 10 Jahren.

Angaben zur Serovar, der Gruppe nach Kauffman-White oder der Subspezies wurden insgesamt in 95% der gemeldeten Fälle übermittelt. Bei den 91% unter Angabe der Serovar gemeldeten Fälle wurden insgesamt 252 verschiedene Serovaren angegeben. Bei 75% handelte es sich um *Salmonella* Enteritidis, bei 19% um *Salmonella* Typhimurium. Im Vergleich mit 2001 ist das Auftreten von *Salmonella* Typhimurium leicht zugunsten von *Salmonella* Enteritidis zurückgegangen (2001: *S. Enteritidis* 68%, *S. Typhimurium* 24%, andere Serovaren 8%) (RKI 2003).

Für eine Behandlung von Salmonellosen wichtige Informationen über die in Deutschland auftretenden Salmonellen hat das Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) vorgelegt. In seinem Abschlussbericht zum Forschungsvorhaben "Erfassung phänotypischer und genotypischer Resistenzeigenschaften bei *Salmonella*- und *E.coli*-Isolaten vom Tier, Lebensmitteln, Futtermitteln und der Umwelt" (HELMUTH et al. 2004) ist der aktuelle Stand zu Auftreten und Verteilung von Serovaren und auch Resistenzen in Deutschland dargelegt. Von insgesamt 14.212 *Salmonella*-Isolaten aus den Jahren 2000-2003 (August) erwiesen sich rund 40% als vollständig sensibel und etwa 22% waren einfach resistent gegenüber den getesteten Antibiotika (siehe Tabelle 2.12). Bei 38 % der Isolate waren Multiresistenzen nachzuweisen.

Mit einer deutlichen Verschiebung ergeben sich für Schweine bzw. Lebensmittel vom Schwein folgende Werte: Von den 1.351 Isolaten aus Schweinen waren 11% sensibel, 9,5 % einfach- und 79,5% multiresistent. 1.253 Isolate aus der Kategorie Lebensmittel von Rind oder Schwein waren zu 26,8% sensibel, zu 16,1% einfach und zu 57,1% multiresistent. Als dominierende Serovar für die Herkunft Fleisch von Schwein/Rind/Kalb bezeichnen die Autoren *Salmonella* Typhimurium DT 104. Der Nachweis von bis zu fünf Resistenzen zusätzlich zur bekannten Pentaresistenz von *Salmonella* Typhimurium DT104 in Lebensmittel macht einerseits die Möglichkeit für Menschen deutlich, sich mit diesem Erreger zu infizieren. Andererseits zeigt sich so auch die große Schwierigkeit einer Behandlung im Falle einer auftretenden Salmonellose durch solche Stämme (HELMUTH et al. 2004, DORN et al. 2004).

### **2.2.2 Bedeutung von Salmonellen aus Schweinefleisch als Erreger humaner Salmonellosen**

Die Bedeutung von Salmonellen in Lebensmitteln allgemein ist Gegenstand der *Opinion of the Scientific Committee on Veterinary Measures relating to Public Health of Salmonellae in Foodstuffs* (SCVPH 2003). Das wissenschaftliche Komitee war aufgefordert worden, solche Lebensmittel zu benennen, in denen das Vorhandensein von Salmonellen ein hohes Risiko für die menschliche Gesundheit darstellen würde. Darüber hinaus sollte auf wissenschaftlicher Grundlage die Eignung mikrobiologischer Grenzwerte zur wirkungsvollen Verringerung des oben genannten Risikos beurteilt werden. Auch die Frage, in welchem Fall die Erstellung eines konkreten Risikoprofils sinnvoll wird, sollte erörtert werden.

Bei der Beantwortung der ersten Fragestellung wurde neben der Prävalenz von Salmonellen im betreffenden Lebensmittel in den verschiedenen Produktionsstufen und möglichen Übertragungswegen auch berücksichtigt, ob im Verlauf der Herstellung ein Prozessschritt erfolgt, der Salmonellen aus dem betreffenden Lebensmittel zu eliminieren vermag. Zudem wurde die Inzidenz humaner Salmonellosen mit einbezogen.

Das SCVPH kam zu dem Ergebnis, dass (Rot-) Fleisch und Fleischprodukte von Säugetieren, zu denen auch die Schweine zählen, hinsichtlich der Salmonellen ein hohes Risiko für die Gesundheit der Konsumenten darstellen, insbesondere wenn in

der Primärproduktion eine hohe *Salmonella*-Prävalenz zu verzeichnen ist. Das Risiko, nach Fleischverzehr an einer Salmonellose zu erkranken, wurde als besonders hoch eingestuft, wenn das Fleisch roh verzehrt wird bzw. ein Garprozess nicht vollständig abgeschlossen wurde. Bei vollständig gekochtem Fleisch wurde das Risiko geringer eingestuft, wobei die Gefahr einer Rekontamination mit Salmonellen durch Kreuzkontamination oder schlechte Herstellungspraxis grundsätzlich bestehen bleibe.

Die Einordnung des SCVPH spiegelt sich in der übrigen Literatur wider, in der immer wieder humane Salmonellosen auf den Verzehr von Schweinefleisch und dessen Zubereitungen zurückgeführt werden. Im Folgenden eine Auswahl relevanter Fälle:

VAN NETTEN et al. (1986) verzeichneten in den Niederlanden einen Salmonellose-Ausbruch durch *Salmonella* Typhimurium aus fermentiertem Schweinefleisch, bei dem 17 Menschen erkrankten.

BARRELL (1987) berichtete von 8 Menschen aus Nordengland, die durch *Salmonella* Typhimurium PT 193 aus einem kontaminierten Schweinebraten infiziert wurden. Der Erreger konnte sowohl aus kaltem Schweinebratenfleisch, welches in der örtlichen Metzgerei angeboten wurde, als auch aus dem Stuhl der Patienten isoliert werden (MAGUIRE et al. 1993).

*Salmonella* Newport in Schweinefleisch für Sandwiches war 1982 die Ursache für eine Salmonellose bei 120 Menschen aus Arkansas, von denen 23 stationär behandelt werden mussten (NARAIN und LOFGREN 1989).

THORNTON et al. (1993) konnten in Nord-West England und Nord-Wales eine Gruppenerkrankung durch *Salmonella* Typhimurium DT 193 bei 39 Personen auf unvollständig gegarten Schinken zurückführen. Bei MAGUIRE et al. (1993) ist die Anzahl der Betroffenen bei diesem Ausbruch mit 206 Personen beziffert.

Nach dem Verzehr von ebenfalls unzureichend gegartem Schweinefleisch erkrankten 1995 bei einem Kirchen-Camp in Sydney 22 Personen an *Salmonella* Typhimurium PT 9 (DELPECH et al. 1998).



GESSNER und BELLER (1994) berichten von *Salmonella*-Erkrankungen durch *Salmonella* Typhimurium bei 22 Picknick-Teilnehmern aus Alaska, die gegrilltes Schweinefleisch verzehrt hatten.

STEGE (1994) belegt einen Salmonellose-Ausbruch bei 55 Menschen, bei dem *Salmonella* Infantis aus Schweinefleisch ursächlich war. Der Erregerstamm konnte mit Hilfe der Pulsfeld-Gelelektrophorese eindeutig über einzelne Prozessstufen bis in den Zulieferbetrieb des örtlichen Schlachthofs zurückverfolgt werden (WEGENER und BAGGESEN 1996).

In zwei benachbarten Landkreisen Thüringens erkrankten 1997 insgesamt 48 Personen bei zwei Salmonellose-Ausbrüchen an *Salmonella* Typhimurium LT DT 168. Bei 6 weiteren Personen konnte ein Dauerausscheidertum festgestellt werden. Mit Hilfe der Lysotypie konnte ein Zusammenhang zwischen den Erkrankungen und dem Konsum von Schweinefleischprodukten (Hackfleisch, Rohwurst, Bratwurst, Fleischsalat) dargestellt werden (RKI 1997).

NG et al. (1997) beschreiben einen Salmonellose-Ausbruch (*Salmonella* Enteritidis) nach einer Heimspeisung mit konserviertem Schweinefleisch in Singapur im Jahr 1995. Es erkrankten insgesamt 16 Bewohner, bei 19 weiteren Bewohnern verlief die Infektion asymptomatisch.

*Salmonella* Enteritidis PT6 war Auslöser eines Ausbruchs von Salmonellose bei 11 Personen in Middlesbrough. Die Infektion konnte mit hoher Wahrscheinlichkeit auf den Verzehr von Schweinepastete zurückgeführt werden (HOLTBY et al. 1997).

Nach dem Verzehr von Schweine-Innereien (*Kaldaunen, Kutteln, pig bag*) erkrankten in Süd-Yorkshire 22 Personen an *Salmonella* Typhimurium DT 170 (CORNELL und NEAL 1998).

LLEWELLYNN et al. (1998) schildern Erkrankungsfälle in Wales, die auf *Salmonella* Typhimurium DT 124 aus Schinken zurückgehen.

MOLBAK et al. (1999) beschreiben einen Salmonellose-Ausbruch durch *Salmonella* Typhimurium DT104 (Nalidixinsäure resistent, verringerte Empfindlichkeit gegenüber Fluorochinolonen) im Jahr 1998 in Dänemark, bei dem 25 Patienten eine *Salmonella*-positive Stuhlprobe aufwiesen. 11 dieser Patienten mussten stationär behandelt werden, zwei verstarben. Mit Hilfe molekularbiologischer Untersuchungen konnte ein Schweinebestand als Primärquelle ermittelt werden.

Im Jahr 1999 erkrankten in den Niederlanden nach dem Verzehr von gesalzenem, getrocknetem und geräuchertem Schinken 38 Menschen an *Salmonella* Typhimurium PT 20 (MERTENS et al. 1999).

Insgesamt 51 Personen (33 symptomatisch, 18 asymptomatisch) aus Japan erkrankten 1993 an Salmonellose durch *Salmonella* Typhimurium bzw. wurden damit infiziert. Mit Hilfe der Pulsfeld-Gelelektrophorese konnte die Erkrankung eindeutig auf den Verzehr von geröstetem Schweinefleisch zurückgeführt werden (MURASE et al. 2000).

GERICKE et al. (2001) gelang es, in Thüringen einen Salmonellose-Ausbruch (keine Angaben über die Anzahl der Erkrankten) durch *Salmonella* Typhimurium DT 12 eindeutig auf ein Rohwurstprodukt aus Schweinefleisch zurückzuführen.

Die Salmonellose von 32 Patienten in Bayern (*Salmonella* Typhimurium DT177) konnten SAUER et al. (2001) auf den Verzehr von „Rohe Polnische“ Wurst aus Schweinefleisch zurückleiten.

Im Rahmen einer epidemiologischen Untersuchung durch das ROBERT-KOCH-INSTITUT konnte im Jahr 2001 die Infektion durch *Salmonella* Goldcoast bei 11 von 28 Personen auf (Schweine-) Knackwurst zurückgeführt werden. Während andere Schweinefleischerzeugnisse aus der örtlichen Metzgerei als Ursache nicht in Frage kamen, konnte bei fünf Erkrankten rohes Schweinehackfleisch als Quelle für *Salmonella* Goldcoast nicht zweifelsfrei ausgeschlossen werden (RKI 2002b). Diese Fallstudie wird auch beschrieben von BREMER et al. (2004).

In Thüringen konnten im Jahr 2001 insgesamt 13 *Salmonella*-Infektionen (*Salmonella* Bovismorbificans) auf rohes Hackfleisch aus einer lokalen Schlachtereier zurückgeführt werden (RKI 2005b).

Das ROBERT-KOCH-INSTITUT schilderte einen überregionalen Salmonellose-Ausbruch durch *Salmonella* München. In Berlin erkrankten 36 Personen, in Brandenburg 41 Personen, in Sachsen kam es zu 11 Erkrankungen und in Baden-Württemberg wurden 67 Erkrankte gemeldet. In Berlin, Brandenburg und Sachsen konnten die Erkrankungen auf den Genuss verschiedener Schweinefleischprodukte zurückgeführt werden. Die PFGE-Analyse der Stämme zeigte, dass die Isolate aus Brandenburg, Berlin und Sachsen einem identischen Klon zugeordnet werden konnten. Die Isolate aus Baden-Württemberg zeigten ebenfalls übereinstimmende PFGE-Muster, die jedoch von den Mustern der Isolate aus den anderen Bundesländern abwichen. Bei den Erkrankungen in Baden-Württemberg konnte Schweinefleisch als Infektionsquelle ausgeschlossen werden (RKI 2002d).

Durch *Salmonella* Give erkrankten im Jahr 2004 in Deutschland 115 Personen an Gastroenteritis. Mit Hilfe der Pulsfeld-Gelelektrophorese konnte die Herkunft des Erregers (rohes Schweinehackfleisch aus einem Schlachthof in Niedersachsen) ermittelt werden (RKI 2004b).

Im selben Jahr führte *Salmonella* Infantis in Brandenburg zu 31 Gastroenteritiden. Bei 14 Personen verlief die Infektion asymptomatisch. Mittels Pulsfeld-Gelelektrophorese konnten rohes Hackfleisch und Wurstwaren als Erregerquelle ermittelt werden (RKI 2005b).

Ende 2004 häuften sich in Deutschland Nachweise von *Salmonella* Bovismorbificans als Ursache für 410 Fälle humaner Salmonellose vorwiegend in den nördlichen und westlichen Bundesländern. Es kam zu einem *Salmonella* Bovismorbificans bedingten Todesfall. Mit Hilfe der Pulsfeld-Gelelektrophorese konnte Zwiebelmettwurst als wahrscheinliches Vehikel ermittelt werden (RKI 2005a).

Eine Quantifizierung der Bedeutung von Salmonellen aus Schweinefleisch als Erreger humaner Salmonellosen nehmen STEINBACH und KROELL (1999) vor. Die

Autoren führten eine Schätzung durch, wie viele der gemeldeten Salmonellosen auf Salmonellen aus dem Umfeld der Fleischgewinnung beim Schwein zurückgeführt werden können. Diese rein rechnerische Herleitung basiert auf den Daten zu humanen Salmonellosen, die auf von Tieren stammende Lebensmittel (insbesondere Rotfleischprodukte) zurückzuführen sind sowie auf den Zahlen zum Nachweis von *Salmonella* Typhimurium in solchen Lebensmitteln und beim Menschen. 1997 lag die absolute Zahl solcher Salmonellosen demnach etwa bei 20.000 Fällen. Bei Berücksichtigung der allgemein anzunehmenden Dunkelziffer dürften 1997 etwa 100.000 bis 200.000 humane Salmonellosen auf Salmonellen aus Schweinefleisch zurückzuführen gewesen sein (STEINBACH und KROELL 1999). STEINBACH und HARTUNG (1999) ermittelten einen Anteil von 20% humaner Salmonellosen, die auf eine Aufnahme des Erregers durch Schweinefleisch zurückzuführen sind.

Zur Zahl der humanen *Salmonella*-Erkrankungen, die auf kontaminiertes Schweinefleisch zurückgehen, liegen auch Schätzungen aus dem europäischen Ausland vor. So veranschlagen BERENDS et al. (1998a) für die Niederlande einen Anteil von 15% (5-25%). Nach einer Analyse der einschlägigen Daten aus den Jahren 1984 bis 2001 beziffern VAN DUIJKEREN et al. (2002) den Anteil in den Niederlanden mit 25%. Für Dänemark gehen BORCH et al. (1999) davon aus, dass 15% der humanen Salmonellosen mit dem Verzehr von Schweinefleisch in Zusammenhang stehen.

Daten aus Deutschland zum Nachweis von Salmonellen in Schweinefleisch wurden für das Jahr 2000 vom BgVV bzw. für 2001 vom BfR veröffentlicht (SCHROETER et al. 2001 und 2002). Grundlage dieser Daten waren die nach Umsetzung der EU-Richtlinie 89/397/EWG über die amtliche Lebensmittelüberwachung zu entnehmenden Planproben. Tabelle 2.3 zeigt die Anzahl der *Salmonella*-Nachweise aus Schweinefleisch-Planproben inklusive einiger Anlassproben und sonstiger Untersuchungen in den Jahren 2000 und 2001.

Tabelle 2.3: *Salmonella* positive Schweinefleisch-Planproben der Jahre 2000 und 2001 (SCHROETER et al. 2001 und 2002) in Prozent

	Gesamtprobenzahl	<i>Salmonella</i> -Nachweise [%]
<b>2000</b>	1.614	3,72
<b>2001</b>	1.547	3,81

DORN et al. (2004) geben in ihrer Veröffentlichung für Deutschland eine Übersicht über das Auftreten bestimmter Serotypen, Lysotypen und Antibiotikaresistenzen beim Schwein und bei Lebensmitteln aus Schweinefleisch (Schweinefleisch, Hackfleisch, Wurst). Im Jahr 2001 stammten demnach 21% der in das Nationale veterinärmedizinische Referenzlabor für Salmonellen eingeschickten Isolate vom Schwein (8%) bzw. den aus Schwein gefertigten Lebensmitteln (13%). Bei der Verteilung der Serovaren aus diesen Isolaten war mit einer Häufigkeit von 81,1% eine deutliche Dominanz von *Salmonella* Typhimurium zu erkennen, gefolgt von *Salmonella* Derby mit 7,4%. Auch bei Lebensmitteln vom Schwein dominierte *Salmonella* Typhimurium mit 66,2%, auch hier gefolgt von *Salmonella* Derby mit 5,4%. Die herausragende Serovar war in beiden Kategorien *Salmonella* Typhimurium DT104 (Schwein: 61,9%, Lebensmittel vom Schwein: 45,8%). Zum Auftreten von *Salmonella* Enteritidis betonen die Autoren, dass es deutlich häufiger zu einem Nachweis aus Lebensmitteln vom Schwein als aus dem Schwein selber kam. Die Begründung dafür sehen DORN et al. (2004) in einer möglichen Kontamination bei Verarbeitungsprozessen. Vorherrschender Phagentyp für *Salmonella* Enteritidis war PT4.

Als weitere Besonderheit stellen die Autoren heraus, dass *Salmonella* Typhimurium U302 im Gegensatz zum häufigen Auftreten in den USA oder dem UK seit 1997 nur insgesamt 13 mal isoliert werden konnte.

Aus dem Zoonosenbericht der EU für das Jahr 2003 gehen regionale Unterschiede bei der Serovar-Verteilung in den unterschiedlichen Mitgliedstaaten hervor. Die prozentuale Verteilung der häufigsten Serovaren in Schweinen in einigen europäischen Ländern (Isolate von Importtieren wurden ausgeschlossen) ist der Tabelle 2.4 zu entnehmen. Die Daten sind in der Quelle als Auszug angegeben. So lässt sich für die einzelnen Länder nicht erkennen, durch welche Serovaren sich die

restlichen (bis zu 100% fehlenden) Anteile generieren und wie sich die Streuung der Serovaren in den einzelnen Ländern gestaltet.

Die europaweite Dominanz von *S. Typhimurium* wird jedoch deutlich.

Tabelle 2.4: Vorkommen der häufigsten *Salmonella*-Serovaren in Schweinen aus ausgewählten europäischen Ländern (gerundet, Auszug) in Prozent (nach EU 2003)

	Deutschland	Dänemark	Frankreich	Niederlande	Italien
<b>S. Typhimurium</b>	68	70	25,3	55,4	18,1
<b>S. Derby</b>	2,3	14,8	0	7,9	7,6
<b>S. Gruppe B (O-Form)</b>	9,2	-	0	-	
<b>S. Goldcoast</b>	0	-	0	6,1	1,5
<b>S. Livingstone</b>	0,6	-	0	7,5	2,5
<b>S. Panama</b>	0,2	-	0	1	-
<b>S. Dublin</b>	-	-	28,1	0	-
<b>S. Infantis</b>	0,65	4,8	0	1,4	0,5
<b>S. Brandenburg</b>	0,2	0,3	0	4,3	-

Ebenso wie bei den Schweinen dominiert auch in Schweinefleisch nahezu europaweit *S. Typhimurium*, gefolgt von *S. Derby* (EU 2003). In Frankreich ist, als einziges europäisches Land, ist zudem *S. Dublin* stark vertreten. *S. Infantis* hat eine besondere Bedeutung in Dänemark, wo sie als dritthäufigste Serovar dokumentiert wurde.

Insgesamt werden als die EU-weit am häufigsten isolierten Serovaren *S. Typhimurium*, *S. Derby*, *S. Gruppe B (O-Form)*, *S. Goldcoast* und *S. Livingstone* aufgeführt (EU 2003).

### 2.3 Salmonellen beim Schwein

*Salmonella* ist auch für Schweine pathogen. LINTON (1979) sowie STEINBACH und KROELL (1999) unterscheiden wirtsadaptierte Salmonellen von nicht wirtsadaptierten Salmonellen. Wirtsadaptiert meint, dass *Salmonella* nicht nur mit dem Wirt assoziiert ist, sondern dort zudem eine generalisierte Erkrankung hervorrufen

kann (BOCKEMÜHL 1997). Wirtsadaptierte Krankheitserreger zeigen bei der Spezies, an die sie adaptiert sind, eine höhere Virulenz als bei anderen Spezies (BAIRD-PARKER 1990).

Tabelle 2.5: Einteilung von Salmonellen nach Wirtsspezifität und Pathogenität (JAY 1996)

<b>Salmonellen, die nur Menschen infizieren (wirtsspezifisch Mensch)</b>	S. Typhi, S. Paratyphi A und B.
<b>Humanpathogene wirtsadaptierte Salmonellen</b>	Geflügel : S. Gallinarum Rind : S. Dublin Pferd : S. Abortus-equi Schwein : S. Choleraesuis
<b>Human- und tierpathogene, nicht wirtsadaptierte Salmonellen</b>	die meisten Lebensmittel kontaminierenden Salmonellen, z.B. S. Enteritidis, S. Infantis, S. Agona, S. Typhimurium

Als bedeutendste nicht adaptierte Serovar für Schweine wird *Salmonella* Typhimurium genannt (LINTON 1979; STEINBACH und KROELL 1999). Bereits Anfang der 70er Jahre konnte dies in dem umfangreich angelegten „Walcheren-Projekt“ gezeigt werden (EDEL et al. 1976; EDEL und KAMPELMACHER 1976; EDEL et al. 1978) und ist bis heute immer wieder belegt worden (Mc COUGHEY et al. 1973; DE WIT und KAMPELMACHER 1981; BAGGESEN et al. 1996; RKI und BgVV 1997; WIELER und BAUERFEIND 1999; BgVV 2001). Eine Einteilung der Salmonellen nach der Wirtsspezifität ist der Tabelle 2.5 zu entnehmen.

Die Infektion mit *Salmonella* Choleraesuis als wirtsadaptierte Serovar erfolgt am häufigsten bei 8 - 16 Wochen alten Ferkeln und tritt insgesamt bei Schweinen eher gelegentlich auf. Eine Infektion führt zur akuten Erkrankung in Form einer Septikämie mit Milz- und Lymphknotenschwellungen, hämorrhagischer Gastroenteritis mit Durchfällen und generalisierten Blutungen. Es kommt zu zyanotischen Hautveränderungen, Pneumonie, Encephalitis und Meningitis. Die Tiere sind meist hochgradig abgeschlagen und appetitlos. Es treten plötzliche Todesfälle auf (PLONAIT und BICKHARDT 1988; SCHMITTEN 1989; DEDIE et al. 1993;

STEINBACH und KROELL 1999; BURGSTALLER et al. 1999). Die Morbidität liegt bei 50 - 80% und die Mortalität bei 5-10 (manchmal 70) % (STEINBACH und KROELL 1999). Vorwiegend verläuft die Erkrankung jedoch subklinisch bzw. asymptomatisch und protrahiert ohne pathologisch-anatomischen Befund (DEDIE et al. 1993; STEINBACH und KROELL 1999).

Bei einer Infektion von Schweinen mit nicht wirtsadaptierten Salmonellen, vorwiegend *Salmonella* Typhimurium, zeigen die Tiere eher einen chronischen Krankheitsverlauf. Als typisches Erscheinungsbild gelten zeitweise Temperaturerhöhung, chronischer übel riechender und flüssiger Durchfall sowie protrahierte Enterocolitis. Es kann zur Abmagerung und zum Tod der Tiere durch Erschöpfung kommen (PLONAIT und BICKHARDT 1988; SCHMITTEN 1989; STEINBACH und KROELL 1999). Eine Septikämie ist möglich, aber auch bei einer Infektion der Schweine mit nicht wirtsadaptierten Salmonellen verläuft die Krankheit meist asymptomatisch (LINTON 1979; STEINBACH und KROELL 1999). Infektionsdosen von  $10^3$  bis  $10^5$  Keimen führen zu einer vorübergehenden Haftung im Darm und Ausscheidung, erst höhere Dosen von  $10^7$  bis  $10^9$  Keimen führen zu Erkrankung und Dauerausscheidung (DEDIE et al. 1993). Zudem müssen nach SCHMITTEN (1989) „resistenzvermindernde Faktoren“ wie Haltungs- und Fütterungsfehler sowie zusätzliche Belastungen (z.B. Unterernährung) vorliegen, damit der Infektion der Tiere auch eine Erkrankung folgt.

Die Infektion von Schweinen mit Salmonellen läuft in drei Stufen ab: zunächst die Besiedlung des Darmes und Adhäsion der Erreger an die Darmwand, dann das Eindringen der Salmonellen in die Darmwand und schließlich die Wanderung zu den Gekröse-Lymphknoten und anderen Organen (BERENDS et al. 1996).

### **2.3.1 Prävalenz von Salmonellen beim Schwein**

Das Vorkommen von Salmonellen bei Schlachtschweinen wird in Deutschland auf verschiedene Art erfasst. Bei der Schlachtier- und Fleischuntersuchung, der jedes zu schlachtende Schwein zwingend unterzogen wird, ist die Salmonellose eines der Untauglichkeitskriterien (FIHV Anlage 1, Kap. I V). Zudem kann der



Salmonellenstatus von Schlachtschweinen im Rahmen freiwilliger Überwachungs- und Qualitätssysteme, wie beispielsweise des QS-Systems, erfasst werden (<http://www.q-s.info>).

Ursprünglich basierend auf der Zoonose-Richtlinie 92/117/EWG (heute ersetzt durch die Richtlinie 2003/99/EG des Europäischen Parlaments und des Rates), erfolgt jährlich eine bundesweite Erhebung von Zoonose-Daten durch das Nationale Referenzlabor für die Epidemiologie der Zoonose im BfR (NRL-E) in Zusammenarbeit mit dem Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft (BMVEL). Hierbei übermitteln die Landesbehörden bzw. stellvertretenden Fachlaboratorien der einzelnen Bundesländer entsprechende Daten an das NRL-E. Diese Daten zu Tieren werden dort analysiert und veröffentlicht. Die Ergebnisse aus dem Jahr 2001 sind in den Tabellen 2.6 und 2.7 dargestellt.

Tabelle 2.6: *Salmonella*-Nachweise bei Schweinen (Herden/Gehöfte) in Deutschland im Jahr 2001 (HARTUNG 2001)

Herkunft <sup>1)</sup>	Herden/ Gehöfte <sup>2)</sup>	<i>Salmonella</i> positiv	<i>Salmonella</i> positiv [%]
<b>Schweine gesamt bakteriologisch</b> (BW, MV, NI, NW, RP, SN, ST)	1430	104	7,27
<b>Schweine gesamt immunologisch</b> (MV)	7	3	
<b>Zuchtschweine</b> (BW, NI, ST, NW)	240	4	1,67
<b>Mastschweine</b> (BW, NI, ST, NW)	487	15	3,08

- 1) Die einzelnen Datensätze sind jeweils unterschiedlicher Herkunft. Die Daten liefernden Bundesländer sind jeweils mit ihren Länderkürzeln (siehe auch Abkürzungsverzeichnis) aufgeführt. Auf die Erläuterung ihrer Untersuchungsmethodik der einzelnen Bundesländer wurde in dieser Darstellung verzichtet.
- 2) Alle Herden-, Gehöft- oder Betriebseinheiten-Bezüge werden in der Ursprungsstatistik von dessen Verfasser pauschal unter „Herden/Gehöfte“ zusammengefasst.

Dem Bericht über die epidemiologische Situation der Zoonosen in Deutschland für 2001 (HARTUNG 2001) (vergl. Tabelle 2.6) ist zu entnehmen, dass bei der Untersuchung von Schweinebeständen auf *Salmonella* mit kulturellen Methoden eine Belastung von 7,27% nachweisbar war. Zuchtschweinbestände waren zu 1,67% mit Salmonellen belastet und Mastschweinbestände zu 3,08%. Bei serologischen

Untersuchungen in Mecklenburg-Vorpommern waren 3 von 7 untersuchten Herden/Gehöfte *Salmonella*-positiv.

Die im gleichen Rahmen erfolgte Untersuchung von Einzeltieren (vergl. Tabelle 2.7) durch die Autoren ergab eine *Salmonella*-Belastung von 4,34%. Die ausschließlich aus Mecklenburg-Vorpommern stammenden Ergebnisse aus serologischen Untersuchungen von Einzeltieren zeigten eine Salmonellen-Belastung von 13,44%. Bei Einzeltier-Untersuchungen von Zuchtschweinen waren 1,97% der untersuchten Proben *Salmonella*-positiv, bei Mastschweinen 3,1% der Untersuchungen.

Tabelle 2.7: *Salmonella*-Nachweise bei Schweinen (Einzeltiere) in Deutschland im Jahr 2001 (HARTUNG 2001)

Herkunft <sup>1)</sup>	Einzeltiere	<i>Salmonella</i> positiv	<i>Salmonella</i> positiv [%]
<b>Schweine gesamt bakteriologisch</b> (BE, BW, BY, HB, HE, HH, MV, NI, NW, RP, SH, SL, SN, ST)	14467	628	4,34
<b>Schweine gesamt immunologisch</b> (MV)	186	25	13,44
<b>Zuchtschweine</b> (BW, NI, ST, NW)	763	15	1,97
<b>Mastschweine</b> (BW, NI, ST, NW)	1356	42	3,10

<sup>1)</sup> Die Daten liefernden Bundesländer sind jeweils mit ihren Länderkürzeln (siehe auch Abkürzungsverzeichnis) aufgeführt. Auf die Erläuterung ihrer Untersuchungsmethodik der einzelne Bundesländer wurde in dieser Darstellung verzichtet.

Die Autoren sehen bei einem Vergleich mit Zahlen aus dem Vorjahr einen positiven Trend, der auf eine mögliche Reduzierung der Salmonellosen beim Mastschwein und ein vermindertes Auftreten von Salmonellen in Schweinefleisch hinweist.

FEHLHABER et al. (1996) untersuchten im Rahmen von sechs Studien (1992-1996, drei Schlachthöfe) 4.244 klinisch gesunde, tauglich beurteilte Schweine auf das Vorkommen von Salmonellen. Die Ergebnisse für die Tiere deutscher Herkunft sind in Tabelle 2.8 aufgeführt. Die Autoren konnten zudem große Schwankungen der *Salmonella*-Nachweisquote zwischen den verschiedenen Herkunftsbetrieben bei

einer herkunftsbezogenen Auswertung der Daten feststellen. Bei der Untersuchung aus beispielsweise den Jahren 1992/1993 stammten die Tiere aus 26 verschiedenen Herkunftsbetrieben. Je nach Betrieb (es wurde 7 Betriebe untersucht) schwankten die durchschnittlichen Nachweisraten zwischen 0% und 65,2% (Daten hier nicht gezeigt) (FEHLHABER et al. 1996).

Tabelle 2.8: *Salmonella*-Vorkommen bei tauglich beurteilten Schweinen in Deutschland (FEHLHABER et al. 1996)

Untersuchungs-jahr	Probenanzahl [n] insgesamt	Probenart	<i>Salmonella</i> -Nachweise [%]
1992/93	1.836	Fäzes	1,3
		Mesenterial-Lymphknoten	0,3
		Leber	0,2
1993/95	800	Muskeloberfläche	0,5
1995/96	120	Fäzes	0
		Mesenterial-Lymphknoten	1,7
		Leber	0,8
		Bauchhöhlentupfer	0
1996	900	Leber	0,9
		Bauchhöhlentupfer	0,4

GAREIS et al. führten 1996 eine Pilotstudie zu möglichen Eintrags- und Kontaminationsquellen von Salmonellen in der Produktionslinie von Schweinefleisch durch. Es wurden insgesamt 5093 Proben (Fäzes, Darmlymphknoten, Fleisch, Stuhlproben von Mitarbeitern und anderes Material) aus fünf verschiedenen Betrieben untersucht. Auch diese Autoren berichten von sehr unterschiedlichen *Salmonella*-Raten in den einzelnen Herkunftsbetrieben. So waren in einem der untersuchten Betriebe über 70% der Proben *Salmonella* positiv. Insgesamt konnten aus 6,98% der zur Untersuchung vorliegenden Fäzes-Proben und aus 2,98% der Lymphknoten Salmonellen nachgewiesen werden (GAREIS et al. 1996).

KAESBOHRER et al. (2000) untersuchten in einer epidemiologischen Studie Fäzes, Darmlymphknoten und Oberflächenproben von insgesamt 11.942 Schlacht-

schweinen auf *Salmonella*. Die Ergebnisse zeigen eine geschätzte durchschnittliche *Salmonella*-Prävalenz beim Schlachtschwein von 6,2%, mit vom Schlachthof abhängigen Schwankungen zwischen 1,9 und 12%. Aus 3,7% der Fäzes-Proben und 3,3% der Lymphknoten wurden Salmonellen nachgewiesen. Die Oberflächentupferproben waren zu 4,7% mit *Salmonella* kontaminiert (KAESBOHRER et al. 2000).

Im Rahmen des europäischen Projektes 'SALINPORK' wurden europaweit durch Universitäten und Untersuchungseinrichtungen Prävalenzdaten aus den unterschiedlichen Stufen der Schweinefleischproduktion erhoben und ausgewertet. An diesem Projekt waren Dänemark, Griechenland, Großbritannien, die Niederlande, Schweden und auch Deutschland beteiligt.

VON ALTROCK et al. (2000) haben für die deutsche Beteiligung an SALINPORK Daten aus serologischen Untersuchungen in Schleswig-Holstein ermittelt. In 2.947 Proben aus 60 Mastschweinherden wurde mit dem Dänischen Mix-ELISA eine *Salmonella*-Seroprävalenz von 7,3% nachgewiesen. 28,3% der Mastschweinherden waren *Salmonella*-positiv. Die Untersuchung von 797 Zuchtsauen aus 20 Zuchtbetrieben ergab eine *Salmonella*-Seroprävalenz von 9,2%. Bei den Zuchtsauenherden lag die *Salmonella*-Seroprävalenz bei 50%. In 20 Ferkelproduktionsbetrieben lag die Seroprävalenz der 399 untersuchten Sauen bei 4,5%. Die untersuchten Ferkelherden waren zu 15% serologisch *Salmonella*-positiv (VON ALTROCK et al. 2000, VON ALTROCK 2001). In einer weiteren Arbeit erfolgte die kulturelle Untersuchung von Oberflächentupferproben. Hierbei wurden bei 1% der Proben von den Tierkörperoberflächen Salmonellen nachgewiesen. Tupferproben von Lebern waren zu 2,7% *Salmonella*-positiv. Bei 5,3% der untersuchten Tupferproben von Zungen konnten ebenfalls Salmonellen nachgewiesen werden (VON ALTROCK et al. 1999).

Die Prävalenz von Salmonellen in Schweinen ist auch in weiteren Studien häufig Gegenstand der Untersuchung. Die Tabellen 2.9 bis 2.11 zeigen ausgewählte Daten zum weltweiten *Salmonella*-Vorkommen beim Schwein (Einzeltier-Untersuchungen) aus verschiedenen Ländern, jeweils zusammengestellt nach den gemeinsamen Probenmaterialien (Fäzes, Mesenterial-Lymphknoten) und diversen Probenahme-Lokalisationen. Daten zur *Salmonella*-Prävalenz in Herden sind, unabhängig vom Untersuchungsmaterial, in Tabelle 2.12 zusammengefasst.

Tabelle 2.9: Zusammenstellung von Daten zum *Salmonella*-Vorkommen in Fäzes beim Schwein (Einzeltiere)

Land	n	<i>Salmonella</i> - Nachweise [%]	Quelle
Großbritannien	300	1,3	MCCAUGHEY et al. 1973
Ungarn	200	48	JAYARAO et al. 1989
Indien	100	10	DAS et al. 1990
Dänemark	687	9,8	HOLST 1993
Deutschland	167	26,9	FEHLHABER et al. 1996
Deutschland	419	10,9	FEHLHABER et al. 1996
Dänemark	13.468	6,2	BAGGESEN et al. 1996
USA	2.288	24,6	DAVIES et al. 1997
Deutschland	1.187	5,05	ROTHENEDER et al. 1997
USA	595	36,3	HARVEY et al. 1999
USA	1.200	2,58	BARBER et al. 1999
Canada	1.420	5,2 (4,0-6,4)	LETELLIER et al. 1999
Griechenland	99	15,2	LIMPITAKIS et al. 1999
Großbritannien	300	22,0	DAVIES et al. 1999
	270	21,5	
	308	7,1	
	2.205	11,6	
Belgien	237	6,3	BOTTELDOORN et al. 2001
Großbritannien	2.509	23	DAVIES et al. 2001
Griechenland	340	1,2	LEONTIDES et al. 2001
Kanada	602	35	SORENSEN et al. 2001
Brasilien	300	18,3	BESSA et al. 2001
Korea (Republik)	699	5,3	JUNG et al. 2001
USA	97	1,0	HURD et al. 2002
	94	1,1	
	89	0	
	90	4,4	
	98	2,0	
	98	0	
USA	4.024	2,1	BARBER et al. 2002
Japan	267	17,6	ASAI et al. 2001
Frankreich	256	11,6	BELOEIL et al. 2003
Belgien	135	8,1	KORSAK et al. 2003
	378	2,9	

Tabelle 2.10: Zusammenstellung von Daten zum *Salmonella*-Vorkommen in *Mesenterial-Lymphknoten* beim Schwein (Einzeltiere)

Land	n	<i>Salmonella</i> -Nachweise [%]	Quelle
-	52 <sup>1</sup>	42,3	HORMAECHE und SALSAMENDI 1936
-	1000	3,8	SCOTT 1940
-	500	12	SMITH 1959
Großbritannien	300 <sup>2</sup>	6	MCCAUGHNEY et al. 1973
Trinidad, Tobago	869	18,4	CAZABON et al. 1978
Australien	90 <sup>3</sup>	17,8	MOO et al. 1980
Deutschland	167	1,8	FEHLHABER et al. 1996
Deutschland	419	7,2	FEHLHABER et al. 1996
Schweiz	572 <sup>4</sup>	0,9	OFFERMANN et al. 1998
USA	595	45,5	HARVEY et al. 1999
USA	3442	3,69	CARLSON und BLAHA 1999
Griechenland	121	20,7	LIMPITAKIS et al. 1999
USA	2442	2,8	WEIGEL et al. 1999
Brasilien	300	17,6	BESSA et al. 2001
Korea (Republik)	784	17,9	JUNG et al. 2001

<sup>1</sup> Pool von 1000 Tieren<sup>2</sup> ileo-caecal-Lymphknoten<sup>3</sup> je ein jejunaler und caecaler Lymphknoten bei 45 Tieren<sup>4</sup> in Kombination mit 572 TonsillenTabelle 2.11: Zusammenstellung von Daten zum *Salmonella*-Vorkommen in *diversen Probenahme-Lokalisationen* beim Schwein (Einzeltiere)

Land	Proben-Material	n	<i>Salmonella</i> Nachweise [%]	Quelle
USA	Oberflächen-Tupfer und Abklatsch, Schinken nahe Anus <sup>1</sup>	221	T: 23,3 A: 17,9	CARPENTER et al. 1973
USA	Galle	500	0	HARTWIG und JONES 1976
Deutschland	Leber	167	1,2	FEHLHABER et al. 1996
Deutschland	Leber	419	15,5	FEHLHABER et al. 1996
	Bauchhöhlentupfer	419	2,1	
Großbritannien	Rektalabstrich	2.509	5,3	DAVIES et al. 2001
Schweden	Leber	12	0	THORBERG und ENGVALL 2001
	Lunge	12	0	
Niederlande	Tonsillen	1114	19,6	SWANENBURG et al. 2001
Italien	Tonsillen	150	5,3	BONARDI et al. 2003

<sup>1</sup> nach Kühlung

Tabelle 2.12: Zusammenstellung von Daten zum *Salmonella*-Vorkommen in Schweineherden

Land	Probenmaterial	Probenumfang	<i>Salmonella</i> Nachweise [%]	Quelle
Dänemark	Fäzes	687; je 1,5 pro Herde	11,8	HOLST 1993
Dänemark	Fäzes	1363	22,2	BAGGESEN et al. 1996
USA	Fäzes	29	83	DAVIES et al. 1997
Schweiz	Mesenterial-Lymphknoten	570 Proben aus 114 Herden	3,5	OFFERMANN et al. 1998
Kanada	Fäzes	223	26,2	LETELLIER et al. 1999
Niederlande	Fäzes	7608 317 von 1500 Herden	23 der Herden	VAN DER WOLF et al. 1999
Niederlande	Fäzes	1.580; 79 Herden	10,1 der Herden	STEGE et al. 2000
Schweiz	Fäzes	17	5,8	REGULA et al. 2001
Dänemark	Fäzes	366 Herden 205 Herden 1962 Herden	11,4 16,7 11,7	CHRISTENSEN et al. 2002
Irland	Fäzes	59	51	ROWE et al. 2003

### 2.3.2 Salmonellen auf Oberflächen in der Fleischgewinnung beim Schwein

Mit fortschreitender Bearbeitung im Fleischgewinnungsprozess steigt das Ausmaß der Kontakte zwischen Tierkörperoberfläche und den Oberflächen der verwendeten Geräte. Mit den Tieren in den Schlachtprozess eingetragene (pathogene und nicht pathogene) Mikroorganismen können so auf die Oberflächen der Geräte gelangen. Dieses Auftreten von Salmonellen auf Geräteoberflächen<sup>2</sup> der Fleischgewinnungslinie ist in der Literatur vielfältig belegt.

KAMPELMACHER et al. (1961) untersuchten in einer Fleischgewinnungslinie beim Schwein 502 Messer, die bei der Fleischuntersuchung zum Anschneiden der

<sup>2</sup> Unter dem Begriff Geräteoberflächen werden hier alle Oberflächen verstanden, die bei der Fleischgewinnung mit dem Tierkörper in Berührung kommen. Demnach sind auch Handflächen bzw. die Handschuhe der Schlachthofmitarbeiter mit eingeschlossen.

Lymphknoten verwendet wurden. Auf 25 Messern (5%) konnten Salmonellen verschiedener Serovaren nachgewiesen werden.

DE WIT und KAMPELMACHER untersuchten 1981 bei 20 Mitarbeitern einer Fleischgewinnungslinie für Schweine die Handflächen auf das Vorhandensein von Salmonellen und anderen (pathogenen) Mikroorganismen. *Salmonella* konnte auf 30% der Handflächen nachgewiesen werden. Die Anzahl der Salmonellen war meist auf beiden Handflächen gleich hoch. Bei einer weiteren Untersuchung im Jahr 1982 gelang denselben Autoren wiederholt der Nachweis von Salmonellen auf Handflächen von (Schweine-) Schlachthof-Mitarbeitern. Die untersuchten Handflächen waren zu 36% mit Salmonellen kontaminiert (DE WIT und KAMPELMACHER 1982).

Oberflächenproben von u.a. Handflächen und Schürzen der Mitarbeiter eines Schlachthofes waren Gegenstand der Untersuchungen von NORTJE et al. (1991). Salmonellen wurden nicht nachgewiesen.

VAN DER PALEN et al. (1992) untersuchten zwei Poliermaschinen in Fleischgewinnungslinien beim Schwein. Bei einer der Maschinen waren 50% der Proben *Salmonella*-positiv, bei der anderen konnte bei 10% der Proben *Salmonella* nachgewiesen werden.

Im Rahmen einer Pilotstudie zum Eintrag von Salmonellen in die Fleischgewinnungslinie beim Schwein untersuchten GAREIS et al. (1996) die Einweghandschuhe von Schlachthofmitarbeitern in fünf verschiedenen Betrieben. In 10,6% der etwa 270 (eine exakte Angabe erfolgte nicht) Proben konnten Salmonellen nachgewiesen werden.

Die Wand seitlich des Eingangs einer Entborstungsanlage war Gegenstand der Untersuchungen von VON ALTROCK et al. (1999). Die Autoren konnten bei einer der 90 Proben Salmonellen auf der Oberfläche nachweisen.

Bei 90 untersuchten Sägeblättern konnten VON ALTROCK et al. (1999) aus 6,7% der Proben Salmonellen isolieren.

Dieselben Autoren untersuchten bei 150 Proben das Vorkommen von *Salmonella* auf den Handflächen der Arbeiter an den Positionen Afterausschnitt, Eviszeration,



Entfernung der Tonsillen und Fleischuntersuchung. Lediglich in einem Fall (0,7%), bei der Entfernung der Tonsillen, wurden Salmonellen nachgewiesen.

Im Rahmen des Projektes SALINPORK wurden 12 Schlachthöfe in fünf Mitgliedstaaten der EU untersucht (HALD et al. 1999). Gegenstände der Untersuchungen waren jeweils die Beprobung der Tierkörper und Organe sowie Umfeldproben (Abwasser, Brühtank, Tupferproben von Gerätschaften, Handflächen der Mitarbeiter). In fünf der untersuchten Schlachthöfe wurden keine Salmonellen nachgewiesen. In den sieben übrigen Schlachthöfen lag die durchschnittliche Belastung der Umfeldproben (n=3235) bei 11,7% (6,3 - 25,9%). Eine eindeutige Darstellung der Salmonellen-Belastung einzelner Probenmaterialien ist der Veröffentlichung nicht zu entnehmen. In zwei Schlachthöfen konnte das Vorhandensein einer Hausflora aufgezeigt werden. In einem Schlachthof wurde *Salmonella* Ohio eindeutig mit der Entborstungsanlage assoziiert. *Salmonella* Infantis als „Haus-Stamm“ wurde in einem anderen Schlachthof von der Säge bei der Tierkörperspaltung isoliert.

LIMPITAKIS et al. (1999) untersuchten die durchschnittliche Salmonellen-Belastung der in der Fleischgewinnungslinie (Schwein) verwendeten Messer. Vor Beginn des Schlachtprozesses wurden auf 3,6% (n=111) und nach Beendigung der Schicht bei 2,8% (n=176) der Messer Salmonellen nachgewiesen. Die Autoren weisen jedoch darauf hin, dass mit fünf positiven *Salmonella*-Nachweisen nach Schichtende im Vergleich zu vier positiven Nachweisen vor Schlachtbeginn die absolute Zahl der Nachweise zum Ende des Arbeitstages erhöht war. *Salmonella*-positive Messerproben häuften sich in den wärmeren Monaten von Mai bis Oktober.

Die Salmonellen-Belastung auf den Handflächen der Schlachthofmitarbeiter war ebenfalls Gegenstand der Untersuchungen von LIMPITAKIS et al. (1999). Die Autoren zeigen, dass bereits vor Schlachtbeginn bei 111 untersuchten Handflächen 2,7% der Proben mit *Salmonella* verunreinigt waren. Mit 12 von 176 Proben waren nach Schichtende 6,8% der beprobten Handflächen mit *Salmonella* kontaminiert. Auch für die Handflächen war eine Häufung positiver Salmonellen-Nachweise in den warmen Sommermonaten zu verzeichnen. Die Autoren nehmen an, dass Salmonellen, die vor der Schlachtung nachweisbar waren, beim Anziehen

offensichtlich ungenügend gereinigter Schuhe auf die Handflächen gelangt sind (LIMPITAKIS et al. 1999).

RHEAULT und QUESSY (1999) untersuchten diverse Umfeldproben in zwei Schlachthöfen vor (n=90) und während (n=454) des Schlachtverlaufes. Insgesamt lag die Salmonellenbelastung während der Schlachtung bei 4,0% (2,6 - 6,2%). Die untersuchten Schürzen waren zu 10,2% (vier von 39 Proben) mit Salmonellen verunreinigt. Auf vier von 79 Handschuhen (5,1%) wurden ebenso Salmonellen nachgewiesen wie auf fünf von 33 Tablett (15,2%). Proben von Abfluss, Boden, Schaufeln und Innereischalen waren ebenfalls mit Salmonellen kontaminiert. Von anderen Probenahmepositionen, wie beispielsweise Messern, Haken, Sägeblättern oder anderen Arbeitsflächen konnten keine Salmonellen isoliert werden.

In zwei Fallstudien aus Schlachthöfen in Dänemark zeigten SOERENSEN et al. (1999), dass Bandsäge sowie Entborstungsanlage und Poliermaschine als Quelle für eine kontinuierliche Kontamination des Schweinefleisches mit *Salmonella* Infantis ausgemacht werden konnten.

SWANENBURG et al. (2001) untersuchten in zwei Schlachthöfen neben Tierkörpern und Organproben insgesamt 477 Umfeldproben auf das Vorhandensein von Salmonellen. Von den untersuchten Proben bei der Tierkörperspaltung waren 22% mit Salmonellen kontaminiert. Auf 2% der Proben von den Poliermaschinen waren ebenso Salmonellen nachweisbar wie auf 5% der untersuchten Hände.

Von THORBERG und ENGVALL (2001) wurden in einer Fleischgewinnungslinie für Schwein die Poliermaschine (n=149), die Spaltsäge (n=145) sowie die Hände beim Lösen des Rectums (n=117), Eviszeration (n=114), Entfernung des Geschlinges (n=115) sowie bei der Fleischuntersuchung (n=111) untersucht. An keiner der genannten Positionen konnten Salmonellen nachgewiesen werden.

## 2.4 Typisierungsverfahren für *Salmonella* spp.

Als Typisierungsverfahren werden Untersuchungsverfahren bezeichnet, die Bakterien über die Spezies-Ebene hinaus differenzieren können (OLSEN et al. 1993; LIEBISCH und SCHWARZ 1996).

Voraussetzung bildet die Annahme, dass epidemiologisch verwandte Isolate einen identischen klonalen Ursprung haben und somit über Merkmale verfügen, die epidemiologisch nicht verwandte Stämme nicht aufweisen (MASLOW et al. 1993; AMMON et al. 2001).

Bei Salmonellen, wie auch bei anderen pathogenen Mikroorganismen, ist eine zweifelsfreie und eindeutige Identifizierung des Erregers nicht nur für die Wahl der adäquaten Behandlung unerlässlich, sondern insbesondere für epidemiologische Betrachtungen eine wichtige Grundlage.

Wesentliche Kriterien für die Wahl eines geeigneten Typisierungsverfahrens sind die Typisierbarkeit der zu untersuchenden Mikroorganismen mit der gewählten Methode, die Reproduzierbarkeit der Methode sowie deren Diskriminierungsfähigkeit (HUNTER 1990; OLSEN et al. 1993; LIEBISCH und SCHWARZ 1996; STRUELENS 1998; AMMON et al. 2001).

Als *Typisierbarkeit* beschreibt das ROBERT-KOCH-INSTITUT (2001) die „Fähigkeit eines Systems, eindeutige Ergebnisse für jedes Isolat zu erbringen“. Ist ein Mikroorganismus mit einer Untersuchungsmethode typisierbar, so ist ein klares, positives Resultat zu erwarten. Bei nicht typisierbaren Stämmen erhält man kein bzw. kein interpretierbares Ergebnis (OLSEN et al. 1993; SIEGRIST et al. 1995; STRUELENS 1998; AMMON et al. 2001).

Unter *Reproduzierbarkeit* versteht man, dass es bei der Wiederholung der Untersuchung eines Isolates mit der zu beurteilenden Methode zu exakt gleichen Resultaten kommt (AMMON et al. 2001; STRUELENS 1998). Diese Leistungsfähigkeit einer Methode kann von der *in vivo*- und *in vitro*-Stabilität bakterieller Merkmale beeinflusst werden (OLSEN et al. 1993; SIEGRIST et al. 1995; OLIVE und BEAN 1999).

Im Kontext der Reproduzierbarkeit ist auch die Standardisierbarkeit als Auswahlkriterium für eine Untersuchungsmethode zu nennen (SIEGRIST et al. 1995).

Die *Diskriminierungsfähigkeit* (auch: *Diskriminationsfähigkeit* oder *diskriminatorische Fähigkeit*) bezeichnet die Fähigkeit einer Methode, nicht verwandte

Mikroorganismen-Stämme als solche voneinander abgrenzen zu können (STRUELENS 1998; HUNTER und GASTON 1998; AMMON et al. 2001).

Die *Diskriminierungsfähigkeit* wird, zurückgehend auf den „SIMPSON'S-Index of Diversity“, mit dem D-Index beziffert, der ausdrückt, mit welcher Wahrscheinlichkeit zwei zufällig aus einer Spezies-Population ausgewählte und nicht verwandte Isolate durch eine Untersuchungsmethode unterschiedlichen Stämmen zugeordnet werden (HUNTER und GASTON 1998). Der D-Index wird ausgedrückt als eine Zahl zwischen 0 und 1, wobei eine 100%ige Diskriminierungsfähigkeit dem Wert 1 entspricht und eine völlig fehlende Diskriminierungsfähigkeit dem Wert 0. Der D-Index als Maß für die Diskriminierungsfähigkeit kann sowohl für einzelne Typisierungsmethoden eingesetzt werden als auch für die Bewertung des kombinierten Einsatzes mehrerer Methoden (HUNTER 1990; HUNTER und GASTON 1998).

Weitere Kriterien für die Auswahl einer Typisierungsmethode sind Wirtschaftlichkeit (Zeit-, Personal- und Kostenaufwand) sowie die Anwendbarkeit bei möglichst vielen Mikroorganismen (SIEGRIST et al. 1995; STRUELENS 1998; AMMON et al. 2001). Diese Eigenschaften gehen nicht zwingend mit der Aussagekraft einer Untersuchungsmethode einher.

Grundsätzlich unterscheidet man bei der Untersuchung von Salmonellen zwei übergeordnete Kategorien von Typisierungsverfahren. Bei phänotypischen Untersuchungen werden die von den Bakterien exprimierten Eigenschaften (z.B. morphologische oder biochemische) erfasst. Genotypische Untersuchungsmethoden stellen die Eigenschaften der chromosomalen und extrachromosomalen DNA dar. Hierbei wird auf molekularbiologische Typisierungsverfahren zurückgegriffen (SIEGRIST et al. 1995; LIEBISCH und SCHWARZ 1996).

Zur Typisierung von Salmonellen verwendete molekularbiologische (genotypische) Methoden werden im wissenschaftlichen Schrifttum in einer Reihe von Übersichtsreferaten und Reviews eingehend erläutert und gegeneinander abgewogen (THRELFALL und FROST 1990; OLSEN et al. 1993; LIEBEISCH und SCHWARZ 1996; OLIVE und BEAN 1999; LIEBANA 2002).

THRELFALL und FROST (1990) widmen sich beispielsweise der (vorwiegend genotypischen) Charakterisierung von Salmonellen unter labortechnischen Aspekten und Aspekten der Anwendbarkeit bei epidemiologischen Fragestellungen. Neben den in Kapitel 2.4.1 dieser Arbeit genannten phänotypischen Methoden wurden dort

unter den Oberbegriffen Plasmid-Profilanalyse, Plasmid-Fingerprinting sowie chromosomales Fingerprinting genotypische Untersuchungsmethoden für Salmonellen behandelt.

Auch OLSEN et. al. (1993) stellen eine Reihe von phänotypischen und genotypischen Typisierungsmethoden vor und diskutierten deren Anwendbarkeit bei der Untersuchung von Salmonellen. Die hier genannten genotypischen Verfahren werden zusammengefasst in den Kategorien Plasmidprofilanalyse, Erfassung und Schnitt des gesamten Genoms (z.B. RAPD<sup>3</sup>, RFLP<sup>4</sup>, PFGE<sup>5</sup>) sowie Typisierungsverfahren, die auf der Anwendung der PCR<sup>6</sup> basieren.

Eine Reihe von genotypischen Untersuchungsmethoden wird auch von LIEBISCH und SCHWARZ (1996) in einem Übersichtsreferat vorgestellt. Hinsichtlich der Anwendbarkeit bei der Typisierung von Salmonellen werden die Plasmidanalyse, Gensondenhybridisierungstechniken wie Ribotyping und IS200<sup>7</sup>-Typing sowie die Makrorestriktionsanalyse ausführlich erläutert und diskutiert.

OLIVE und BEAN haben im Jahr 1999 Prinzipien und Anwendung von DNA-basierten Typisierungsmethoden für Mikroorganismen ausführlich erläutert. Neben der PFGE werden das Southern-Blotting und RFLP-Methoden, PCR-basierende lokusspezifische Verfahren (RFLP) sowie RAPD, Rep PCR<sup>8</sup>, CFLP<sup>9</sup>, AFLP<sup>10</sup> und die DNA-Sequenzierung näher beleuchtet.

Bei LIEBANA (2002) wird grundsätzlich unterschieden zwischen molekularen Methoden, der Plasmidanalyse und chromosomalen Fingerprintingmethoden, die a) Längenpolymorphismen der DNA untersuchen (z.B. RFLP, die Makrorestriktionsanalyse oder Hybridisierungstechniken wie IS200 und Ribotypisierung) oder b) PCR-basierend das ganze Genom untersuchen (z.B. PCR-RFLP, RAPD, ERIC<sup>11</sup> oder AFLP).

Der Einsatz einzelner Methoden richtet sich nach unterschiedlichen Fragestellungen. Die Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) als eine mögliche und im Rahmen dieser

---

<sup>3</sup> RAPD = Random Amplified Polymorphic DNA oder Random Amplification of Polymorphic DNA

<sup>4</sup> RFLP = Restriction Fragment Length Polymorphism

<sup>5</sup> PFGE = Pulsfeld-Gelelektrophorese

<sup>6</sup> PCR = Polymerase Chain Reaction, Polymerase-Kettenreaktion

<sup>7</sup> IS = Insertionssequenz

<sup>8</sup> Rep-PCR = Repetitive PCR

<sup>9</sup> CFLP = Cleavase Fragment Length Polymorphism

<sup>10</sup> AFLP = Amplified Fragment Length Polymorphism

<sup>11</sup> ERIC = Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus

Arbeit verwendete Methode zur Identifizierung und Differenzierung von Salmonellen wird in Kapitel 2.4.2 ausführlich dargestellt.

#### **2.4.1 Phänotypische Methoden zur Identifizierung und Differenzierung von Salmonellen**

Zur Identifizierung und Differenzierung von Mikroorganismen werden traditionell phänotypische Untersuchungsmethoden eingesetzt. Ursprünglich in Ermangelung bzw. Unkenntnis genotypischer Alternativen angewandt, spielen diese Typisierungsmethoden bis heute eine wichtige Rolle bei der Charakterisierung von Mikroorganismen (OLSEN et al. 1993; SIEGRIST et al. 1995).

##### *Biotypisierung (Biotyping)*

Nach THRELFALL und FROST (1990) geht das Biotyping von *Salmonella* Typhimurium auf eine Arbeit von KRISTENSEN et al. aus dem Jahr 1937 zurück. Hier war nach einem festgelegten Schema die Fermentationsfähigkeit der Salmonellen bei neun Substraten bestimmt worden.

Zur Charakterisierung der Bakterien auf Genus- und auf Spezies-Ebene werden die zu untersuchenden Stämme einer Reihe von biochemischen Tests unterzogen (WICHELHAUS et al. 2000; SIEGRIST et al. 1995). Hierbei wird geprüft, ob die Mikroorganismen über bestimmte Fähigkeiten, z.B. Spaltung oder Abbau ausgewählter Substrate, verfügen oder nicht (OLSEN et al. 1993). Bei der Auswahl und Kombination der Tests werden solche Reaktionen herangezogen, in denen Mikroorganismen sich möglichst typisch und vor allem eindeutig verhalten. Im Idealfall zeigen also alle Stämme einer Spezies (100%) in einer biochemischen Reaktion ein identisches Verhalten (OLSEN et al. 1993).

##### *Serotypisierung*

OLSEN et al. (1993) bezeichnen die Serotypisierung von Salmonellen als grundlegendes und für Salmonellen wichtigstes phänotypisches Untersuchungsverfahren. Bei Salmonellen erfolgt eine serologische Typisierung in der Regel, wenn sich die Mikroorganismen als *Salmonella*-verdächtig erwiesen haben (polyvalent) oder zur weiteren Charakterisierung unterhalb der Spezies-Ebene.

Das grundlegende Prinzip der serologischen Differenzierung ist die makroskopisch durch Verklumpung (Agglutination) erkennbare Reaktion von Antigenen, die auf den Mikroorganismen vorhanden sind, mit spezifischen Antikörpern (SIEGRIST et al. 1995). Die Untersuchung wird bei Salmonellen durch Objektträger-Agglutination (Ausfällen des Antigen-Antikörper-Komplexes) durchgeführt. Bei Abwesenheit der gesuchten Antigene bleibt die Reaktion aus. Als für die Serotypisierung geeignet gelten neben *Salmonella* auch *L. pneumophila* oder *Ps. aeruginosa* (AMMON et al. 2001).

Salmonellen verfügen sowohl über Oberflächen-Antigene (O-Antigene) als auch über Geißel-Antigene (H-Antigene) und Hüllen-Antigene (Vi-Antigene), deren Kombination für einzelne Serovaren spezifisch ist (LE MINOR 1984). Grundlage und Hilfestellung bei der Auswahl und Reihenfolge der eingesetzten Antiseren bietet für die Salmonellen das Kauffmann-White-Schema (siehe Kapitel 2.1), über dessen Anwendung bei der Serotypisierung international Konsens herrscht. Dieses Schema wurde nach THRELFALL und FROST (1990) im Jahre 1926 von WHITE geschaffen und von KAUFFMANN (1972, 1978) weiter ausgearbeitet.

*Salmonella*-Antigene können auch Phagen-codiert sein und somit weniger stabil. Nach THRELFALL und FROST (1990) kann die Serotypisierung von Salmonellen als alleinige phänotypische Untersuchungsmethode bei epidemiologischen Fragestellungen dann ausreichen, wenn es sich um außergewöhnliche Serovaren handelt.

### *Phagentypisierung*

Die Phagentypisierung (auch: *Lysotypie*) kommt vor dem Hintergrund epidemiologischer Fragestellungen häufig, insbesondere bei *Salmonella* Enteritidis und *Salmonella* Typhimurium, zum Einsatz (OLSEN et al. 1993).

Bei der Phagentypisierung wird die Eigenschaft von Bakterienviren (Phagen) genutzt, um spezifisch bestimmte Stämme einer Bakterienspezies zu infizieren und zu lysieren. Bakterienstämme, die empfänglich sind für die Infektion mit gleichen Phagen, werden gleichen Phagentypen zugeordnet (OLSEN et al. 1993). Der Einsatz einer Vielzahl verschiedener Phagen ermöglicht die Darstellung charakteristischer Lysismuster, die zur Auswertung herangezogen werden (OLSEN et al. 1993; WICHELHAUS et al. 2000).

Die erste Phagentypisierung von *Salmonella* Typhimurium geht nach SCHMIEGER (1999) zurück auf das Jahr 1943 (FELIX und CALLOW 1943) und wurde in der Folge

weitergeführt (SCHMIEGER 1999). Im Laufe der Zeit sind spezielle Phagen-Sätze für die einzelnen Bakterienspezies entwickelt worden. So wird die Phagentypisierung von *Salmonella* Typhimurium in der Regel nach einem Protokoll von Anderson vorgenommen (ANDERSON et al. 1977; SCHMIEGER 1999; ANG-KUCÜKER et al. 2000; RAHMAN 2002; DORN et al. 2004). Für die Lysotypie von *Salmonella* Enteritidis hat sich die Vorgehensweise nach einer Grundlagenarbeit von WARD etabliert (WARD et al. 1987; HICKMAN-BRENNER 1991; ANG-KUCÜKER et al. 2000; DORN et al. 2004). Sowohl für *Salmonella* Typhimurium als auch für *Salmonella* Enteritidis existieren andere Typisierungsschemata, wie beispielsweise das von LASZLO et al. (1993), die jedoch selten angewendet werden.

Auch für andere *Salmonella*-Serovaren wurden Phagentypisierungs-Schemata erfolgreich etabliert bzw. angewendet, z.B. für *Salmonella* Heidelberg (IBRAHIM 1969; DEMCZUK et al. 2003), *Salmonella* Hadar (VALDEZATE et al. 2000 nach de SA et al. 1980) *Salmonella* Infantis (LASZLO et al. 1993), *Salmonella* Paratyphi B (LALKO 1965), *Salmonella* Virchow (CHAMBERS et al 1987 in THRELFALL et. al 1990) oder *Salmonella* Virchow, *Salmonella* Manhattan, *Salmonella* Thompson, *Salmonella* Oranienburg sowie *Salmonella* Bareilly (LASZLO und CSORIAN 1988). Nach DORN et al. (2004) ermöglicht die Phagentypisierung eine Differenzierung innerhalb von Serovaren und dient somit der Aufklärung von Infektketten und epidemiologischen Zusammenhängen.

### *Resistenzbestimmung*

Mit der Resistenzbestimmung wird das Wachstumsverhalten von Mikroorganismen auf einem festen Nährmedium in Anwesenheit verschiedener Antibiotika, die in das Medium diffundiert sind, ermittelt (SIEGRIST et al. 1995).

Seit 2000 wird im Nationalen veterinärmedizinischen Referenzlabor für Salmonellen parallel zu dieser Agardiffusionsmethode die Mikrodilutionsmethode durchgeführt, bei der die **Minimale Hemmstoff-Konzentration (MHK)** des Isolats ermittelt wird (HELMUTH et al. 2004). Die dabei üblicherweise verwendeten antimikrobiellen Substanzen sind in Tabelle 2.13 aufgeführt.



Tabelle 2.13: Im Nationalen veterinärmedizinischen Referenzlaboratorium für Salmonellen getestete antimikrobiell wirksame Substanzen (HELMUTH et al. 2004)

Substanz	Abkürzungen	Break Point [µg/ml]	Getestete Konzentrationen [µg/ml]
Ampicillin	AMP	32	2 - 32
Amoxicillin/ Clavulansäure	AUG2	32	2/1 –32/16
Ceftiofur	XLN	8	0,5 - 8
Chloramphenicol	CHL	32	2 - 64
Florfenicol	FFN	32	2 - 64
Ciprofloxacin	CIP	2	0,03 - 4
Nalidixinsäure	NAL	32	4 - 128
Colistin	COL	16	4 - 64
Gentamicin	GEN	16	1 - 32
Kanamycin	KAN	64	4 - 64
Neomycin	NEO	16	2 - 32
Spectinomycin	SPE	128	4 - 128
Streptomycin	STR	32	4 - 64
Sulfmethoxazol	SMX	512	32 - 512
Sulfmethoxazol/ Trimethoprim	SXT	4	19/1 – 152/8
Trimethoprim	TMP	16	4 - 32
Tetracyclin	TET	16	2 - 32

Bei der epidemiologischen Untersuchung von Salmonellen kommt die Resistenzbestimmung häufig zum Einsatz. Obwohl die Diskriminationsfähigkeit der Methode gering ist, reichen laut ROBERT-KOCH-INSTITUT (2001) die Ergebnisse dieser leicht durchzuführenden Untersuchung im Kontext einer Ausbruchssituation für erste Falldefinitionen aus.

Antibiotika-Resistenzen sind in der Regel Plasmid-codiert, so können die Ergebnisse der Resistenzbestimmung und der Phagentypisierung durchaus miteinander verbunden sein (SIEGRIST et al. 1995; ANG-KUCÜKER 2000). Eine Ausnahme bildet die vermehrt auftretende Pentaresistenz (gegenüber Ampicillin, Chloramphenicol, Streptomycin, Sulfonamiden und Tetracyclin) von *Salmonella* Typhimurium DT104, die auf zwei Integrons chromosomal codiert wird (DORN et al. 2004).

Erwerb und Verlust von R-Plasmiden sind meist Folge eines selektiven Drucks aus der Umwelt (THRELFALL und FROST 1990). Die Zahl von Berichten über resistente bzw. multiresistente Mikroorganismen verleiht der Resistenzbestimmung zusätzliche

Bedeutung, die über die rein epidemiologische Fragestellung hinausweist. Im Falle schwerer Infektionen (z.B. *Salmonella*-Bakteriämie) kann die Kenntnis der Resistenzeigenschaften eines mikrobiellen Erregers für den Menschen lebenserhaltend sein (WHITE et al. 2001).

## **2.4.2 Pulsfeld-Gelelektrophorese als eine genotypische Methode zur Identifizierung und Differenzierung von Salmonellen**

### **2.4.2.1 Grundlegendes Prinzip**

Unter der Bezeichnung Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) wird eine Reihe von Arbeitsschritten zusammengefasst. Zunächst wird das gesamte Genom durch Zell-Lysis freigelegt und in Agarose eingebettet. Danach erfolgt die Inkubation mit Makrorestriktionsenzymen. Die entstandenen DNA-Teilstücke werden im Anschluss in einer (Pulsfeld-) Gelelektrophorese aufgetrennt und z.B. durch Färbung dargestellt. Abbildung 2.3 zeigt schematisch den Ablauf einer Pulsfeld-Gelelektrophorese.

Die mit Beginn der achtziger Jahre des letzten Jahrhunderts von SCHWARTZ et al. (1983) etablierte Methode stellte einen bedeutenden Fortschritt in der molekularbiologischen Forschung dar. Konnten bis dahin in einer Elektrophorese DNA-Fragmente bis zu 50 kbp (Kilobasenpaaren) dargestellt werden, so war man mit der PFGE erstmalig routinemäßig in der Lage, DNA-Fragmente bis zu 6000 kbp voneinander zu trennen (LAI 1989; GARDINER 1991).

Im Rahmen einer Makrorestriktionsanalyse wird zunächst die DNA mit sogenannten "selten schneidenden" Endonukleasen inkubiert, so dass aus der Gesamt-DNA 15 - 60 kbp große Fragmente entstehen (LIEBISCH und SCHWARZ 1996). Voraussetzung für die Unversehrtheit dieser großen DNA-Stücke ist, dass die zu untersuchenden Zellen bereits vor ihrer Lyse in Agarose eingebettet wurden. Diese von SCHWARTZ und CANTOR (1984) eingeführte Vorgehensweise schützt den Nukleinsäurestrang vor Scherkräften, die zu einer Stückelung der DNA führen würden, die nicht auf das Einwirken von Enzymen zurückzuführen ist.

Die Darstellung der durch die Enzymeinwirkung entstehenden Fragmente erfolgt in der Pulsfeld-Gelelektrophorese, die sich durch eine besondere Gestaltung des

anzulegenden elektrischen Feldes auszeichnet und dadurch von der konventionellen Elektrophorese abgegrenzt werden kann.

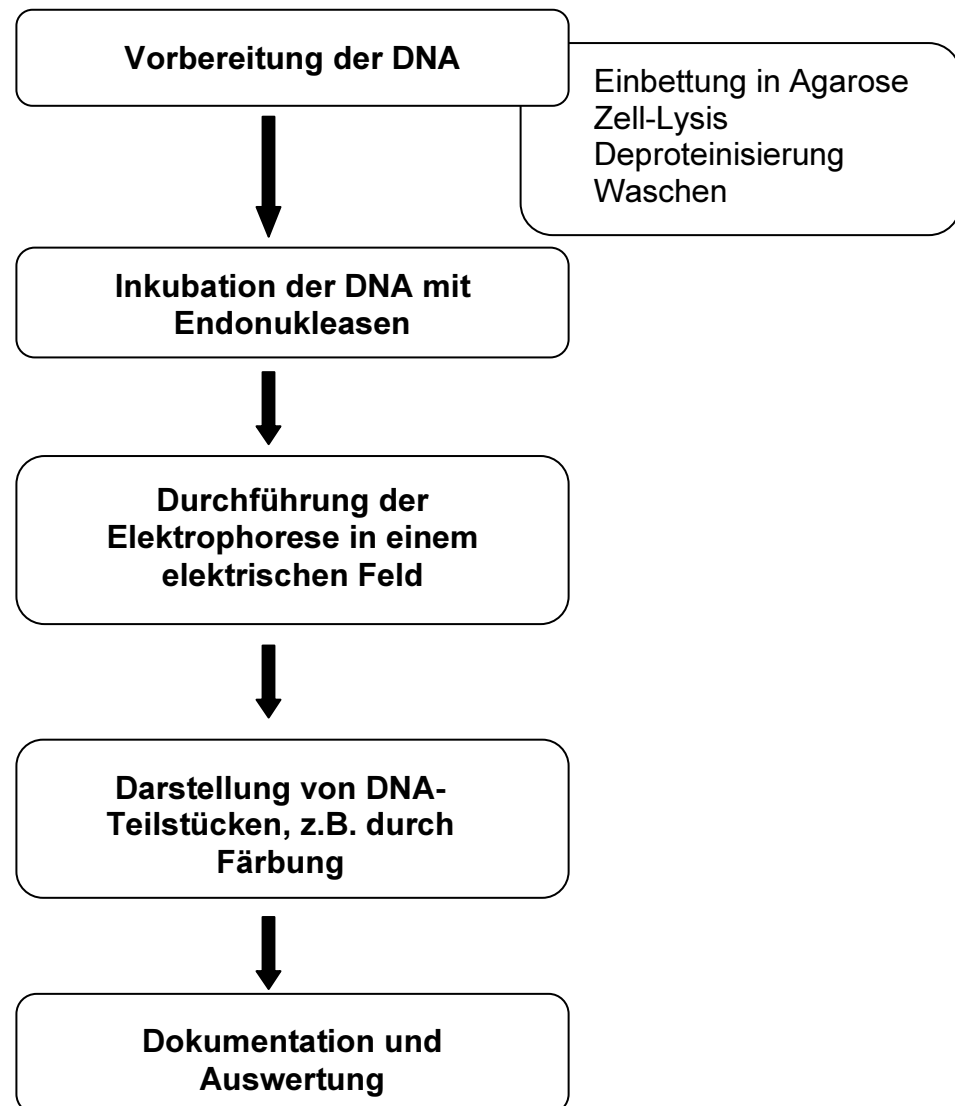


Abbildung 2.3: Ablaufdiagramm (Schema) einer Pulsfeld-Gelelektrophorese

Bei der PFGE werden die DNA-Stücke einem elektrischen Feld ausgesetzt, welches regelmäßig seine Fließrichtung durch das Gel verändert. Den Zeitraum der Fließrichtung in eine Richtung nennt man Puls bzw. Pulszeit, wovon sich auch der Name dieser Elektrophoreseform ableitet.

Die DNA (bzw. ein Teilstück nach Enzymbehandlung), die aufgrund von Phosphatgruppen im Rückgrat des Moleküls negativ geladen ist (KNIPPERS 2001; GARDINER 1991), wandert ihrer Ladung entsprechend durch dieses elektrische Feld, also vom Minuspol zum Pluspol. Das Molekül richtet sich parallel zum elektrischen Feld aus und wandert in schlangenartigen Bewegungen ("reptation") voran (GARDINER 1991; MARTIN 1996).

Ändert sich die Fließrichtung des elektrischen Feldes, muss sich das wandernde Molekül reorientieren und der neuen Fließrichtung anpassen. Kleinen Molekülen gelingt dies rasch, so dass ein weiteres Wandern durch das Gel kaum verzögert wird. Große Moleküle brauchen mehr Zeit zur Reorientierung, so dass weniger Zeit zum Wandern innerhalb des neuen Pulses zur Verfügung steht. Große DNA-Fragmente wandern demnach in einem elektrischen Pulsfeld mit alternierenden Fließrichtungen des elektrischen Stroms deutlich langsamer als kleine Moleküle.

Die Grundidee des alternierenden elektrischen Feldes wurde in verschiedenen Elektrodenmodellen umgesetzt. Für die unterschiedlichen Anordnungen der Elektroden sind systemspezifisch unterschiedliche Elektrophoresekammern sowie zusätzliche Apparaturen erforderlich (MARTIN 1996). Häufig wird das CHEF-System (**C**ontour-clamped **h**omogenous **e**lectric **f**ield) verwendet, das auch in international vereinheitlichten PFGE-Protokollen enthalten ist. Auch die Anordnung des rotierenden Gels kommt häufig zur Anwendung, insbesondere, wenn die Laborgegebenheiten es erfordern, um eine Veränderung des Pulswinkels vornehmen zu können (z.B. zur Untersuchung unterschiedlicher Spezies nach unterschiedlichen Protokollen).

Bei der Aufbereitung der DNA ist das Einwirken von Scherkräften unbedingt zu vermeiden, um zu gewährleisten, dass die in der Elektrophorese dargestellten DNA-Fragmente ausschließlich durch die Einwirkung von Endonukleasen entstanden sind (GARDINER 1991). Dem wird im Ablaufprotokoll in der Regel durch ein frühzeitiges Einbetten der DNA in Agarose Rechnung getragen.

Die Konzentration der DNA in Versuchsansätzen zur PFGE liegt mit 1-2 µg/Ansatz deutlich unter der Konzentration bei nicht gepulsten Elektrophoresen. So wird eine reibungslose Migration der großen Nukleinsäurestränge durch das Gel gewährleistet.

#### 2.4.2.2 Auswahl der Endonukleasen

Von zentraler Bedeutung für das Gelingen und die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse der Makrorestriktionsanalyse mit anschließender PFGE ist die Auswahl der Endonukleasen, die auf das zu untersuchende Genom einwirken.

Die bei der PFGE eingesetzten Enzyme sind so genannte selten schneidende Enzyme ("rare cutter"). Die Enzyme schneiden an spezifischen, selten auftretenden Erkennungssequenzen das gesamte zu untersuchende Genom in durchschnittlich 8 – 20 Teilstücke (MAURER 2000). Es handelt sich um Endonukleasen. Diese werden in der Literatur auch als Makrorestriktions-Endonukleasen oder Makrorestriktions-Enzyme bezeichnet.

TENOVER et al. (1995) geben eine Literaturübersicht über die Enzyme, die für verschiedene Organismen (z.B. Clostridien, Staphylokokken, Acinetobacter, Campylobacter, Pseudomonaden oder Salmonellen) bei der PFGE eingesetzt werden. Dazu zählen SmaI, SacII, CspI, ApaI, NotI, XbaI, SpeI, Sse83871, Sall, SfiI, RsrI, AseI sowie SfiI. Diese Endonukleasen unterscheiden sich voneinander in der DNA-Sequenz, an der sie die DNA spalten und somit auch in der durchschnittlichen Anzahl der entstehenden Banden sowie der durchschnittlichen Größe der entstehenden Fragmente (TENOVER et al. 1995).

Bei der Untersuchung von Salmonellen mittels PFGE kommt ebenfalls eine Reihe von Makrorestriktions-Enzymen zum Einsatz. Bei den im wissenschaftlichen Schrifttum beschriebenen Endonukleasen handelt es sich um XbaI (LINDQVIST et al. 2004; LU et al. 2004; MARTINEZ-URTAZA et al. 2004), SpeI (WEIGEL et al. 2001; GORMAN und ADLEY 2004; WEIGEL et al. 2004) sowie BlnI (GORMAN und ADLEY 2004; LINDQVIST et al. 2004; SENO et al. 2004). Seltener verwendet werden AvrII (WEIGEL et al. 2001; WEIGEL et al. 2004), NotI (TSEN und LIN 2001; LINDQVIST et al. 2002), XhoI (VALDEZATE et al. 2000) oder I-CEUI (NAIR et al. 2004).

Üblicherweise werden in Studien zur PFGE von Salmonellen ein bis drei, selten vier Enzyme verwendet. Wenn es sich um ein Enzym handelt, wird vorwiegend XbaI ausgewählt.

Im Nationalen veterinärmedizinischen Referenzlabor für Salmonellen kommen die Enzyme XbaI, BlnI und SpeI zum Einsatz (RKI 2004a).

Ein wichtiges Auswahlkriterium für die Endonukleasen ist ein hoher diskriminatorischer Index als Grundlage für ein aussagekräftiges Ergebnis. In einigen vergleichenden Untersuchungen wurde der D-Index diverser bei der PFGE von Salmonellen verwendeter Enzyme ermittelt. Eine Auswahl dieser Werte ist in Tabelle 2.14 dargestellt.

Tabelle 2.14: D-Indizes für diverse Enzyme bei der PFGE aus verschiedenen Studien (LIEBSICH und SCHWARZ 1996; LACONCHA et al. 1998; RIDLEY et al. 1998; GUERRA et al. 2000; LACONCHA et al. 2000; MALORNY et al. 2001)

untersuchte Spezies	Xbal	SpeI	BlnI	NotI	Enzym-Kombinationen	
S. Enteritidis	0,703	0,591		0,591	Xbal+SpeI+NotI 0,815	LIEBSICH und SCHWARZ 1996a
S. Enteritidis	0,720					LACONCHA et al. 1998
S. Enteritidis	0,874	0,870			Xbal+SpeI 0,902	RIDLEY et al. 1998
S. Enteritidis	0,615	0,391	0,611		Xbal+SpeI+BlnI 0,802	LACONCHA et al. 2000
S. Typhimurium	0,870					GUERRA et al. 2000
S. Typhimurium DT104	0,332	0,520	0,599		SpeI+Xbal+BlnI 0,796	MALORNY et al. 2001

Die Auswahl der Enzyme kann je nach *Salmonella*-Spezies unterschiedlich ausfallen. In vergleichenden Untersuchungen werden für verschiedene Spezies unterschiedliche Enzyme im Hinblick auf eine besonders hohe diskriminatorische Fähigkeit empfohlen. Beispielsweise halten LIEBSICH und SCHWARZ (1996a), RIDLEY et al. (1998), LUKINMAA et al. (1999), LACONCHA et al. (2000) und LIEBANA et al. (2001) das Enzym Xbal für *Salmonella* Enteritidis als das am besten geeignete Enzym. LIEBANA et al. (2001) führen als Begründung an, dass die Wirkung von Xbal auf das Genom nicht von Punktmutationen beeinflusst wird. Andere Autoren sehen in BlnI das geeignetste Enzym für dieselbe Spezies (TERAJIMA et al. 1998; MURAKAMI et al. 1999 und 2001).

RHEAULT und QUESSY (2001) sprechen dem Enzym SpeI die höchste diskriminatorische Fähigkeit für *Salmonella* Typhimurium zu. MALORNY et al. (2001) nennen für den Phagentyp DT104 das Enzym BlnI.

LACONCHA et al. (2000) weisen hinsichtlich der Feintypisierung verschiedener Phagentypen zu der Enzymauswahl darauf hin, dass die Kombination unterschiedlicher Restriktionsenzyme für die Differenzierung entscheidend ist.

### 2.4.2.3 Technische Parameter

Für das einwandfreie Gelingen einer Pulsfeld-Gelelektrophorese ist das reibungslose Zusammenspiel komplexer technischer Parameter erforderlich.

Neben dem Agarosetyp beeinflusst die **Konzentration des Agarosegels** das Laufverhalten der DNA: Je geringer die Konzentration, desto schneller wandern die Moleküle, mit steigender Konzentration ist die Porengröße im Gel verkleinert und große Moleküle kommen nur langsam voran (MARTIN 1996; LAI et al. 1989). Die Laufzeit der Elektrophorese verlängert sich dann entsprechend (MARTIN 1996). Daten aus Tabelle 2.15 am Ende dieses Kapitels belegen den Zusammenhang zwischen Agarosekonzentration und Laufgeschwindigkeit.

Die Länge der **Pulszeit**, also der zeitlichen Abstände zwischen den Wechseln der Fließrichtung des elektrischen Stroms, ist entscheidend für die saubere Auftrennung unterschiedlich großer DNA-Fragmente. Größere DNA-Fragmente werden besser bzw. überhaupt erst bei längeren Pulszeiten voneinander getrennt, da nur so ausreichend Zeit zur Reorientierung im elektrischen Feld gegeben ist. GARDINER (1991) führte die Elektrophorese gleicher DNA bei unterschiedlichen Bedingungen durch. Die vergleichenden Gelphotographien zeigen eindrucksvoll, dass erst bei Anlegen eines Pulsfeldes sowie ausreichend langen Pulszeiten (im Minutenbereich) Banden mit größeren DNA-Fragmenten sauber darstellbar sind. Für kleinere Moleküle wurde mit langen Pulszeiten ein nahezu konstantes elektrisches Feld simuliert (hier gelingt die Reorientierung leicht), so dass bei entsprechenden Bedingungen der anderen Parameter auch diese DNA-Fragmente in einer PFGE

darstellbar sind. Auch LAI et al. (1989) haben in einigen Abbildungen den Einfluss der Pulszeit auf die Laufgeschwindigkeit der Nukleinsäurefragmente dargestellt.

Die elektrische **Feldstärke  $E$**  bezeichnet die Stärke eines elektrischen Feldes an einem gegebenen Punkt im Raum und wird ausgedrückt in der Einheit Volt pro Meter [V/m]. Die Feldstärke gibt an, wie groß in einem elektrischen Feld die Kraft ist, die auf ein geladenes Molekül ausgeübt wird (KUCHLING 1994). Eine Erhöhung der Feldstärke kann die Laufzeit der Elektrophorese verkürzen. Bei zu hoher Feldstärke jedoch gehen die Moleküle von ihrer schlängelnden Bewegung durch das Gel ("reptation") über in eine starre Stäbchenform. So verlieren Größe und Länge des Moleküls Einfluss auf die Laufgeschwindigkeit und das Trennungsvermögen der Matrix sinkt erheblich bzw. geht verloren (MARTIN 1996). Im Falle zu niedriger Feldstärken kann es zu einem als Bandenumkehr („band inversion“) bezeichneten Phänomen kommen. Hierbei wandern (bei bestimmten Agarosekonzentrationen) Moleküle mit einem geringeren Molekulargewicht langsamer als Moleküle, die ein deutlich höheres Molekulargewicht aufweisen (MARTIN 1996). Martin (1996) bezeichnet die Möglichkeit einer Bandenumkehr als den "vielleicht (...) wichtigsten Grund", auf jedem Gel einen Marker mit einer Mischung aus bekannten und leicht zu identifizierenden DNA-Fragmenten mitzuführen. Mit dieser Form der Kontrolle kann das Auftreten einer Bandenumkehr (mit der Folge von Fehlinterpretationen der Bandenmuster) erkannt, und Fehlinterpretationen können ausgeschlossen werden.

Je höher die **Temperatur** in einer Elektrophorese-Einheit, desto schneller wandern die DNA-Fragmente. Bei zu hoher Laufgeschwindigkeit jedoch würden neben den großen Fragmenten selbst kleinere DNA-Stücke in den Poren des Gels hängen bleiben („trapping“). Es käme so zu einem unbrauchbaren Ergebnis. Die Betriebstemperatur der PFGE liegt demzufolge mit 4 - 15°C deutlich unter Raumtemperatur, bei der üblicherweise nicht gepulste Elektrophoresen durchgeführt werden (LAI et al. 1989; GARDINER 1991). Konstante und gesteuerte Temperaturverhältnisse während der Elektrophorese gewährleisten zudem die Reproduzierbarkeit der Untersuchung.

Der **Winkel des angelegten Pulsfeldes** (also der Stromrichtungen zueinander) ist in der Regel ein stumpfer Winkel. Eine Variation dieses Winkels zwischen 105° und



165° hat keinen bedeutsamen Einfluss auf das Ergebnis der PFGE (GARDINER 1991; LAI et al. 1989). Wird der Winkel während der Laufzeit geändert, kann es nach LAI et al. (1989) zu ungleichmäßigen Wanderungsgeschwindigkeiten während der Auftrennung kommen.

Tabelle 2.15 stellt einige der genannten Parameter in Beziehung und gibt einen Einblick in die Abhängigkeit der Einflussgrößen voneinander.

Tabelle 2.15: Fließgeschwindigkeit von Lambda-DNA<sup>1</sup> bei einer konstanten Pulszeit von 90 Sekunden und variierten Feldstärken, Temperaturen, Agarose-Konzentrationen und Pulsfeldwinkeln (LAI et al. 1989)

<b>Feldstärke [V/cm]</b>	<b>Temperatur [°C]</b>	<b>Agarose - Konzentration [%]</b>	<b>Winkel des Pulsfeldes [°]</b>	<b>Fließgeschwindigkeit [cm/h]</b>
3	13	1,0	120	0,10
6	5	1,0	120	0,25
6	13	1,0	120	0,31
6	25	1,0	120	0,42
6	34	1,0	120	0,48
9	13	1,0	120	0,59
6	13	0,6	120	0,46
6	13	1,4	120	0,21
6	13	1,8	120	0,16
6	25	1,4	120	0,32
6	25	1,6	120	0,27
6	13	1,0	105	0,41
6	13	1,0	135	0,24
6	13	1,0	150	0,17
6	13	1,0	165	0,09

<sup>1</sup> Lambda-DNA bezeichnet Bacteriophagen-DNA bekannter Größe, die auch als Längenmarker bei der PFGE eingesetzt wird

#### 2.4.2.4 Darstellung und Interpretation der Makrorestriktionsfragmente

Die **Darstellung** der Banden einer Makrorestriktionsanalyse kann nach MARTIN (1996) durch die Markierung mit fluoreszierenden oder radioaktiven Nukleotiden, durch Markierung mit spezifischen Proteinen, durch konventionelle Färbung oder durch Bindung von Fluoreszenz-Farbstoffen erfolgen. Bei der letzteren Variante, die für die PFGE vorwiegend eingesetzt wird, wird in der Regel Ethidiumbromid zur Färbung von Agarosegelen verwendet (MARTIN 1996).

Ethidiumbromid verfügt über ein flaches, planares Ringsystem, welches sich bei der Färbung zwischen die ähnlich gestalteten Ringe der Purine und Pyrimidine der DNA schiebt. Dieser Vorgang wird als Interkalation bezeichnet. Im interkalierten Zustand wird UV-Licht von den Purin- und Pyrimidinbasen absorbiert und an das gebundene Ethidiumbromid weitergegeben. Die Freisetzung dieser Energie durch das Ethidiumbromid im Bereich des sichtbaren Lichts führt zu einer Fluoreszenz der Banden, die besonders gut bei der Betrachtung in einer Dunkelkammer zu sehen ist (MARTIN 1996).

Die Ethidiumbromidfärbung darf nur unter großen Vorsichtsmaßnahmen durchgeführt werden, da Ethidiumbromid mutagen ist und im Verdacht steht, Krebs auszulösen. Demnach ist Kontakt mit diesem Stoff unbedingt zu vermeiden. Zudem können die UV-Strahlen (bei der Ethidiumbromidfärbung in der Regel 302 nm), mit denen die gefärbten Gele bestrahlt werden, zu erheblichen Verletzungen der Haut und insbesondere der Augen führen. Auch hier ist ein entsprechender Schutz (UV-Maske) unumgänglich (MARTIN 1996).

Die **Dokumentation** der gefärbten Agarosegele erfolgt in der Regel über Photos (MARTIN 1996).

Die **Auswertung** der Gelphotographien erfolgt entweder visuell oder mit Hilfe von Auswertungsprogrammen wie beispielsweise *GelCompare* von *Applied Maths*. OLIVE und BEAN (1999) führen eine Reihe weiterer Auswertungsprogramme auf. Diese Auswertungsprogramme kommen, wenn sie nicht routinemäßig Anwendung finden, dann zum Einsatz, wenn die Anzahl der auszuwertenden Banden für die visuelle Auswertung zu umfangreich wird.

Die **Bewertung** und **Interpretation** der Bandenmuster erfolgt in der überwiegenden Zahl der veröffentlichten Studien, in denen die PFGE zum Einsatz kam, nach TENOVER et al. (1995), auch wenn die Methode gelegentlich in der Kritik einzelner Autoren steht (HEIR et al. 2002; LIEBANA 2002; SOOD et al. 2002; PRAGER und TSCHÄPE 2003; WASSENAAR 2003). Bei TENOVER et al. (1995) werden Empfehlungen zur standardisierten Interpretation von PFGE-Bandenmustern formuliert, die dort detailliert erläutert und im Folgenden vorgestellt werden.

TENOVER et al. (1995) gehen zunächst davon aus, dass bei epidemiologisch relevantem Geschehen alle im Kontext einer Erkrankung ermittelten Erreger (Ausbruch-Stämme) von einem einzigen Vorläufer stammen und diese Isolate denselben Genotyp aufweisen. Epidemiologisch nicht verwandte Stämme weisen nicht denselben Genotyp auf. Eine Ausnahme bilden hier Spezies mit einer geringen genetischen Diversität bzw. einer hohen Klonalität, also insgesamt engen Verwandtschaft der Population (TENOVER et al. 1995).

Als geeignetes Probenmaterial für epidemiologische Untersuchungen mittels PFGE und einer entsprechenden Auswertung betrachten TENOVER et al. (1995) Proben (von Patienten, Infektionsträgern, aus der Umwelt), die sowohl aus dem Umfeld als auch aus dem Zeitraum *eines* Infektionsvorkommens stammen und Verbindung zu einer gemeinsamen Infektionsquelle haben. Die Proben sollten in einem Zeitraum von weniger als einem Jahr gesammelt worden sein.

Es muss auch Kenntnis darüber vorhanden sein, wie sich spontane genetische Veränderungen (z.B. Punktmutation, Deletion, Insertion) auf das Bandenmuster auswirken (TENOVER et al. 1995). Tabelle 2.16 zeigt die Auswirkungen genetischer Mutationen auf PFGE-Bandenmuster (Anzahl unterschiedlicher Fragmente).

Unter Berücksichtigung aller Prämissen schlagen TENOVER et al. (1995) Kriterien vor, nach denen die interpretierten Bandenmuster einzelnen Kategorien zugeordnet werden können und so eine Aussage über das epidemiologische Verhältnis einzelner Stämme zueinander möglich wird. In Tabelle 2.16 sind diese Kriterien sowie deren Interpretation aufgeführt.

Tabelle 2.16: Kriterien für die Interpretation von PFGE-Mustern (TENOVER et al. 1995)

Kategorie	Anzahl der genetischen Unterschiede im Vergleich zum Ausbruch-Stamm	(Auswirkungen:) Typische Anzahl der unterschiedlichen Fragmente im Vergleich zum Ausbruch-Stamm	Epidemiologische Interpretation
nicht unterscheidbar	0	0	Isolate <b>sind</b> Teil eines Ausbruchs
nahe verwandt	1	2-3	Isolate sind <b>wahrscheinlich</b> Teil eines Ausbruchs
möglicherweise verwandt	2	4-6	Isolate sind <b>möglicherweise</b> Teil eines Ausbruchs
unterschiedlich	≥ 3	≥ 7	Isolate sind <b>nicht</b> Teil eines Ausbruchs

TENOVER et al. (1995) erläutern die Kategorien aus Tabelle 2.16 wie folgt:

In der Kategorie "**nicht unterscheidbar**" werden Isolate eingeordnet, deren Bandenmuster in der PFGE absolut identisch sind. Es ist davon auszugehen, dass diese Isolate denselben Stamm repräsentieren.

Als "**nahe verwandt**" gelten Isolate, bei denen sich die Unterschiede der Bandenmuster aus lediglich einem genetischen "Ereignis" (also einer Veränderung der Basensequenz) generieren. Typischerweise unterscheiden sich die Muster in 2 - 3 Banden, die entstehen, wenn z.B. durch eine einzelne genetische Veränderung eine neue Angriffstelle für die Restriktionsenzyme entstanden ist. Eine Bande, auf der diese Angriffstelle lokalisiert war, würde so wegfallen und sich als zwei neue, kleinere Banden darstellen. Im Vergleich mit einem nahe verwandten Isolat würden sich somit drei im Bandenmuster erkennbare Unterschiede ergeben.

"**Möglicherweise verwandt**" sind Isolate, bei denen ein Unterschied von vier bis sechs Banden darstellbar ist, die sich aus zwei unabhängigen genetischen Veränderungen ergeben haben.

In der Kategorie "**unterschiedlich**" werden alle Isolate zusammengefasst, bei denen sich die Unterschiede in den Bandenmustern aus mehr als drei unabhängigen genetischen Veränderungen ergeben haben müssen.

Eine Darstellung der Verwandtschaft der untersuchten Banden untereinander kann mit Hilfe eines Dendogramms erfolgen. Hierbei werden die Verwandtschaftsverhältnisse prozentual berechnet und in einer Art Stammbaum dargestellt. Die Form

der Darstellung ist in den handelsüblichen Auswertungsprogrammen integriert und wird aus den eingegebenen Daten generiert. Abbildung 2.4 zeigt beispielhaft ein Dendrogramm als Ergebnis einer Studie zur Heterogenität bzw. Klonalität von Salmonellen bei Schlachtschweinen von WONDERLING et al. (2003). Unter "PFGE pattern" sind die Bandenmuster abgebildet. Aus dem links stehenden Dendrogramm wird mit Hilfe der Skala der prozentualen Verwandtschaftsgrad der Isolate abgelesen.

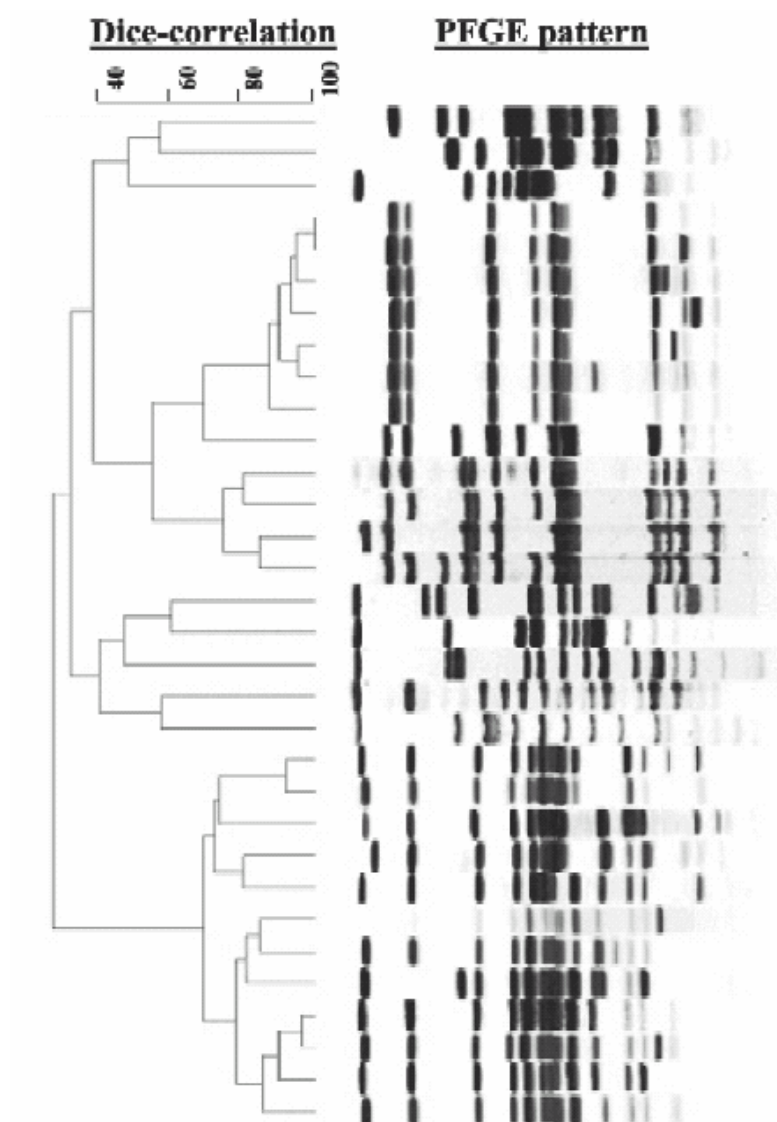


Abbildung 2.4: Dendrogramm als Auswertungsmöglichkeit einer PFGE (WONDERLING et al. 2003)

#### **2.4.2.5 Anwendungen der PFGE**

Die Pulsfeld-Gelelektrophorese als molekularbiologische Typisierungsmethode für Bakterien kommt sowohl bei gram-positiven Bakterien (Stäbchen und Kokken) (LE BOURGEOIS et al. 1993; CHIOU et al. 2004; MINEYAMA et al. 2004; WINTER et al. 2004) als auch bei gram-negativen Bakterien (Stäbchen und Kokken) (JACOBSSON et al. 2003; CONNERTON et al. 2004) zum Einsatz.

Die Anwendungsbereiche für die PFGE sind vielfältig. Nach GARDINER (1991) liegen wichtige Einsatzgebiete bei der Erfassung der Struktur von Genomen, der Bestimmung der Nähe zweier Gene zueinander, der Größenbestimmung sehr großer Gene, der Lokalisation chromosomaler Brüche (z.B. bei der Erforschung menschlicher Erkrankungen) oder bei der Untersuchung strahlengeschädigter DNA. Besondere Bedeutung hat die PFGE bei der Genkartierung (McCLELLAND 1987; LAI 1989; GARDINER 1991, LIEBISCH und SCHWARZ 1996; MARTIN 1996) der Genome von Säugetieren und bakteriellen Chromosomen, die durch die PFGE entscheidend verbessert werden konnte (MARTIN 1996). LIEBISCH und SCHWARZ (1996) geben in ihrer Veröffentlichung eine Anwendungsübersicht. Die Autoren sehen die Einsatzmöglichkeiten in der mikrobiologischen Diagnostik, bei Problemen in der Umwelt- und Krankenhaushygiene, der Überwachung der genetischen Stabilität rekombinanter und mutagenisierter Bakterienstämmen sowie in der Infektionsepidemiologie.

Im Kontext der Infektionsepidemiologie sehen OLIVE und BEAN (1999) die zentralen Einsatzgebiete bei der Überprüfung der Ähnlichkeit von Stämmen, der Untersuchung phylogenetischer Eigenschaften sowie epidemiologischer Fragestellungen (z.B. Ausbruchsuntersuchungen).

In diesem Zusammenhang wird auch der Einsatz der PFGE zur Feintypisierung von Salmonellen, zumindest als alleiniges genotypisches Untersuchungsverfahren, in Frage gestellt. In Tabelle 2.17 sind die ermittelten D-Indizes aus ausgewählten Untersuchungen genotypischer (und phänotypischer) Methoden zur Feintypisierung von Salmonellen zusammengestellt. Es wird deutlich, wie unterschiedlich die Beurteilungen der Methoden ausfallen. Möglich ist auch, dass unterschiedliche Protokolle einen Einfluss haben.

Tabelle 2.17: Darstellung der D-Indizes ausgewählter Studien zur Feintypisierung von Salmonella im Vergleich

unter- suchte Serovar	PFGE	Phagen- typisierung	Ribo- typi- sierung	Plasmid- analyse	IS200	RAPD	PFGE in Kombination mit	Quelle
<b>S.</b> <b>Enteritidis</b>	XbaI+SpeI +NotI 0,815	0,755	0	0,187	0,396	-	-	<b>LIEBISCH und SCHWARZ 1996a</b>
<b>S.</b> <b>Enteritidis</b>	0,72	0,62	-	-	-	0,46	Phagentypisierung: 0,87 Phagentypisierung+ RAPD: 0,92	<b>LACONCHA et al 1998</b>
<b>S.</b> <b>Enteritidis</b>	XbaI+SpeI 0,92		0,259	-	-	-	-	<b>RIDLEY et al. 1998</b>
<b>S.</b> <b>Enteritidis</b>	XbaI+SpeI +BlnI 0,802	PT4: 0,419 (BlnI) PT6: 0,804 (SpeI) PT8: 0,469 (BlnI)	-	-	-	-	-	<b>LACONCHA et. al. 2000</b>
<b>S. Typhi- murium DT104</b>	XbaI+SpeI +BlnI 0,796	-	-	0,762	PstI 0,288	12 Primer 0,778	Plasmidprofil+PFGE (SpeI): 0,583 Plasmidprofil+PFGE (XbaI): 0,794 Plasmidprofil+PFGE (BlnI): 0,893 Plasmidprofil+PFGE (XbaI+SpeI+BlnI): 0,909 Plasmidprofil+RAPD: 0,859 Plasmidprofil+PFGE (BlnI)+RAPD: 0,905	<b>MALORNY et al. 2001</b>

LIEBANA (2002) hält insbesondere bei den hoch klonalen Spezies wie *Salmonella* Enteritidis die Einführung wirkungsvollerer Untersuchungsmethoden für erforderlich. Bezüglich der Feindifferenzierung von *Salmonella* Enteritidis zeigen beispielsweise THONG et al. (1995), LIN et al. (1996), AHMED et al. (2000) und SCOTT et al. (2001), dass die PFGE hier weniger geeignet ist als andere molekularbiologische Untersuchungsmethoden.

LETELLIER et al. (1999) konnten bei *Salmonella* Typhimurium DT104 mit der PFGE keine Unterschiede darstellen. Ebenso konnten LING et al. (2001) *Salmonella* Typhimurium DT 104L mittels PFGE nicht weiter unterscheiden.

STANLEY et al. (1995) konnten die PFGE bei *Salmonella* Panama nicht durchführen, ein andere genotypische Untersuchungsmethode (IS200) hingegen zeigte sich als bestens geeignet zur Feintypisierung dieser Serovar.

In anderen Studien war der Diskriminatorische Index für die durchgeführte PFGE niedriger als der von vergleichsweise durchgeführten Typisierungsverfahren (vergl. Tabelle 2.17).

Für die Untersuchung von Salmonellen wird die PFGE eingesetzt, insbesondere zur Klärung epidemiologischer Fragen und Zusammenhänge eingesetzt. Die Tabelle 2.18 gibt einen Überblick über eine Auswahl von Veröffentlichungen zu den verschiedenen Anwendungsmöglichkeiten der PFGE bei Salmonellen.

Zur Erfassung von Zusammenhängen hat sich in Deutschland das "Forschungsnetzwerk Lebensmittelinfektionen in Deutschland" etabliert, innerhalb dessen das sogenannte "German PulseNet" agiert. Im Rahmen dieses Verbundes werden vor allem die Untersuchungsergebnisse von *Salmonella*-Isolaten verschiedener Herkunft zusammengeführt. Voraussetzung für die Zusammenführung der Daten war eine einheitliche Vorgehensweise (Protokoll), Auswertung und Speicherung der Ergebnisse. So können nun Daten über eine große räumliche und zeitliche Distanz miteinander verglichen und Erkrankungen an verschiedenen Orten auf eine Quelle zurückgeführt werden. Die Beteiligten in Deutschland sind das Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Würzburg, und das Robert-Koch-Institut,



Werningerode (<http://www.foodborne-net.de>). Aus finanziellen Gründen ist die Beteiligung derzeit auf die beiden genannten Institutionen beschränkt.

Als Vorbild für diese Datenbank diente das PulseNet des CDC (Centre of Disease Control and Prevention) in den USA, welches weltweit erstmalig eine Datenbank mit genotypischen Erregereigenschaften aufsetzte und diese Daten landesweit vernetzte. Eine ausführliche Beschreibung des PulseNets findet sich bei SWAMINATHAN et al. (2001).

Die PFGE gehört im Nationalen veterinärmedizinischen Referenzlaboratorium für Salmonellen zum Laborstandard und kommt bei der Untersuchung von *Salmonella*-Isolaten von Tieren, Lebens- und Futtermitteln sowie der Umwelt regelmäßig zum Einsatz (RKI 2004a).

Tabelle 2.18.: PFGE bei Salmonellen – ausgewählte Anwendungsbeispiele

Jahr	Autor	Thema der Studie	untersuchte Spezies
1999	LIU et al.	phylogenetische Untersuchungen zur Klassifizierung von Salmonellen	diverse Serovaren
2000	GUERRA et al.	kombinierte Anwendung mit phänotypischen Methode und Evaluation bzw. Bestimmung der diskriminatorischen Fähigkeiten der PFGE	S. Typhimurium
2000	GOH et al.	Verwandtschaftsuntersuchung; Evaluierung von Methoden	S. Weltevreden
2001	EBNER und METHEW	vergleichende Untersuchung molekularbiologischer Techniken	S. Typhimurium DT104
2001	HAMADA und OSHIBE	phylogenetische Untersuchungen an Isolaten aus Lebensmittel-bedingten Infektionen eines begrenzten Zeitraums	S. Enteritidis
2001	MALORNY et al.	vergleichende Untersuchung molekularbiologischer Techniken	S. Typhimurium DT104
2002	ALLEN und POPPE	Feintypisierung verschiedener Isolate mit gleicher Antibiotikaresistenz	diverse Serovaren
2002	LIESEGANG und TSCHÄPE	Modifizierung/Optimierung der Methode	diverse Serovaren
2002	SOOD et al.	Subtypisierung multiresistenter <i>Salmonella</i> -Isolate; Vergleich mit anderer molekularbiologischen Techniken	S. Typhimurium
2002	TSEN et al.	Nachweis der Zirkulation von Salmonellen zwischen Mensch und Tier	S. Typhimurium
2004	GORMAN und ADLEY	Charakterisierung von Isolaten (von Menschen und Tieren)	S. Typhimurium
2004	KIM et al.	Verwandtschaftsuntersuchung/Feintypisierung verschiedener Isolate gleicher Serovar-Zugehörigkeit	S. Typhimurium DT104
2004	LIEBANA et al.	Bestimmung der genetische Diversität	S. Enteritidis PT 4, 6, 7, 8 u. 13a
2004	LU et al.	bezirksweite Ausbruchuntersuchung; Quelle: Bäckerei	S. Enteritidis
2004	SENO et al.	genotypische Diversität von Salmonellen bei Patienten aus umgrenztem Areal	S. Enteritidis
2004	THONG et al.	Verwandtschaftsuntersuchung/Feintypisierung verschiedener Isolate mit gleicher Serovar aus einem begrenzten Zeitraum	S. Tshiongwé

### **3 Eigene Untersuchungen<sup>3</sup>**

#### **3.1 Material**

Im Vordergrund dieser Untersuchung standen die in der Schlachtlinie eingesetzten Handgeräte (Messer, Handbeil) sowie die Produkt berührenden Kettenhandschuhe bzw. Handflächen des Personals an den Positionen *Eviszeration der Bauchhöhlenorgane, Spaltung der Tierkörper, Fleischuntersuchung der Organe und Fleischuntersuchung der Tierkörper*. Um mögliche Übertragungswege nachvollziehen zu können, wurden zudem Teile der geschlachteten Tiere beprobt, die mit den Handgeräten und/oder Handflächen bzw. Kettenhandschuhen direkt in Berührung kommen. Die genaue Beschreibung dieses Probenmaterials erfolgt in der Darstellung der Probengewinnung (Kapitel 3.2.3 und Kapitel 3.2.4) und ist der Abbildung 3 zu entnehmen.

Die Untersuchungen erfolgten im Institut für Anatomie, Physiologie und Hygiene der Haustiere, Abteilung Veterinär- und Lebensmittelhygiene, der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn und in den Laboratorien des Instituts für Fleischhygiene und -technologie des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin. Die Bestätigung der *Salmonella*-Isolate sowie die Phagentypisierung und die Resistenzbestimmung wurden im Nationalen veterinärmedizinischen Referenzlabor für Salmonellen des Bundesinstituts für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV) in Berlin<sup>4</sup> durchgeführt.

##### **3.1.1 Betriebsablauf und Bedingungen im Schlachtbetrieb**

Die Entnahme der Proben erfolgte in einem Schlachtbetrieb im westdeutschen Raum. Der Betrieb wird als öffentliche Einrichtung geführt und als GmbH mit etwa 70 Gesellschaftern betrieben. Ein Schlachtband für Schweine ist seit 1974 in Betrieb. Es handelt sich um eine wenig automatisierte Anlage.

---

<sup>3</sup> Die vorliegenden Untersuchungen wurden im Rahmen des Forschungsvorhabens Schlacht- und Untersuchungshygiene (AZ 424-7030 56/93) im Auftrag des Bundesministeriums für Gesundheit, Bonn, durchgeführt.

<sup>4</sup> Seit 01.11.2002 Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR). Unser herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. R. Helmuth, Direktor des Nationalen veterinärmedizinischen Referenzlabors für Salmonellen, für die Durchführung der Untersuchungen und Zurverfügungstellung der Ergebnisse.

Die Schlachtung der Tiere erfolgte mittels CO<sub>2</sub>-Betäubung und anschließendem Blutentzug am liegenden Tierkörper. Dem schloss sich eine Vorreinigung der geschlachteten Tiere in einer Bürstenwaschmaschine an. Das Brühen der Tierkörper erfolgte vertikal in einem Sprühbrühtunnel. Die Tierkörper wurden anschließend auf einem Krattisch liegend manuell nachbehandelt. Diese „unreine Seite“ der Fleischgewinnungslinie wurde mit der Durchführung von Augen- bzw. Ohrenausschnitt abgeschlossen. Im Anschluss wurden die Tierkörper durch einen Sengofen und einen Peitschenwäscher geführt.

An der ersten Arbeitsposition der „reinen Seite“ erfolgte zunächst die Eviszeration der Bauchhöhlenorgane, an der zweiten Position wurden die Brusthöhlenorgane entnommen. Die nachfolgende Spaltung der Tierkörper verteilte sich auf zwei Positionen, bei denen der Tierkörper erst bis zum Ende der Brustwirbelsäule in der Medianlinie geteilt wurde (Spaltung Tierkörper) und im Anschluss Halswirbelsäule und Kopf gespalten wurden (Spaltung Kopf). Anschließend wurde das Flomen gelöst und es erfolgte die amtliche Fleischuntersuchung des Tierkörpers parallel zu der Untersuchung der zugehörigen Organe.

Die Arbeitsschritte der „reinen Seite“ der Fleischgewinnungslinie wurden vollständig manuell durchgeführt.

Die Reinigung und Sterilisation der verwendeten Messer erfolgte in Sterilisationsbecken, die den einzelnen Arbeitspositionen zugehörig aufgestellt waren.

Die durchschnittliche Bandgeschwindigkeit lag bei etwa 120 Schweinen pro Stunde. Von der Schlachtung eines Tieres bis zum Erreichen des Bandendes verstrichen nach Angaben der Betriebsleitung im Durchschnitt 35 Minuten.

### **3.1.2 Geräte und Hilfsmittel zur Probenahme**

Zur Beprobung der in der Schlachtlinie eingesetzten Handgeräte wurden 10x10 cm große Mullkompressen aus Verbandmull (Bezeichnung: „mit eingeschlagenen Schnittkanten“, „8-fach gefaltet“) der Firma Hartmann verwendet. Die Vorbereitung der hier als Tupfer bezeichneten Kompressen erfolgte wie in Kapitel 7.1 beschrieben. Die Gewinnung der Organproben erfolgte mit Hilfe steriler Pinzetten und Messer. Die Instrumente wurden vor jeder Nutzung erneut sterilisiert, indem sie in 70%igen Alkohol getaucht und anschließend abgeflammt wurden.

Das Probenmaterial wurde in sterilen, eindeutig gekennzeichneten Stomacherbeuteln aufbewahrt, die mit den dazugehörigen Bag-Clips verschlossen wurden.

Die Wasserproben aus den Sterilisationsbecken wurden mittels steriler Einwegspritzen und Kanülen gewonnen. Die Wassertemperatur wurde mit einem digitalen Thermometer mit Einstechfühler gemessen.

Zur Ermittlung der Größe der Messerflächen wurden die Messer auf ein Blatt Papier gedrückt, welches auf einem Klemmbrett fixiert war. Die Silhouette der Messer wurde dann mit einem wasserfesten Stift nachgezeichnet.

### **3.1.3 Nährmedien, Chemikalien und Reagenzien**

Die Lagerung und Entsorgung aller Nährmedien, Chemikalien und Reagenzien erfolgte nach den Vorgaben der Hersteller.

#### **3.1.3.1 Nährmedien, Chemikalien und Reagenzien für phänotypische Untersuchungen**

Die Medien zur kulturellen Anzucht der untersuchten Mikroorganismen wurden in der laboreigenen Medienküche vorschriftsgemäß vorbereitet und in sterile Petrischalen aus Kunststoff bzw. sterile Glasröhrchen mit autoklavierbaren Wattestopfen oder Kapsenbergkappen gegossen. Tabelle 3.1 zeigt eine Aufstellung dieser Nährmedien und den entsprechenden Verwendungszweck. Eine Beschreibung der zu Grunde liegenden Rezepturen ist dem Anhang (Kapitel 7.3) zu entnehmen.

Die zur phänotypischen Charakterisierung der Zielkeime verwendeten Chemikalien und Reagenzien sind im Anhang unter Punkt 7.3 aufgeführt.

Nährmedien, Chemikalien und Reagenzien, die bei den Untersuchungen im Nationalen veterinärmedizinischen Referenzlabor für Salmonellen des Bundesinstituts für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin verwendet wurden, sind in den dortigen Laborunterlagen festgehalten und werden hier nicht gesondert aufgeführt.

Tabelle 3.1: Eingesetzte Nährmedien und ihre Verwendung

Nährmedium	Quelle	Verwendung
Äsculin-Bouillon	Rezeptur siehe Anhang (Kapitel 7.3)	Äsculinabbau
Arginin-Bouillon nach SCHUBERT	Merck Art. Nr. 13892	Argininabbau
BPLS-Agar (Brilliantgrün-Phenolrot-Lactose-Saccharose)	Merck Art. Nr. 7237	festes Selektivmedium für den <i>Salmonella</i> -Nachweis
Diasalm nach VAN NETTEN und VAN DER ZEE	Merck Art. Nr. 9803	halbfestes Selektivmedium für den <i>Salmonella</i> -Nachweis
Casein-Pepton-Hefeextrakt-Glucose-Agar (Plate-Count-Agar)	Merck Art. Nr. 5463	Bestimmung der Gesamtkeimzahl im Plattengussverfahren
Harnstoff-Bouillon	Merck Art. Nr. 8483	Harnstoffspaltung
Low-Melting-Point-Agarose	Fa. AMRESCO/Ohio	PFGE
Lysin-Eisen-Agar	Merck Art. Nr. 1640	Lysindecaboxylasen, H <sub>2</sub> S-Bildung
Malonat-Phenylalanin-Bouillon nach SHAW und CLARK	Merck Art. Nr. 5419	Malonatverwertung, Phenylalanin-desaminierung
MLCB-Agar (Mannit-Lysin-Kristallviolett-Brilliantgrün)	Oxoid CM 783	festes Selektivmedium für den <i>Salmonella</i> -Nachweis
MRVP-Bouillon (Methylrot-VOGES-PROSKAUER)	Merck Art.Nr. 5712	Voges-Proskauer-Test, Methylrotprobe
NaCl-Pepton	nach amtlicher Sammlung § 35 LMBG	Verdünnungslösung, Voranreicherung <i>Salmonella</i>
Nitrat-Bouillon	Merck Art. Nr. 10204	Nitratreduktion, (Indolbildung)
O / F - Medium nach HUGH und LEIFFSON	Merck Art. Nr. 10282	oxidativer und fermentativer Abbau von Kohlenhydraten
O / F - Medium nach HUGH und LEIFFSON mit Ornithin	Merck Art. Nr. 10282 mit Zusatz Ornithin	Ornithindecaboxylase
Phenolrot-Bouillon(Basis) mit diversen Kohlenhydraten <sup>1</sup>	Merck Art. Nr. 0987	Kohlenhydratabbau
Physiologische Kochsalzlösung		Verdünnungslösung
<i>Salmonella</i> -Anreicherungsbouillon nach RAPPAPORT	Merck Art. Nr. 10236	selektive Anreicherung von <i>Salmonella</i> spp.
SIMMONS-Citrat-Agar	Merck Art. Nr. 2501	Verwertung von Citrat als einziger Kohlenstoffquelle
SIM-Nährboden	Merck. Art.Nr. 5470	Sulfidbildung, Indolbildung, Beweglichkeit
Standard-I-Nähragar	Merck Art. Nr. 7881	Reinkultivierung, Differenzierung, Aufbewahrung, Anzucht für PFGE
TBG-Bouillon (Tetrathionat-Brilliantgrün-Galle-Anreicherungs-Bouillon)	Merck Art.Nr. 5172	selektive Anreicherung von <i>Salmonella</i>
TSI-Agar (Triple-Sugar-Iron)	Merck Art. Nr. 3915	Glucosespaltung, Lactosespaltung, Gasbildung, H <sub>2</sub> S-Bildung
VRBD Agar nach MOSSEL (Kristallgrün-Neutralrot-Galle-Glucose)	Merck Art. Nr. 10275	Erfassung von Enterobacteriaceae

<sup>1</sup> Adonit, L (+)Arabinose, Dulcitol, myo-Inositol, D(-)Mannit, Raffinose-Pentahydrat, L(+)-Rhamnose-Monohydrat, Salicin, D(-)Sorbit

### **3.1.3.2 Nährmedien und Chemikalien für genotypische Untersuchungen**

Medien, die bei der PFGE eingesetzt wurden, sind ebenfalls in Tabelle 3.1 aufgeführt.

Die Chemikalien und Reagenzien, die bei der Pulsfeld-Gelelektrophorese verwendet wurden, finden sich in Tabelle 3.5 (Kapitel 3.2.5.3) und im Anhang (Kapitel 7.3).

## **3.2 Methoden**

### **3.2.1 Vorbereitende Maßnahmen und Untersuchungen**

Das hohe Probenaufkommen insgesamt und je Probenahmetag machte es erforderlich, mehrere Personen an der Aufarbeitung der Proben zu beteiligen. In Folge dessen war die korrekte und einheitliche Anwendung der Labortechniken im Rahmen der internen Qualitätssicherung bei allen beteiligten Personen zu sichern.

Die ausführliche Darstellung der Vorgehensweise ist im Anhang dem Kapitel 7.1 zu entnehmen. Mit der Durchführung der Vorversuche sowie der Vorbereitung des ersten Probenahmetages wurde im November 1998 begonnen.

### **3.2.2 Probenumfang, Probenahmedesign, Transport**

Die Probenahme erstreckte sich über einen Zeitraum vom Frühjahr 1999 bis zum Frühjahr 2000.

Die Probenahmetage waren weitestgehend gleichmäßig über den Probenahmezeitraum verteilt, wobei nicht weniger als zwei und nicht mehr als sechs Kalenderwochen zwischen den einzelnen Probenahmetagen lagen. Die Zeiträume dazwischen wurden zur Nachbereitung der vorangegangenen und zur Vorbereitung der kommenden Probenahme genutzt. Tabelle 3.2 zeigt den genauen Zeitplan der Probenahmen.

Tabelle 3.2: Probenahme-Termine

Probenahme- tag	Datum	Kalender- woche	Probenahme- tag	Datum	Kalender- woche
<b>1</b>	08.03.1999	10	<b>8</b>	27.09.1999	39
<b>2</b>	12.04.1999	15	<b>9</b>	18.10.1999	42
<b>3</b>	03.05.1999	18	<b>10</b>	08.11.1999	45
<b>4</b>	07.06.1999	23	<b>11</b>	29.11.1999	48
<b>5</b>	28.06.1999	26	<b>12</b>	13.12.1999	50
<b>6</b>	09.08.1999	32	<b>13</b>	24.01.2000	4
<b>7</b>	30.08.1999	35	<b>14</b>	14.02.2000	7

Die Probenahme erfolgte nach einem festgelegten Grundmuster sieben Mal je Probenahmetag. Die Probenahmen bezogen sich auf die Positionen:

- Eviszation der Bauchhöhle
- Spaltung des Tierkörpers
- Fleischuntersuchung des Tierkörpers
- Fleischuntersuchung der Organe

An diesen Positionen wurden im laufenden Betrieb die jeweils verwendeten Handgeräte (Messer bzw. Beil) vor Gebrauch, also unmittelbar nach Entnahme aus dem Sterilisationsbecken, beprobt sowie unmittelbar nach Gebrauch und bevor das Handgerät erneut in das Sterilisationsbecken verbracht wurde.

Zusätzlich wurden an den jeweiligen Positionen diejenigen Tierkörper Teile bzw. Organe beprobt, die mit dem beprobten Messer bzw. Beil in Kontakt gekommen waren, um an jeder Probenahme position einen geschlossenen Arbeitskreislauf erfassen zu können.

Nach diesem Prinzip wurde an jeder Probenahme position je Tag sieben Mal vorgegangen. Daraus ergibt sich für die einzelnen Probenahme positionen die folgende Liste an Probenmaterialien (nähere Beschreibung siehe Kapitel 3.2.3).



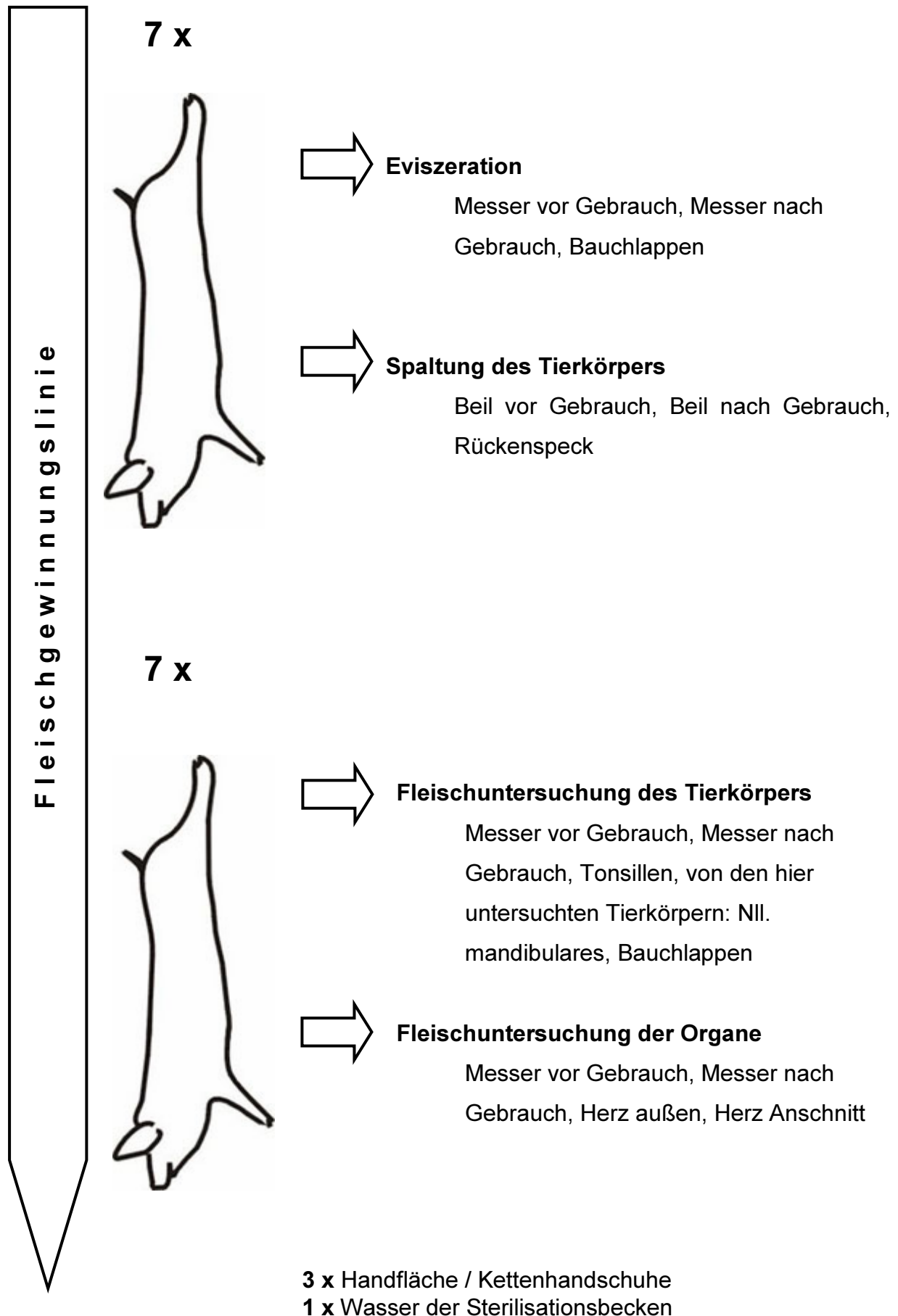
- Eviszeration  
Messer vor Gebrauch, Messer nach Gebrauch, Bauchlappen
- Spaltung des Tierkörpers  
Beil vor Gebrauch, Beil nach Gebrauch, Rückenspeck
- Fleischuntersuchung des Tierkörpers  
Messer vor Gebrauch, Messer nach Gebrauch, Tonsillen, Nll. mandibulares, Bauchlappen
- Fleischuntersuchung der Organe  
Messer vor Gebrauch, Messer nach Gebrauch, Außen, Herz Anschnitt

Zusätzlich wurde an den Positionen Eviszeration, Fleischuntersuchung des Tierkörpers und Fleischuntersuchung der Organe jeweils zu Beginn des Untersuchungstages, vor dem vierten Probendurchgang und nach Beendigung der Probenahme die nicht Gerät führende Hand des Personals beprobt, die an den Positionen der Fleischuntersuchung mit einem Kettenhandschuh geschützt war. An jedem der Probenahmetage wurde an diesen Positionen zudem einmal Wasser aus den Sterilisationsbecken gewonnen.

Die Bandgeschwindigkeit in der Fleischgewinnungslinie machte es möglich, bei der Beprobung einen Tierkörper über zwei Probenahmepositionen hinweg zu verfolgen. Demnach können bei jedem der sieben Probenahme-Abfolgen die Proben an den Positionen der Eviszeration und der Spaltung *einem* Tierkörper zugeordnet werden. Ebenso stammen die Proben von den Positionen der Fleischuntersuchung des Tierkörpers und der Organe von *einem* Tierkörper. Je Probenahmetag wurden also 14 Tierkörper bzw. deren unmittelbares Umfeld über einen bestimmten Ablauf der Fleischgewinnungslinie beprobt (s. Abb. 3.1 und Tab. 3.4).

Abbildung 3.1 zeigt eine schematische Darstellung der Probenahme an einem Probenahmetag.

Abbildung 3.1: Schematische Darstellung des Probenahmedesigns



Die Anzahl der Proben an den jeweiligen Probenahmetagen sowie die Gesamtprobenzahl sind der Tabelle 3.3 zu entnehmen. Aus der Tabelle geht auch hervor, ob es sich jeweils um eine destruktive Probenahme oder eine Oberflächenbeprobung mittels Tupfer gehandelt hat (genaue Vorgehensweise: Kapitel 3.2.3).

Tabelle 3.3: Probenanzahl und Probenahmetechnik

		Zahl der Probenahmetage <sup>1</sup>	Zahl/ Probenahmetag <sup>2</sup>	Anzahl [n] gesamt	Destruktion	Tupfer	
	Eviszeration	Wasser Steribecken	14	1	14	x	
		Handfläche	14	3	42		x
		Messer vor Gebrauch	14	7	98		x
		Messer nach Gebrauch	14	7	98		x
		Bauchlappen	14	7	98	x	
	Spaltung	Spaltbeil vor Gebrauch	14	7	98		x
		Spaltbeil nach Gebrauch	14	7	98		x
		Rückenspeck	14	7	98	x	
	Fleischuntersuchung	FIU Tierkörper	Wasser Steribecken	14	1	14	x
Kettenhandschuh			14	3	42		x
Messer vor Gebrauch			14	7	98		x
Messer nach Gebrauch			14	7	98		x
Tonsillen			14	7	98	x	
Nil.mandibulares			14	7	98	x	
Bauchlappen			14	7	98	x	
FIU Organe		Wasser Steribecken	14	1	14	x	
		Kettenhandschuhe	14	3	42		x
		Messer vor Gebrauch	14	7	98		x
		Messer nach Gebrauch	14	7	98		x
		Herz Außen	14	7	98	x	
		Herz Anschnitt	14	7	98		x
<b>Gesamtprobenzahl</b>				1.638	588	1.008	

<sup>1</sup> Zahl der Probenahmetage, an denen die betreffenden Proben genommen wurden.

<sup>2</sup> Anzahl der Proben, die jeweils an einem Probenahmetag gewonnen wurden = Probendurchgang  
Steribecken = Sterilisationsbecken, FIU = Fleischuntersuchung

Es wurde ein Kennzeichnungssystem aus Farben, Buchstaben und Ziffern erarbeitet, welches eine eindeutige Kennzeichnung der Proben am Ort der Entnahme ebenso sicherte, wie die Zuordnung zu den Positionen und Durchgängen. Zudem war so im

Labor eine schnelle Zuteilung der Proben an die jeweils für die Aufbereitung verantwortlichen Personen möglich, da die Probennummern an allen Probenahmetagen nach dem gleichen Schema verteilt wurden, und auch die laborinternen Arbeitsgruppen immer für die Aufbereitung der Proben desselben Ziffernkreises gleichbleibend verantwortlich waren.

In Tabelle 3.4 ist dargestellt, wie sich die Probennummern an einem Probenahmetag einzelnen Positionen bzw. Probenmaterialien und den beprobten Tierkörpern zuordnen.

Die Lagerung der Proben während der Probenahmen und der (unverzögliche) Transport erfolgten in Kühlboxen mit Kühlelementen. Die Zeitspanne zwischen der Entnahme der Probe und dem Beginn ihrer Aufbereitung hat in keinem Falle einen Zeitraum von 3 - 4 Stunden überschritten.

Tabelle 3.4: Verteilung der Probennummern je Probenahmetag; Probennummern je untersuchtem Tierkörper

	Eviszeration			Spaltung			FIU Tierkörper					FIU Organe			
	Messer v.G	Messer n.G	Bauchlappen	Beil v.G	Beil n.G	Rücken-speck	Messer v.G	Messer n.G	Bauchlappen	Tonsille	Lymphknoten	Messer v.G	Messer n.G	Herz Anschnitt	Herz Außen
<b>Tier 1</b>	1	2	46	69	70	83	3	4	47	104	111	5	6	90	91
<b>Tier 3</b>	7	8	48	71	72	84	9	10	49	105	112	11	12	92	93
<b>Tier 5</b>	13	14	50	73	74	85	15	16	51	106	113	17	18	94	95
<b>Tier 7</b>	19	20	52	75	76	86	21	22	53	107	114	23	24	96	97
<b>Tier 9</b>	25	26	54	77	78	87	27	28	55	108	115	29	30	98	99
<b>Tier 11</b>	31	32	56	79	80	88	33	34	57	109	116	35	36	100	101
<b>Tier 13</b>	37	38	58	81	82	89	39	40	59	110	117	41	42	102	103
	<b>Sterilisationsbecken: 43</b>						<b>Sterilisationsbecken: 44</b>					<b>Sterilisationsbecken: 45</b>			
	<b>Handfläche : 60, 63, 66</b>						<b>Kettenhandschuh: 61, 64, 67</b>					<b>Kettenhandschuh: 62, 65, 68</b>			

FIU = Fleischuntersuchung; v.G. = vor Gebrauch; n.G. = nach Gebrauch

### **3.2.3 Gewinnung der Proben von den Geräteoberflächen (Tupferproben)**

Die auf der reinen Seite der Schlachtlinie verwendeten Messer und das jeweils eingesetzte Handbeil wurden mittels bereitgelegter Tupfer beprobt. Die Vorbereitung der Tupfer erfolgte wie in Kapitel 7.1 beschrieben.

#### **Messer: Probenahme und Darstellung der Messerflächen**

Die Probenahme bei den Messern erfolgte an den in 3.2.2 aufgeführten Positionen jeweils unmittelbar nachdem die Messer den Sterilisationsbecken entnommen worden waren (noch vor erneuter Nutzung; Bezeichnung: „vor Gebrauch“) und unmittelbar nach ihrem Gebrauch (noch von erneuter Sterilisation; Bezeichnung: „nach Gebrauch“). Die Messer wurden dabei jeweils von der Geräte führenden Person mit einer Seite am angebotenen Tupfern abgestreift. Sofort im Anschluss wurde der Tupfer ohne weitere Berührung in einen sterilen und eindeutig gekennzeichneten Stomacherbeutel verbracht und darin bis zur Aufbereitung der Proben aufbewahrt.

Am Ende des Untersuchungstages wurden an den Positionen *Eviszeration der Bauchhöhle*, *Fleischuntersuchung Tierkörper* und *Fleischuntersuchung Organe* die Umrisse der dort verwendeten Messer festgehalten und gekennzeichnet. Die Flächengrößen wurden errechnet und daraus für jede der Probenpositionen eine durchschnittliche Messerfläche ermittelt. Die Daten wurden an jedem der 14 Probenahmetage erhoben. Da jede Position über zwei Messer verfügte, ergaben sich je Position und Probenahmetag zwei Einzelwerte. Innerhalb einer Position wurde jeweils der Mittelwert aller Einzelwerte aus allen Probenahmetagen gebildet. Aus den Mittelwerten der Positionen *Fleischuntersuchung Organe* und *Fleischuntersuchung Tierkörper* wurde ein gemeinsamer Mittelwert für die Messerflächen an der Position *Fleischuntersuchung* gebildet. Dieser Mittelwert dient als Bezugsgröße für die Berechnung des Keimgehaltes auf den Messern an der jeweiligen Position.

#### **Handbeile**

Die Probenahme von den Handbeilen bei der Tierkörperspaltung erfolgte jeweils unmittelbar nachdem das Handbeil dem Sterilisationsbecken entnommen worden war (noch vor erneuter Nutzung; Bezeichnung: „vor Gebrauch“) und unmittelbar nach

seinem Gebrauch (noch von erneuter Sterilisation; Bezeichnung: „nach Gebrauch“). Die Handbeile wurden dabei jeweils von der Geräte führenden Person mit einer Seite über die gesamte Schneidenlänge an den angebotenen Tupfern abgestreift. Sofort im Anschluss wurde der Tupfer ohne weitere Berührung in einen sterilen und eindeutig gekennzeichneten Stomacherbeutel verbracht und darin bis zur Aufbereitung der Proben aufbewahrt.

### **Kettenhandschuhe/Handfläche**

Die nicht Gerät führende Hand des Personals wurde jeweils zu Beginn eines Untersuchungstages, nach Probendurchgang 4 sowie nach Beendigung der übrigen Probenahmen an den Arbeitspositionen „*Eviszeration (der Bauchhöhle)*“, „*Fleischuntersuchung Organe*“ und „*Fleischuntersuchung Tierkörper*“ beprobt. Die Probenahme erfolgte durch Tupfer. Dabei haben die Arbeitskräfte die dargebotenen Tupfer in der Hand gründlich gewalkt, wobei auf eine größtmögliche Berührungsfläche geachtet wurde. Unmittelbar im Anschluss wurde der Tupfer ohne weitere Berührung in einen sterilen und eindeutig gekennzeichneten Stomacherbeutel gegeben und darin bis zur Aufbereitung der Proben aufbewahrt.

Bei den Teilschritten der *Fleischuntersuchung* waren die beprobten Hände durch Schnittschutz-Kettenhandschuhe mit untergezogenem Kunststoffhandschuh geschützt. Die Hände des Personals an der Position *Eviszeration der Bauchhöhle* waren ungeschützt.

## **3.2.4 Gewinnung der Proben von Geweben und von Wasserproben**

### **Gewinnung der Wasserproben aus dem Sterilisationsbecken**

Wasserproben aus den Sterilisationsbecken wurden an jedem Probenahmetag jeweils nach dem vierten Probendurchgang an den Positionen *Eviszeration der Bauchhöhle*, *Fleischuntersuchung Tierkörper* und *Fleischuntersuchung Organe* mittels steriler Einwegspritzen entnommen. Die Einwegspritzen wurden verschlossen sowie eindeutig gekennzeichnet und bis zur Aufbereitung in einem sterilen Stomacherbeutel aufbewahrt.

Jeweils am Ende des Probenahmetages wurden an den Positionen *Eviszeration Bauchhöhle*, *Fleischuntersuchung Tierkörper* und *Fleischuntersuchung Organe* die

Wassertemperaturen mit Hilfe eines digitalen Thermometers mit Einstechfühler gemessen und dokumentiert.

### **Gewinnung der Gewebeproben**

Die Gewinnung der Organproben erfolgte destruktiv, d.h. die Organe bzw. Tierkörperteile wurden mit sterilen Werkzeugen von den Tierkörpern entnommen.

Eine Probe vom Bauchlappen der Schlachttierkörper wurde sowohl im Arbeitsabschnitt der *Eviszeration* gewonnen als auch bei der Position *Fleischuntersuchung Tierkörper*. Mittels einer sterilen Pinzette und eines sterilen Messers wurde hierbei von der Schnittkante der eröffneten Bauchdecke ein etwa 3 cm breiter und 20 cm langer Streifen entfernt. Der Bauchlappen wurde ohne weitere Berührung in einen sterilen und gekennzeichneten Stomacherbeutel verbracht und darin bis zur Aufbereitung aufbewahrt.

Nach der Spaltung der Tiere wurde an der Schnittkante in Höhe der Lendenwirbelsäule mittels einer sterilen Pinzette und eines sterilen Messers ein etwa 3 cm breiter und 20 cm langer Streifen des Rückenspecks (einschließlich Haut, Unterhaut und Muskulaturbereich) entfernt. Die Probe wurde ohne weitere Berührung in einen sterilen und eindeutig gekennzeichneten Stomacherbeutel gegeben und darin bis zur Aufbereitung der Proben aufbewahrt.

Die Tonsillen wurden im Zuge der amtlichen Fleischuntersuchung durch das Untersuchungspersonal entfernt. Die untersuchende Person gab die jeweils entfernten Tonsillen in einen dargebotenen, gekennzeichneten Stomacherbeutel, in dem die Probe bis zur Aufbereitung verblieb.

Der im Rahmen der amtlichen Fleischuntersuchung angeschnittene Mandibularlymphknoten (Nll. mandibulares) wurde mit Hilfe einer sterilen Pinzette und eines sterilen Messers abgetrennt und in einen gekennzeichneten Stomacherbeutel gegeben, in dem die Probe bis zur Aufbereitung verwahrt wurde.

Das Herz wurde im Anschluss an die Untersuchung vollständig mit einem sterilen Stomacherbeutel umhüllt und dann mit einem sterilen Messer vom Geschlinge abgetrennt, so dass das Organ in Gänze und ohne berührt zu werden in den Beutel



gleiten konnte. Bis zur Aufbereitung der Probe verblieb das gesamte Herz in dem Stomacherbeutel.

Für die weitere Aufbereitung der Probe wurde der Bereich des Anschnitts steril entnommen und separat in den Untersuchungsgang eingeführt. So entstanden je entnommenem Herzen die Proben „Herz Außen“ und „Herz Anschnitt“.

### **3.2.5 Mikrobiologische Untersuchungen**

Gegenstand der mikrobiologischen Untersuchungen der gewonnenen Proben war die Bestimmung der aeroben Gesamtkeimzahl, die quantitative Erfassung der Enterobacteriaceae sowie die qualitative Untersuchung auf *Salmonella*.

Die Vorbereitung der Proben (Vorzerkleinern und Durchmischen) sowie das Herstellen der Erstverdünnung mit NaCl-Pepton erfolgte nach der amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §35 LMBG (L 06.00-16).

Die Tupfer aus der Beprobung der Geräteoberflächen wurden zur Herstellung der Erstverdünnung (Verdünnungsstufe  $10^0$ ) in 100 ml NaCl-Pepton dispergiert.

Das Wasser der Sterilisationsbecken sowie das Brühwasser galten ohne weitere Verdünnung jeweils als Erstverdünnung (Verdünnungsstufe  $10^0$ ).

Die Gewebeteile wurden eingewogen und mit der 9-fachen Menge (Verhältnis 1:10) an NaCl-Pepton homogenisiert.

Dem Herzen wurde zuvor die Region um den Anschnitt während der Fleischuntersuchung steril entnommen und damit („Herz Anschnitt“) entsprechend verfahren. Der Stomacherbeutel mit dem gesamten Restherz wurde mit 100 ml NaCl-Pepton aufgefüllt, was ebenfalls der Erstverdünnung entsprach.

Falls Untersuchungsmaterial wegen größerer Ausgangsmengen im Verhältnis 1:5 eingewogen wurde, ist dies bei der Berechnung der Gesamtkeimzahl berücksichtigt.

Der Tabelle 3.5 ist eine Zuordnung der Proben zu den jeweiligen Untersuchungszielen zu entnehmen.

Tabelle 3.5: Mikrobiologische Parameter

		aerobe GKZ	Enterobacteriaceae	Salmonella		
Fleischuntersuchung (FIU)	Eviszeration	Wasser Steribecken	x	x	x	
		Handfläche		x	x	
		Messer vor Gebrauch	x	x	x	
		Messer nach Gebrauch	x	x	x	
		Bauchlappen			x	
	Spaltung	Spaltbeil vor Gebrauch	x	x	x	
		Spaltbeil nach Gebrauch	x	x	x	
		Rückenspeck			x	
	Fleischuntersuchung (FIU)	FIU Tierkörper	Wasser Steribecken	x	x	x
			Kettenhandschuh		x	x
Messer vor Gebrauch			x	x	x	
Messer nach Gebrauch			x	x	x	
Tonsillen					x	
Nll.mandibulares					x	
Bauchlappen					x	
FIU Organe		Wasser Steribecken	x	x	x	
		Kettenhandschuhe		x	x	
		Messer vor Gebrauch	x	x	x	
		Messer nach Gebrauch	x	x	x	
		Herz Außen			x	
		Herz Anschnitt			x	

GKZ = Gesamtkeimzahl; Steribecken = Sterilisationsbecken

### 3.2.5.1 Bezugsgrößen

Die jeweilige Bezugsgröße der quantitativen Ergebnisse (aerobe Gesamtkeimzahl und Enterobacteriaceae) war in den hier beschriebenen Versuchen von Probenmaterial zu Probenmaterial unterschiedlich:

Messer: Bei den untersuchten Messern bezieht sich die ermittelte Gesamtkeimzahl auf 1 cm<sup>2</sup> der Messerschneidefläche. Dazu wurde die ermittelte Keimzahl pro ml zunächst mit dem Faktor 100 multipliziert (um auf die gesamte gewonnene Keimmenge in der Flüssigkeit hoch zu rechnen) und die errechnete Gesamtkeimzahl durch die Durchschnittsfläche der Messer an der betreffenden Position dividiert.

Die Durchschnittsfläche an der Position Eviszeration betrug 25,27 cm<sup>2</sup> und an den Positionen Fleischuntersuchung (der Organe und der Tierkörper) 26,94 cm<sup>2</sup>.

Handbeile: Auch die auf den Handbeilen ermittelten Keimzahlen beziehen sich auf 1 cm<sup>2</sup> der Schneideflächen und wurden zunächst mit dem Faktor 100 multipliziert. Dieses Zwischenergebnis wurde anschließend durch die durchschnittliche Größe der beprobten Beilschneidefläche dividiert. Die durchschnittliche Beilschneidefläche errechnete sich aus der Schneidenlänge des Beils von 35 cm, über die je zwei cm der Klingenhöhe mit den Tupfern in Berührung gekommen sind.

Kettenhandschuhe/Hände: Die im Tupfer enthaltenen Keime wurden zur Probenaufbereitung in 100 ml Verdünnungsflüssigkeit dispergiert, was der Verdünnungsstufe 10<sup>0</sup> entspricht. Als Bezugsgröße dient hier also 1 ml Dispergierflüssigkeit.

Sterilisationsbecken: Die Angabe des Keimgehaltes erfolgt hier in Bezug auf 1 ml.

Bei den untersuchten Organen und Tierkörperteilen (Bauchlappen, Rückenspeck, Tonsillen, Mandibularlymphknoten, Herz Außen und Anschnitt) wurde keine quantitative Untersuchung durchgeführt.

### 3.2.5.2 Ermittlung der aeroben Gesamtkeimzahl

Die quantitative Erfassung der aeroben Keimzahl erfolgte gemäß der amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §35 LMBG (L06.00-18) auf Caseinpepton-Glucose-Hefeextrakt-Agar im Plattengussverfahren.

Dazu wurde zunächst aus jeder Erstverdünnung eine Reihe von Dezimalverdünnungen entsprechend der amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §35 LMBG (L 06.00-16) angelegt bis zu der Verdünnungsstufe  $10^{-10}$ .

Zur Bestimmung der aeroben Gesamtkeimzahl im **Plattengussverfahren** nach der amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §35 LMBG (L 06.00-18) wurde aus jeder der angelegten Verdünnungsstufen jeweils im Doppelansatz 1 ml Flüssigkeit in sterile, leere Petrischalen vorgelegt und mit jeweils 15-20 ml flüssigem Agar (ca. 45°C) übergossen. Es folgte eine gründliche Durchmischung der Flüssigkeiten durch horizontales Bewegen und Kreisen der Petrischale.

Die mit dem Probenmaterial versehenen Platten wurden bei einer Temperatur von 30°C über 72 Stunden bebrütet und anschließend ausgewertet.

Die **Auswertung** der Platten erfolgte gemäß den Vorgaben der amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §35 LMBG (L 06.00-18). Dabei wurden die beiden Platten benachbarter Verdünnungsstufen herangezogen, die mit 1-300 Koloniebildenden Einheiten (KbE) gleichmäßig bewachsen waren. Die beiden Platten einer der beiden Verdünnungsstufen sollten 30-300 KbE aufweisen.

Es kamen je Probe vier Platten zu Auswertung. Zur höheren Verdünnungsstufe hin sollte ein kontinuierlicher Abfall (log 10) des Bewuchses zu erkennen sein. Beachtet wurde auch die vergleichbare Keimzahl auf den parallelen Platten.

Die Dokumentation der Ergebnisse erfolgte auf einheitlichen Formblättern, die dem Anhang (Kapitel 7.4) zu entnehmen sind.

Der **Berechnung** des gewichteten Mittelwertes lag folgende Gleichung zugrunde:

$$C = \frac{\sum c}{n_1 * x 1 + n_2 * x 0,1}$$

wobei c : gewichteter Mittelwert der Koloniezahlen

$\Sigma c$  : Summe der Kolonien aller Platten beider Verdünnungsstufen,  
die zur Berechnung herangezogen werden (niedrigste und  
nächst höhere auswertbare Verdünnungsstufe)

$n_1$  : Anzahl der ausgewerteten Platten der niedrigeren Verdünnungsstufe

$n_2$  : Anzahl der ausgewerteten Platten der höheren Verdünnungsstufe

Die errechneten Werte beziehen sich auf die niedrigere der ausgewerteten Verdünnungsstufen.

Die Keimzahl pro g oder ml ergab sich durch die Multiplikation des gewichteten Mittelwertes mit dem reziproken Wert der zu Grunde liegenden Verdünnungsstufe. Die Angabe erfolgte als 10er Potenz mit je einer Dezimalstelle vor und nach dem Komma. Die Daten wurden anschließend logarithmiert.

Die untere Nachweisgrenze im Plattengussverfahren liegt für unverdünnte homogenisierte Proben bei  $1,0 \times 10^0$  KbE/ml und für verdünnte homogenisierte Proben bei  $1,0 \times 10^1$  KbE/ml.

### 3.2.5.3 Untersuchung auf Enterobacteriaceae

Die Bestimmung des Gehaltes an Enterobacteriaceae erfolgte im **Spatelverfahren** nach den Vorgaben des internen Laborbuches.

Zur Aufbereitung der Proben wurde zunächst aus jeder Erstverdünnung eine Reihe von Dezimalverdünnungen bis zu der Verdünnungsstufe  $10^{-10}$  entsprechend der amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §35 LMBG (L 06.00-16) angelegt.

Die Bestimmung der Anzahl an Enterobacteriaceae erfolgte jeweils im Plattendoppelansatz auf VRBD-Agar nach MOSSEL. Hierzu wurden aus jeder der angelegten Verdünnungsstufen je 0,1 ml Flüssigkeit auf die Mitte einer Agarplatte gegeben und im Anschluss mittels eines sterilen Drigalsky-Spatels gleichmäßig verteilt.

Die Bebrütung der beimpften Nährböden erfolgte über 48 Stunden bei 37°C. Die Ergebnisse der Auswertung wurden auf einheitlichen Vorlagen dokumentiert, die im Anhang (Kapitel 7.4) dargestellt sind.

Um bei einer quantitativen **Auswertung** der Agarplatten zu gewährleisten, dass ausschließlich Enterobacteriaceae erfasst wurden, mussten Kolonien biochemisch als den Enterobacteriaceae zugehörig bestätigt werden, auch wenn deren Wachstum auf VRBD-Agar nach MOSSEL Enterobacteriaceae-typisch bzw. -verdächtig war.

Hierzu wurden morphologisch verdächtige Kolonien zunächst auf Standard-I-Nähragar überimpft und 24 Stunden bei 37°C bebrütet, um eine Reinkultur anzuzüchten.

Zur *mikroskopischen Bestätigung* der verdächtigen Keime wurde aus der Reinkultur ein Präparat angefertigt, wobei soviel Koloniematerial in einem Tropfen steriler Kochsalzlösung auf einem fettfreien und sauberen Glasobjektträger ausgestrichen wurde, dass eine leichte Trübung auftrat. Nach Lufttrocknung wurde das Präparat durch dreimaliges Führen durch eine Flamme hitzefixiert. Die Färbung des Präparates erfolgte nach GRAM.

Zur *biochemischen Bestätigung* verdächtiger koloniebildender Einheiten wurden aus der Reinkultur der Nachweis der Cytochromoxidase geführt und die Fähigkeit zum Nitratabbau in der Nitrat-Bouillon sowie zur oxidativen bzw. fermentativen Verwertung von Glucose im OF-Medium nach HUGH und LEIFFSON (Merck 10282) überprüft.

Verdächtige koloniebildende Einheiten vom VRBD-Agar nach MOSSEL waren dann als Enterobacteriaceae bestätigt, wenn die Mikroorganismen im Rahmen der mikroskopischen und biochemischen Bestätigungsreaktionen nach dem in Tabelle 3.6 aufgeführten Schema reagierten.

Tabelle 3.6: Reaktionsschema der Enterobacteriaceae

	Färbung nach Gram	Oxidase	Nitratabbau	Oxidative und fermentative Verwertung von Glucose
<b>Enterobacteriaceae</b>	gramnegativ (rot)	negativ	positiv	(positiv / positiv)

Die **Berechnung** des gewichteten Mittelwerts der so bestätigten Enterobacteriaceae erfolgte nach derselben Formel wie die Berechnung der aeroben Gesamtkeimzahl. Die Keimzahl pro g oder ml ergibt sich beim Spatelverfahren durch die Multiplikation des gewichteten Mittelwertes mit dem reziproken Wert der zu Grunde liegenden Verdünnungsstufe +1. So wurde berücksichtigt, dass beim Spatelverfahren mit 0,1 ml nur 1/10 der beim Plattengussverfahren eingesetzten Probenmenge (1ml) verwendet wird.

Die untere Nachweisgrenze beim Oberflächenspatelverfahren liegt bei weniger als  $1,0 \times 10^2$  KbE/ml, woraus sich in der Auswertung folgender Sonderfall ergibt:

	Platte 1	Platte 2
Verdünnungsstufe $10^0$	0	1

Bei einem solchen Ergebnis ist zwar die untere Nachweisgrenze der eingesetzten Methode unterschritten ( $0,5 \times 10^1 = 5,0 \times 10^0$ ), aber die Anwesenheit von Enterobacteriaceae in der Probe trotzdem gegeben. In diesem Falle wurde auf eine Angabe der Anzahl von Enterobacteriaceae verzichtet, eine qualitative Aussage jedoch vorgenommen.

Die entsprechende Vorlage zur Dokumentation der Anwesenheit von Enterobacteriaceae ist dem Anhang (Kapitel 7.4) zu entnehmen.

### **3.2.5.4 Untersuchung auf *Salmonella***

Der Nachweis von *Salmonella* erfolgte nach dem in der amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §35 LMBG (L 00.00-20) beschriebenen Verfahren. Eine schematische Darstellung des Untersuchungsganges ist dem Anhang zu entnehmen.

#### **Voranreicherung**

Zur erforderlichen Voranreicherung wurden die Proben im Verhältnis 1:10 in sterilem NaCl-Pepton homogenisiert bzw. in 100 ml NaCl-Pepton dispergiert. Es folgte eine Bebrütung bei 37°C über 16-20 Stunden.

#### **Hauptanreicherung und Isolierung**

Zur Hauptanreicherung der Proben wurde *Salmonella*-Anreicherungsbouillon nach RAPPAPORT (Merck Art. Nr. 10236) und TBG- (Tetrathionat-Brilliantgrün-Galle-Anreicherungs-) Bouillon (Merck Art. Nr. 5172) verwendet.

9,9 ml der *Salmonella*-Anreicherungsbouillon nach RAPPAPORT wurden mit 0,1 ml des zuvor bebrüteten sowie gründlich geschüttelten Voranreicherungsmediums beimpft. 90 ml der TBG-Bouillon wurden mit 10 ml des Voranreicherungsmediums versetzt.

Die *Salmonella*-Anreicherungsbouillon nach RAPPAPORT wurde bei 42°C bebrütet, die TBG-Bouillon bei 37°C.

Zur *Isolierung* von *Salmonella* wurden aus jedem der Hauptanreicherungsmedien sowohl BPLS-Agar (Merck Art. Nr. 7237) als auch MLCB-Agar (Oxoid CM 783) (Selektivmedien für *Salmonella*) im fraktionierten (Drei-Ösen-) Ausstrich beimpft. Dieser Selektionsschritt erfolgte nach 24stündiger und nach 48stündiger Bebrütung der Hauptanreicherungsmedien. Die Bebrütung der beimpften Selektivmedien erfolgte jeweils für 24h bei 37°C.

Beginnend mit dem sechsten Probenahmetag wurde Diasalm nach VAN NETTEN und VAN DER ZEE (Merck Art. Nr. 9803) als zusätzliches Medium zur Identifizierung von *Salmonella* verwendet. Hierbei wurde der Nährboden direkt aus dem Voranreicherungsmedium beimpft und nach 24 Stunden Bebrütung bei 43°C



ausgewertet. Verdächtige Kolonien wurden im Anschluss auf BPLS- und MLCB-Nährmedien überimpft und parallel zu den übrigen verdächtigen Kolonien weiter differenziert.

### Biochemische Differenzierung

Zur Anzüchtung einer Reinkultur wurden zunächst von allen Selektivmedien die nach abgeschlossener Bebrütung morphologisch verdächtigen Kolonien auf Standard-I-Nährboden überimpft und 24h bei 37°C bebrütet.

Morphologisch *Salmonella* spp. verdächtige Kolonien wurden einer kleinen Reihe von Tests zur biochemischen Identifizierung von *Salmonella* unterzogen (Tabelle 3.7). Die Vorlage zur Dokumentation der Ergebnisse findet sich im Anhang in Kapitel 7.4.

Tabelle 3.7: Verhalten von *Salmonella* in ausgewählten biochemischen Tests (Kleine biochemische Reihe)

Parameter	verwendetes Medium	<i>Salmonella</i> spp. -typische Reaktionen
Acetoinbildung (Voges-Proskauer-Reaktion)	MRVP-Bouillon	22°C: negativ 37°C: negativ
Beweglichkeit	SIM-Agar	positiv
Gasbildung	TSI-Agar	positiv
Glucosevergärung	TSI-Agar, Hochschicht	positiv
H <sub>2</sub> S-Bildung	TSI-Agar, SIM-Agar	positiv
Indolbildung	SIM-Agar	negativ
Lactose- Saccharosevergärung	TSI-Agar, Schrägfläche	negativ
Lysin-Decarboxylase- Nachweis	Lysin-Agar	Hochschicht: positiv Schrägfläche: positiv
Methylrot-Test (Dextrose-Verwertung mit starker Säurebildung)	MRVP-Bouillon	positiv
Urease-Nachweis	Harnstoff-Bouillon	negativ

Mikroorganismen, die sich sowohl in der kleinen biochemischen Reihe *Salmonella*-verdächtig zeigten als auch in der Agglutination mit omni- und polyvalentem Serum positiv reagierten, wurden weiterführenden biochemischen Tests (Große biochemische Reihe zur Identifizierung von *Salmonella*) unterzogen (Tabelle 3.8). Die Vorlage zur Dokumentation der Ergebnisse findet sich in Kapitel 7.4.

Tabelle 3.8. Verhalten von *Salmonella* spp. in ausgewählten biochemischen Tests (große biochemische Reihe)

Parameter	verwendetes Medium	<i>Salmonella</i> spp. -typische Reaktionen
Äsculin-Abbau	Äsculin-Bouillon	negativ
Arginin Abbau	Arginin-Bouillon nach SCHUBERT	positiv / negativ
β-Galaktosidase-Aktivität	ONPG-Scheiben	positiv / negativ
Citrat-Verwertung	SIMMONS-Citrat-Agar	positiv
Kohlenhydratspaltung: Adonit, L(+)-Arabinose, Dulcit, myo-Inosit, D(-)-Mannit, Raffinose-Pentahydrat, L(+)-Rhamnose-Monohydrat, Salicin, D(-)-Sorbit	Phenolrot- Bouillon (Basis) mit Zusatz verschiedener Kohlenhydrate	Adonit: negativ L(+)-Arabinose: positiv Dulcit: positiv / negativ myo-Inosit: positiv / negativ D(-)-Mannit: positiv Raffinose-Pentahydrat: negativ L(+)-Rhamnose-Monohydrat: positiv Salicin: negativ D(-)-Sorbit: positiv
Malonat-Verwertung	Malonat-Phenylalanin-Bouillon nach SHAW UND CLARK	positiv / negativ
Methylrot-Test (Dextrose-Verwertung mit starker Säurebildung)	MRVP-Bouillon	positiv
Ornithin-Decarboxylase	OF-(Oxidation-Fermentation) Testnährboden nach HUGH und LEIFFSON mit Ornithin	positiv / negativ
Phenylalanin-Desaminase-Nachweis	Malonat-Phenylalanin-Bouillon nach SHAW UND CLARK	negativ

### Serologische Differenzierung

Bei der serologischen Differenzierung erfolgte die Bestätigung von Keimen, die sich in der kleinen biochemischen Reihe als *Salmonella*-verdächtig gezeigt hatten, mit omni- und polyvalenten Seren.

Die serologische Bestimmung der *Salmonella*-Antigene und damit die endgültige Bestätigung und Einteilung in weitere Untergruppen/Serotypen erfolgte bei Keimen, die auch in der großen biochemischen Reihe *Salmonella* verdächtig waren.

Die letztendlich vollständige serologische Differenzierung erfolgte durch das Nationale veterinärmedizinische Referenzlabor für Salmonellen des Bundesinstituts für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV) in Berlin.

### **Resistenzbestimmung**

Die Bestimmung der Antibiotikaresistenzen wurde im Zuge der serologischen Charakterisierung im Nationalen veterinärmedizinischen Referenzlabor für Salmonellen des damaligen Bundesinstituts für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV) in Berlin durchgeführt. Die im Rahmen der Resistenzbestimmung getesteten Antibiotika sind in Kapitel 2.4.1 und in Tabelle 2.13 aufgeführt.

### **Phagentypisierung**

Die Phagentypisierung als weitere Methode zur Ermittlung und Beschreibung des phänotypischen Erscheinungsbildes von Mikroorganismen wurde ebenfalls im Nationalen veterinärmedizinischen Referenzlabor für Salmonellen des damaligen Bundesinstituts für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV) in Berlin durchgeführt.

### **Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE)**

Die genotypische Charakterisierung der *Salmonella*-positiven Isolate erfolgte nach MASLOW et al. (1993) unter Berücksichtigung der Vorgaben nach MATUSHEK et al. (1996) zu einem verkürzten Vorgehen mit den Makrorestriktionsenzymen XbaI, BlnI und SpeI der Firma Roche Diagnostics GmbH, Mannheim im Labor des Instituts für Fleischhygiene und -technologie der Freien Universität Berlin. Bis zur dieser molekularbiologischen Untersuchung, die zwischen Juli 2001 und Mai 2003 stattfand, wurden die Isolate mittels Micobank™ (Prolab Inc., Ontario, Canada, Prod. No. PL 160) bei -20°C gelagert.

XbaI erkennt in der *Salmonella*-DNA die Sequenz T/CTAGA und schneidet den DNA-Strang an der durch den Schrägstrich bezeichneten Stelle zwischen Thymin und Cytosin. BlnI schneidet entsprechend die Sequenz C/CTAGG, und SpeI erkennt die Sequenz A/CTAGT (ROCHE 1999).

Die Zusammensetzungen der Lösungen und Puffer, die bei der PFGE verwendet wurden, sind der Tabelle 3.9 zu entnehmen. Hieraus erklären sich auch die Abkürzungen, die bei der Beschreibung der Durchführung der PFGE Verwendung

finden. Weitere Chemikalien und Reagenzien, die bei der Durchführung der PFGE verwendet wurden, sind in Kapitel 8.3.3 aufgeführt.

Tabelle 3.9: Zusammensetzungen der bei der PFGE verwendeten Lösungen und Puffer

Lösung/Puffer	Verwendungsschritt	Zusammensetzung
PIV – Lösung <sup>1</sup>	Zell-Lysis	10 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, pH 8,0
Lysis – Lösung	Zell-Lysis	6 mM Tris-HCl, 100 mM EDTA (Titriplex II), pH 7.6, 1 M NaCl, 0.5% Brij 58, 0.2% Na-Desoxycholat, 0.5% Na-Laurylsarkosin, 60 µg RNase / ml, 1 mg Lysozym / ml (ggf. speziesspezifisches Lysisenzym)
ES – Puffer	Deproteinisierung	0,5 M EDTA (Na-frei, Titriplex II), 1 % Na-laurylsarkosin, pH 9,0
ESP – Lösung	Deproteinisierung	ES-Puffer (s. o.) + Proteinase K (1 mg/ml)
TE – Puffer	Waschen der Blöckchen	10 mM Tris-HCl, 1 mM Na <sub>2</sub> -EDTA (Titriplex III), pH 7,5
TBE – Puffer	Gelherstellung	0.9 M Tris + 0.9 M Borat + 4 mM Na <sub>2</sub> -EDTA (Titriplex III), pH 8,5

<sup>1</sup>Hier ist die Bezeichnung der Lösung eigenständig und erklärt sich nicht aus der Zusammensetzung

Zur *Aufbereitung der DNA* wurden die Zellen aus einer 24h-Kultur in 1,2%ige **Low-Melting-Point (LMP)-Agarose** (Fa. *AMRESCO, Solon/Ohio*) eingebettet und für 18-24 Stunden mit Lysislösung bei 37°C lysiert.

Zur Deproteinisierung wurden die DNA-haltigen, in ES-Lösung gewaschenen Agaroseblöcke mit ESP-Lösung (enthält 1 mg/ml Proteinase K) versehen und bei 50°C für mindestens 17 Stunden inkubiert. Das gründliche Waschen der Blöcke erfolgte in TE-Puffer.

Zur *Restriktion* der aufgereinigten DNA wurden Teile (ca. 4-5 x 10 mm) der Agaroseblöcke jeweils mit den entsprechenden Mengen der verwendeten Enzyme versetzt (XbaI: 60 U/ Probe, BlnI: 30 U/Probe, SpeI: 40 U/Probe) und für 18-24 Stunden im Thermomixer bei 37°C inkubiert.

Zur Durchführung der *PFGE* wurden die Agaroseblöcke mit der gespaltenen DNA in ein Gel aus 1,2% LMP-Agarose in TBE-Puffer gegeben, an welches bei einer Temperatur von 12°C für 30 Stunden eine elektrische Spannung von 200V angelegt wurde (Hula Gel HG 1000, Hoefer). Die Pulszeiten im „counter-clamped-homogeneous electric field“ (CHEF) wurden schrittweise wie folgt verändert: Zu Beginn erfolgte innerhalb von 15 Stunden die Senkung der Pulsfrequenz von 5 Sekunden auf 60 Sekunden. Nach weiteren 15 Stunden betrug die Pulsfrequenz 90 Sekunden.

Als molekulare Marker dienten zwei Marker der Firma *Sigma*, Taufkirchen, welche die Bereiche von 0,1 - 200 kB und von 225 - 2200 kB abdecken.

Das fertige Gel wurde mit Ethidiumbromidlösung (0,5 µg/ml) gefärbt, gewässert und unter 302 nm UV-Licht mit einer INTAS-Digitalkamera fotografiert.

Die genaue Anleitung zur laborüblichen Vorgehensweise ist als Übersicht im Anhang der Tabelle 7.2.2 zu entnehmen.

Auf jedem Gel wurden Kontroll- bzw. Referenzstämme mitgeführt. Tabelle 3.10. zeigt die eingesetzten Referenzstämme und deren Herkunft.

Tabelle 3.10: Bezeichnung und Herkunft der verwendeten Referenzstämme

Bezeichnung	Serotyp	Herkunft
STSAL 131	S. Infantis	160/93, Kot, Henne, BGA <sup>1</sup> 14.10.93
STSAL 304	S. Infantis	Y1/1610/II, LUA <sup>2</sup> Nürnberg, 1994
STSAL 434	S. Infantis	O:6,7, Vet. UA <sup>3</sup> Krefeld, 1993
STSAL 489	S. Infantis	822/83, Org. Rind, BGA, 1993
DSM 5569 <sup>T</sup>	S. Typhimurium	Deutsche Stammsammlung für Zellkulturen und Mikroorganismen, Braunschweig
DSM 9898 <sup>T</sup>	S. Enteritidis	Deutsche Stammsammlung für Zellkulturen und Mikroorganismen, Braunschweig

<sup>1</sup> BGA = Bundesgesundheitsamt; <sup>2</sup> LUA = Landesuntersuchungsamt

<sup>3</sup> Vet. UA = Veterinärmedizinisches Untersuchungsamt

Der Auswertung der Bandenmuster erfolgte visuell und die Bewertung nach den Kriterien von TENOVER et al. (1995).

Die Benennung der Bandenmuster wurde mit einer Kombination aus einem Buchstaben und einer Zahl vorgenommen. Der Buchstabe bezeichnet das bei der Herstellung der Muster eingesetzte Restriktionsenzym (X für XbaI, B für BlnI und Sp für SpeI). Die Ziffer wurde fortlaufend zugeteilt, wobei identische Bandenmuster auch identisch bezeichnet wurden. Bandenmuster, die sich durch zwei oder mehr genetische Events unterschieden (siehe Kapitel 2.4.2.3), wurden mit unterschiedlichen Ziffern versehen. Die Reihenfolge der Bezifferung drückt keine Wertung aus.

Eine einzelne genetische Abweichung (ein genetisches Ereignis) als Zeichen für eine nahe Verwandtschaft der Stämme führte bei der Benennung der Muster zur Beistellung einer weiteren Ziffer. So unterscheidet sich beispielsweise Muster X-1 von Muster X-1-1 durch ein genetisches Ereignis und Muster X-1-2 von X-1 durch ein andersartiges genetisches Ereignis.

### 3.3 Ergebnisse

Nachfolgend werden die Ergebnisse der in Kapitel 3.1. und 3.2 beschriebenen Untersuchungen dargestellt.

#### 3.3.1 Messerflächen

Um eine Bezugsgröße für die von den Messern gewonnenen Proben bzw. für die ermittelten Keimzahlen zu erhalten, wurde zunächst die Schneidflächengröße der untersuchten Messer dokumentiert. In Tabelle 3.11 sind die gemessenen Flächen in  $\text{cm}^2$  der Messerschneiden aufgeführt, die an den Positionen *Eviszeration*, *Fleischuntersuchung (FIU) Tierkörper* und *Fleischuntersuchung Organe* zum Einsatz kamen.

Tabelle 3.11: Messeroberflächen in  $\text{cm}^2$  (an den Positionen Eviszeration, Fleischuntersuchung (FIU) Tierkörper und Fleischuntersuchung Organe)

Probenahmetag	Eviszeration		FIU Tierkörper		FIU Organe	
1	25,75	22,5	26,5	28	17,5	26,75
2	30,75	26,25	29,5	26	24	30
3	25	29	22	18,5	14,75	33,25
4	17,75	26,25	12,5	21,5	24,75	32
5	20,5	20	14,5	19	45,75	44,5
6	20	20	38,75	39,25	16	25
7	22,25	-*	36,75	-*	37	-*
8	21	17,75	40,25	44	26	28
9	25,25	25	12,5	33,5	41,75	33,25
10	24,5	25,5	33,75	38,25	24	28
11	34	33,5	38	16,25	22,25	22,5
12	29	32,75	27,75	12,75	25,75	20,5
13	33	31,5	24,25	13,75	25,5	21,5
14	25	18,75	21	10,5	35,25	30,25
<b>Mittelwert [<math>\text{cm}^2</math>]</b>	<b>25,27</b>		<b>25,89</b>		<b>27,99</b>	
			<b>26,94</b>			

\* Es lag kein Messer zur Ermittlung der Messerfläche vor.

Am siebenten Probenahmetag konnte je Position nur ein Wert erhoben werden, da an den jeweiligen Arbeitsplätzen nur ein Messer vorhanden war.

Der als Bezugsgröße für die quantitative Auswertung dienende Mittelwert an der Position **Eviszeration** betrug **25,27 cm<sup>2</sup>**. An den Positionen *Fleischuntersuchung der Tierkörper* bzw. *Fleischuntersuchung der Organe* betragen die Mittelwerte 25,89 cm<sup>2</sup> bzw. 27,99 cm<sup>2</sup>. Daraus ergibt sich ein gemeinsamer Mittelwert für Position **Fleischuntersuchung** allgemein von **26,94 cm<sup>2</sup>**.

### 3.3.2 Wasser

#### 3.3.2.1 Temperaturen in den Sterilisationsbecken

Tabelle 3.12 zeigt die Ergebnisse der Temperaturmessungen des Wassers der Sterilisationsbecken an den Positionen *Eviszeration*, *Fleischuntersuchung Tierkörper*, *Fleischuntersuchung Organe* sowie des Sterilisationsbeckens für die Handbeile bei der *Spaltung*.

Tabelle 3.12: Wassertemperaturen der Sterilisationsbecken in °C an verschiedenen Arbeitspositionen

Probenahmetag	Eviszeration	FIU Tierkörper	FIU Organe	Spaltung
1	86,2	86	93,1	-*
2	87,6	82,8	82,4	70,9
3	73	79,1	91,3	80,4
4	86,1	81,6	88,9	-*
5	85,4	81,7	88,5	83
6	76,5	77	96,9	81,6
7	-*	69,8	90,4	-*
8	86,1	79,2	49,9	79,6
9	90,7	77,9	50,3	80,7
10	90	82,2	60,9	77
11	88,6	82,9	87,8	62,1
12	86	82,5	87,3	77
13	87,2	80,4	97,9	80,3
14	88,9	81,9	84,3	63,2
<b>Mittelwert</b>	<b>85,6 °C</b>	<b>80,4 °C</b>	<b>82,1 °C</b>	<b>76,0 °C</b>

\* Es war kein Wasser in den Sterilisationsbecken vorhanden.



Am ersten, vierten und siebenten Probenahmetag sowie im Sterilisationsbecken der Messer an der Position der Eviszeration am siebenten Probenahmetag befand sich kein Wasser in den Sterilisationsbecken.

Die durchschnittliche Temperatur im Sterilisationsbecken bei der *Eviszeration* lag bei 85,6°C, die Messwerte schwankten zwischen 73°C und 90,7°C.

An der Position Fleischuntersuchung Tierkörper waren Werte zwischen 69,8 °C und 86°C messbar bei einem Mittelwert von 80,4°C.

Die Messwerte an der Arbeitsposition Fleischuntersuchung Organe lagen zwischen 49,9°C und 97,9°C. Der entsprechende Mittelwert betrug 82,1°C.

Die Wassertemperatur im Sterilisationsbecken der Spaltbeile betrug durchschnittlich 76,0°C, die Messwerte lagen zwischen 62,1°C und 83°C.

### **3.3.2.2 Keimzahlen in den Sterilisationsbecken**

Im Wasser fast aller Sterilisationsbecken konnten im gesamten Verlauf der Probenahmen keine Mikroorganismen ermittelt werden. Bei diesen Proben lag das Ergebnis unterhalb der unteren Nachweisgrenze von  $1,0 \times 10^0$  KbE/ ml Wasser.

Ausnahmen bildeten am Probenahmetag 9 das Wasser der Becken an den Positionen *Fleischuntersuchung Tierkörper* mit einer Keimzahl von 1,99 log/ml und *Fleischuntersuchung Organe* mit 3,59 log koloniebildenden Einheiten/ ml.

### **3.3.3 Mikrobiologische Ergebnisse (quantitativ)**

#### **3.3.3.1 Aerobe Gesamtkeimzahl**

##### **3.3.3.1.1 Messer**

Die unmittelbar nach der Entnahme aus dem Sterilisationsbecken untersuchten Messer sind im Text als „Messer vor Gebrauch“ bezeichnet. Messer, die unmittelbar nach ihrer Nutzung, also noch vor erneutem Verbringen in das Sterilisationsbecken, beprobt wurden, werden mit „Messer nach Gebrauch“ bezeichnet. Tabelle 3.13 zeigt

die aerobe Gesamtkeimzahl auf diesen Messern an den verschiedenen Positionen vor sowie nach ihrem Gebrauch in log koloniebildender Einheiten (KbE)/cm<sup>2</sup> und die jeweilige prozentuale Keimbelastung.

Tabelle 3.13: Mittlere aerobe Gesamtkeimzahl von Messern vor und nach dem Gebrauch an den Positionen Eviszeration, Fleischuntersuchung Tierkörper und Fleischuntersuchung Organe in log KbE/cm<sup>2</sup> Messerfläche (jeweils n = 98) und die jeweilige prozentuale Angabe der bakteriologisch positiven Befundung

		Mittelwert in log KbE/cm <sup>2</sup>	Median	Mini- mum	Maxi- mum	Standard- abweichung	% Belastung
Eviszeration	Messer vor Gebrauch	2,73	2,58	1,60	5,82	0,78	63
	Messer nach Gebrauch	3,80	3,70	1,95	5,77	0,66	99
FIU Tierkörper	Messer vor Gebrauch	3,20	3,18	1,70	5,67	0,83	67
	Messer nach Gebrauch	3,83	3,91	2,07	5,14	0,61	99
FIU Organe	Messer vor Gebrauch	2,72	2,48	1,70	5,67	0,84	51
	Messer nach Gebrauch	3,35	3,35	1,57	5,25	0,72	95

#### *Beprobungsbereich Eviszeration*

Die aerobe Gesamtkeimzahl aller an der Position der *Eviszeration* den Sterilisationsbecken entnommenen Messer lag bei etwa 2,7 log/cm<sup>2</sup> Messerfläche. Nach dem Gebrauch erhöhte sich die aerobe Gesamtkeimzahl auf ca. 3,8 log/cm<sup>2</sup>. Der prozentuale Anteil der kontaminierten Messer vor dem Gebrauch lag bei 63%. Nach dem Gebrauch waren mit 99% nahezu alle verwendeten Messer kontaminiert.

*Beprobungsbereich Fleischuntersuchung Tierkörper*

Der aerobe Gesamtkeimgehalt der gerade dem Sterilisationsbecken entnommenen Messer betrug 3,20 log/cm<sup>2</sup> Messerfläche. Nach dem Gebrauch der Messer lag die aerobe Gesamtkeimzahl bei 3,83 log/cm<sup>2</sup>. Der Anteil der kontaminierten Messerflächen stieg von 67% vor dem Gebrauch auf 99% nach dem Gebrauch.

*Beprobungsbereich Fleischuntersuchung Organe*

Die Messer vor Gebrauch wiesen an dieser Arbeitsposition eine Belastung von 2,72 log/cm<sup>2</sup> auf. Nach dem Gebrauch lag die Belastung bei 3,35 log/cm<sup>2</sup> Messerfläche. Der Anteil kontaminierter Messer vor dem Gebrauch lag bei 51%. Nach dem Gebrauch waren 95% der Messer kontaminiert.

**3.3.3.1.2 Beile**

Die zum Spalten der Schlachttierkörper verwendeten Beile wurden unmittelbar vor ihrem Gebrauch sowie unmittelbar nach ihrem Gebrauch beprobt. Die entsprechende Bezeichnung erfolgte wie bei den Messern (Beil vor Gebrauch, Beil nach Gebrauch).

Die Position *Tierkörperspaltung* verfügte über ein Sterilisationsbecken, welches zum Zeitpunkt der beschriebenen Probenahmen während der Probenahmetage nicht benutzt wurden. Das Personal beschränkte sich darauf, die Schneideflächen des Beiles unter fließendem Wasser im Handwaschbecken abzuspülen. Dies erfolgte jedoch gründlich und gezielt von beiden Seiten.

Tabelle 3.14: Aerobe Gesamtkeimzahl auf den Beiloberflächen vor und nach dem Gebrauch an der Position Tierkörperspaltung in log KbE/cm<sup>2</sup> Messerfläche (jeweils n = 98) und die jeweilige Angabe der bakteriologisch positiven Befundung

		Mittelwert in log KbE/cm <sup>2</sup>	Median	Mini- mum	Maxi- mum	Standard- abweichung	% Belastung
<b>Spaltung</b>	<b>Beil vor Gebrauch</b>	2,69	2,57	1,15	5,28	0,86	92
	<b>Beil nach Gebrauch</b>	2,69	2,56	1,28	5,48	0,77	95

Die aerobe Gesamtkeimzahl auf den Oberflächen der verwendeten Beile (vergl. Tabelle 3.14) lag vor und nach dem Gebrauch bei  $2,69 \log/\text{cm}^2$ . Ein Anstieg der Gesamtkeimzahl durch die Nutzung war nicht zu verzeichnen. Der Anteil der kontaminierten Schneideflächen betrug bereits vor dem Gebrauch der Beile 92% und nach dem Gebrauch 99%.

### **3.3.3.2 Enterobacteriaceae**

Zusätzlich zu der Erfassung der aeroben Gesamtkeimzahl als Hinweis auf den allgemeinen Hygienestatus wurde die Anzahl der Enterobacteriaceae als Markerorganismen erhoben. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 3.15 zusammengefasst und mit den Ergebnissen der aeroben Gesamtkeimzahl als Übersicht aufgeführt.

Nachfolgend sind neben den durchschnittlichen Keimzahlen auch die prozentualen Belastungen der Messer mit Enterobacteriaceae aufgeführt. Das Auftreten des unter 3.2.5.2 beschriebenen Sonderfalls (Nachweis von Enterobacteriaceae in einer Anzahl, die unterhalb der unteren Nachweisgrenze der Methode liegt) wird bei den prozentualen Angabe der Ergebnisse berücksichtigt. Demnach schließt die Angabe der prozentualen Belastung auch diejenigen kontaminierten Messer mit ein, bei denen die Anzahl der Enterobacteriaceae unterhalb von  $10^2$  KbE pro  $\text{cm}^2$  lag. Die Angaben zur durchschnittlichen Belastung beziehen sich hingegen nur auf Proben, bei denen die Enterobacteriaceae-Anzahl oberhalb der unteren Nachweisgrenze des Spatelverfahrens lag.

Tabelle 3.15: Zusammenfassende Darstellung der quantitativen Ergebnisse (Messer, Beil, Handflächen, Kettenhandschuhe) sowie die prozentuale Angabe bakteriologisch positiver Befunde.

	Proben-Menge [n] je Proben-nahmetag	Proben-Menge [n] Gesamt	GKZ log/cm <sup>2</sup> bzw. ml	% Belastung GKZ	Enterobacteriaceae log/cm <sup>2</sup> bzw. ml (...) = Anzahl positiver Proben	% Belastung Enterobacteriaceae (...) = Anzahl der berücksichtigten Proben <sup>1</sup>
Wasser Sterilisationsbecken	1	14	n.n.	-	n.n. (0)	--
	1	14	n.n.	-	n.n. (0)	-
	1	14	n.n.	-	n.n. (0)	-
Messer vor Gebrauch	7	98	2,73	63	3,32 (3)	5,1 (5)
	7	98	3,80	99	3,59 (23)	30,6 (30)
Beil vor Gebrauch	7	98	2,69	92	n.n. (0)	0
	7	98	2,69	99	2,39 (2)	2 (2)
Messer vor Gebrauch	7	98	3,20	67	2,83 (3)	4,1 (4)
	7	98	3,83	99	3,02 (21)	33,7 (32)
Messer vor Gebrauch	7	98	2,72	51	2,57 (1)	1 (1)
	7	98	3,35	95	2,96 (12)	26,5 (26)
Handfläche	3	42	n.u.	-	2,6 (22)	54,8 (23)
	3	42	n.u.	-	2,8 (15)	38,1 (16)
	3	42	n.u.	-	2,5 (17)	47,6 (20)

<sup>1</sup>Es wurden auch positive Ergebnisse berücksichtigt, die unterhalb der unteren Nachweisgrenze der Methode lagen (Kapitel 3.2.5.3).

### **3.3.3.2.1 Messer**

#### *Beprobungsbereich Eviszeration*

An der Position *Eviszeration* waren 5,1% (5 von 98 Proben) der untersuchten Messer vor dem Gebrauch mit Enterobacteriaceae belastet. Der durchschnittliche Enterobacteriaceae-Gehalt bei drei auswertbaren Proben lag bei 3,32 log KbE/cm<sup>2</sup>. Nach dem Gebrauch waren 30,6% (30 von 98 Proben) der untersuchten Messer mit Enterobacteriaceae kontaminiert, die quantitative Belastung lag bei 3,59 log KbE/cm<sup>2</sup> (23 der untersuchten Proben) (vergl. Tab 3.15).

#### *Beprobungsbereich Fleischuntersuchung Tierkörper*

Die Belastung der Schneidflächen von drei auswertbaren Messern mit Enterobacteriaceae lag bei 2,83 log KbE/cm<sup>2</sup> vor dem Gebrauch und bei 3,02 log KbE/cm<sup>2</sup> nach dem Gebrauch (21 von 98 Proben). Die prozentuale Keimbelastung stieg durch den Gebrauch von 4,1% (4 von 98 Proben) auf 33,7 % (32 von 98 Proben) (vergl. Tab 3.15).

#### *Beprobungsbereich Fleischuntersuchung Organe*

Auf einem der Messer vor Gebrauch waren 2,57 log KbE Enterobacteriaceae/cm<sup>2</sup> nachweisbar. Damit war 1% der Messer mit Enterobacteriaceae belastet. Nach dem Gebrauch konnten auf 26,5% (26 von 98 Proben) der untersuchten Messer Enterobacteriaceae nachgewiesen werden. Die zwölf auswertbaren Proben zeigten eine durchschnittliche Belastung von 2,96 log KbE/cm<sup>2</sup> (vergl. Tab 3.15).

### **3.3.3.2.2 Beile**

Auf den untersuchten Beilen an der Position *Spaltung* der Tierkörper waren vor dem Gebrauch keine Enterobacteriaceae nachweisbar. Nach dem Gebrauch stieg bei zwei Messern die Belastung der Schneidflächen auf 2,39 log KbE/cm<sup>2</sup>. Der Anteil der belasteten Beile lag nach dem Gebrauch bei 2% (vergl. Tab 3.15).

### **3.3.3.2.3 Handflächen / Kettenhandschuhe**

#### *Beprobungsbereich Eviszeration*

Der Anteil der kontaminierten Handflächen lag hier bei 54,5% (23 von 42 Proben). Bei 22 der Proben lag die durchschnittliche Belastung mit Enterobacteriaceae bei 2,56 log /ml Spülflüssigkeit (vergl. Tab 3.15).

#### *Beprobungsbereich Fleischuntersuchung Tierkörper*

15 der 42 Proben waren mit durchschnittlich 2,84 log KbE/ml Enterobacteriaceae belastet. Bei 38,1% (16 von 42 Proben) der untersuchten Kettenhandschuhe konnte ein Enterobacteriaceae-Nachweis geführt werden (vergl. Tab 3.15).

#### *Beprobungsbereich Fleischuntersuchung Organe*

Mit einem Enterobacteriaceae-Gehalt von 2,51 log KbE/ml waren an der Position *Fleischuntersuchung Organe* 17 der 42 untersuchten Proben belastet. Insgesamt wurden auf 47,6% der untersuchten Kettenhandschuhe (20 von 42 Proben) Enterobacteriaceae nachgewiesen (vergl. Tab 3.15).

### 3.3.4 *Salmonella*-Nachweise (qualitativ)

#### 3.3.4.1 Anzahl, Anteil und Herkunft *Salmonella*-positiver Proben

Bei insgesamt 1.638 untersuchten Proben konnten aus 24 Proben *Salmonellen* isoliert werden.

Von den Geräteoberflächen bzw. Fleisch berührenden Flächen konnten ebenso positive *Salmonella*-Nachweise geführt werden wie von den untersuchten Tierkörperteilen bzw. Organen. Lediglich im Wasser der Sterilisationsbecken, von den Schneideflächen der Spaltbeile und auf dem Rückenspeck wurde *Salmonella* an keinem der Untersuchungstage nachgewiesen.

Tabelle 3.16 zeigt zunächst den prozentualen Anteil *Salmonella*-positiver Proben an den einzelnen Probenahmepositionen.

Tabelle 3.16: Prozentualer Anteil *Salmonella*-positiver Proben

	Gesamt- proben- zahl	Anzahl positiver Proben	Prozentualer Anteil positiver Proben
<b>Geräte</b>			
Messer	N = 588	2	0,3%
Handfläche / Kettenhandschuhe	N = 126	5	4,0%
Spaltbeil	N = 196	0	-
Wasser der Sterilisationsbecken	N = 42	0	-
<b>Tierkörper</b>			
Tonsillen	N = 98	5	5,1%
Bauchlappen	N = 196	6	3,1%
Lymphknoten	N = 98	1	1,0%
Rückenspeck	N = 98	0	-
<b>Organkonvolute</b>			
Herz	N = 196	5	2,6%
		<b>Σ: 24</b>	<b>ø 1,46%</b>

Im Bereich der Geräteoberflächen bzw. Fleisch berührenden Oberflächen traten bei den Handflächen bzw. Kettenhandschuhen 4,0% *Salmonella*-positive Proben auf.



Tabelle 3.17 zeigt, dass auf den Handflächen an der Position der *Eviszeration* sowie auf den Kettenhandschuhen bei der *Fleischuntersuchung der Tierkörper* jeweils an zwei Probenahmetagen *Salmonella* nachgewiesen werden konnte. Am 13. Probenahmetag wurden aus einer Handflächen-Probe zwei Serovaren isoliert. Beprobte Kettenhandschuhe im Bereich der *Fleischuntersuchung der Organe* waren an einem der Probenahmetage *Salmonella*-positiv. Am 13. Probenahmetag waren die Handflächen bzw. Kettenhandschuhe in allen drei untersuchten Teilbereichen mit *Salmonella* belastet. Von den Kettenhandschuhen konnten ebenfalls zwei Serovaren isoliert werden.

An zwei Probenahmetagen (4 und 9) konnten jeweils auf einem Messer vor Gebrauch *Salmonella* nachgewiesen werden. Die Messer (vor Gebrauch) stammten aus den Arbeitsbereichen *Eviszeration* und *Fleischuntersuchung der Organe*.

Tabelle 3.17: Auftreten *Salmonella*-positiver Proben in der Fleischgewinnungslinie beim Schwein: Geräteoberflächen, Fleisch berührende Oberflächen, Wasser der Sterilisationsbecken

		Anzahl <i>Salmonella</i> - positiver Proben	Probe- nahme- tag	Serovar
Eviszeration	<b>Sterilisationsbecken</b>	-	-	-
	<b>Messer</b> vor Gebrauch	1	4	S. Typhimurium
	<b>Messer</b> nach Gebrauch	-	-	-
Spaltung	<b>Beil</b> vor Gebrauch	-	-	-
	<b>Beil</b> nach Gebrauch	-	-	-
FIU Tierkörper	<b>Sterilisationsbecken</b>	-	-	-
	<b>Messer</b> vor Gebrauch	-	-	-
	<b>Messer</b> nach Gebrauch	-	-	-
FIU Organe	<b>Sterilisationsbecken</b>	-	-	-
	<b>Messer</b> vor Gebrauch	1	9	S. ssp.I Rauform
	<b>Messer</b> nach Gebrauch	-	-	-
<b>Handfläche</b> , <i>Eviszeration</i>		2	13	S. Typhimurium, S. ssp.I Rauform
			14	S. Infantis
<b>Kettenhandschuh</b> , <i>FIU Tierkörper</i>		2	11	S. Typhimurium
			13	S. Typhimurium
<b>Kettenhandschuh</b> , <i>FIU Organe</i>		1	13	S. Typhimurium, S. ssp.I Rauform

Im Bereich der Gewebeproben (vergl. Tabellen 3.16 und 3.18) konnten aus den untersuchten Tonsillen in fünf Fällen (verteilt auf die Probenahmetage 6, 10, 13, 14) Salmonellen nachgewiesen werden. Das entspricht einem prozentualen Anteil von 5,1%.

4,1% der untersuchten Bauchlappen im Bereich der *Eviszeration* waren mit Salmonellen kontaminiert. Die drei positiven Proben stammten von den Probenahmetage 12, 13 und 14, wobei am 14. Tag in einer Probe zwei Serovaren nachweisbar waren. Auch im Bereich der Fleischuntersuchung der Tierkörper konnte auf drei der untersuchten Bauchlappen *Salmonella* nachgewiesen werden. Die *Salmonella*-positiven Proben stammten von den Probenahmetagen 9, 10 und 14 und machten einen prozentualen Anteil von 3,1% aus. Im Durchschnitt aller untersuchten Arbeitsbereiche war bei 3,6% der Bauchlappen *Salmonella* nachweisbar.

Tabelle 3.18: Auftreten *Salmonella*-positiver Proben in der Fleischgewinnungslinie beim Schwein: Gewebeproben

		Anzahl <i>Salmonella</i> - positiver Proben	Probe- nahmetag	Serovar
Eviszeration	Bauchlappen	3	12	<i>S. Enteritidis</i>
			13	<i>S. Typhimurium</i>
			14	<i>S. ssp. I</i> Rauform <i>S. Infantis</i>
Spaltung	Rückenspeck	-	-	-
FIU Tierkörper	Tonsillen	5	6	<i>S. Typhimurium</i>
			10	<i>S. Infantis</i>
			10	<i>S. Infantis</i>
			13	<i>S. Typhimurium</i>
	Bauchlappen	3	14	<i>S. Infantis</i>
			14	<i>S. Infantis</i>
			14	<i>S. Infantis</i>
FIU Organe	Herz Außen	4	9	<i>S. ssp. I</i> Rauform
			10	<i>S. Infantis</i>
			10	<i>S. Infantis</i>
			10	<i>S. Infantis</i>
	Herz Anschnitt	1	10	<i>S. Infantis</i>

Auf den Außenflächen von vier verschiedenen untersuchten Herzen aus den Probenahmetagen 10 und 14 war *Salmonella* nachweisbar. An Probenahmetag 10 war auch ein Herzanschnitt *Salmonella* positiv zu beurteilen. Insgesamt erwiesen sich 2,6% der untersuchten Herzproben als *Salmonella* positiv.

Am 14. Probenahmetag konnte im Bereich der Fleischuntersuchung der Tierkörper in einem der untersuchten Lymphknoten *Salmonella* nachgewiesen werden. Das entspricht einem Anteil von 1,0%.

### **3.3.4.2 Phänotypische und genotypische Charakterisierung der *Salmonella*-Isolate**

Im Zuge der Bearbeitung einer Probe wurden an verschiedenen Punkten der Anreicherung positive Isolate gewonnen. Die Untersuchungen dieser Isolate im Nationalen veterinärmedizinischen Referenzlabor für Salmonellen des damaligen Bundesinstituts für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV) in Berlin zeigten, dass innerhalb einer Probe verschiedene Isolate mit unterschiedlichen Serovarietäten und auch Resistenzmustern darstellbar waren.

In der Konsequenz wurden *alle* gewonnenen Isolate mit der PFGE untersucht, auch wenn das Auftreten von unterschiedlichen Salmonellen innerhalb einer Probe nicht die Kernfrage der vorliegenden Arbeit war. Kenntnis über die Eigenschaften aller Isolate aus einer Probe waren jedoch erforderlich, um eine Aussage über Unterschiede und Übereinstimmungen von Salmonellen aus unterschiedlichen Proben treffen zu können.

In Tabelle 3.19 sind die Ergebnisse der genotypischen und phänotypischen Untersuchungen aller unterschiedlichen Isolate in einem Überblick dargestellt. Für den Fall, dass innerhalb einer Probe mehrere identische Isolate darstellbar waren, werden die Charakteristika dieser Isolate der Übersicht halber nur einmal aufgeführt.

Tabelle 3.19: Phäno- und genotypische Charakterisierung der *Salmonella*-Isolate

Durchgang/ Proben-Nr.	Probenmaterial	Serovar	Phagen- typ <sup>2</sup>	Resistenzbestimmung <sup>1)</sup>											PFGE		
				AMP 100	C 30	K 30	S 25	SU 300	SXT 25	TE 30	W 2,5	and.	Xbal	BlnI	Spel		
4 / 7	Messer v.G., Evisz.	S. Typhimurium	DT 104 B low	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	X-6	B-10	Sp-9
6 / 104	Tonsillen, FIU-TK	S. Typhimurium	DT 120	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	X-1	B-1-3	Sp-1
9 / 5	Messer v.G., Organe	S. ssp.I Rauform	-	R	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	X-1-1	B-1-1	Sp-1-1
9 / 47	Bauchlappen, FIU-TK	S. ssp.I Rauform	-	R	S	R	R	R	S	S	R	S	S	S	X-1-2	B-1	Sp-1-1
9 / 47	Bauchlappen, FIU-TK	S. ssp.I Rauform	-	R	S	R	R	R	S	S	R	S	S	S	X-1	B-1	Sp-2
10 / 49	Bauchlappen, FIU-TK	S. Infantis	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	X-3	B-3	Sp-3
10 / 92	Herz (Anschnitt)	S. Infantis	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	X-3	B-3	Sp-3
10 / 93	Herz (Außen)	S. Infantis	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	X-3	B-3	Sp-3
10 / 101	Herz (Außen)	S. Infantis	-	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	X-3	B-3-1	Sp-3
10 / 103	Herz (Außen)	S. Infantis	-	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S	S	X-3	B-3-2	Sp-3
10 / 105	Tonsillen, FIU-TK	S. Infantis	-	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S	S	X-3	B-3-2	Sp-3
10 / 105	Tonsillen, FIU-TK	S. Infantis	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	X-3	B-3	Sp-3
10 / 110	Tonsillen, FIU-TK	S. Infantis	-	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S	S	X-3	B-3-2	Sp-3
11 / 64	KHS – Tierkörper	S. Typhimurium	DT 104 L	R	S	R	R	R	S	R	R	S	S	S	X-6	B-10	Sp-9
12 / 46	Bauchlappen, Evisz.	S. Enteritidis	PT 8	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	X-2	B-2	Sp-4
13 / 46	Bauchlappen, Evisz.	S. Typhimurium	DT 120	R	S	S	R	R	S	R	R	S	S	S	X-1	B-1	Sp-1
13 / 60	Handfläche, Evisz.	S. ssp.I Rauform	-	R	S	R	R	R	S	R	R	S	S	S	X-1	B-1	Sp-1
13 / 60	Handfläche, Evisz.	S. Typhimurium	DT 120	R	S	R	R	R	S	R	R	S	S	S	X-1	B-1	Sp-1
13 / 61	KHS – FIU-TK	S. Typhimurium	DT 120	R	S	R	R	R	S	R	R	S	S	S	X-1	B-1	Sp-1
13 / 62	KHS – FIU Organe	S. ssp.I Rauform	-	R	S	R	R	R	S	R	R	S	S	S	X-1	B-1	Sp-1
13 / 62	KHS – FIU Organe	S. Typhimurium	DT 120	R	S	R	R	R	S	R	R	S	S	S	X-1	B-1	Sp-1
13 / 110	Tonsillen, FIU-TK	S. Typhimurium	U 302	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	X-4	B-4	Sp-5
14 / 46	Bauchlappen, Evisz.	S. ssp.I Rauform	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	nicht mehr anzüchtbar		
14 / 46	Bauchlappen, Evisz.	S. ssp.I Rauform	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	X-3-1	B-3	Sp-3-1
14 / 46	Bauchlappen, Evisz.	S. Infantis	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	X-3-1	B-3	Sp-3-1
14 / 47	Bauchlappen, FIU-TK	S. ssp.I Rauform	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	nicht mehr anzüchtbar		
14 / 47	Bauchlappen, FIU-TK	S. ssp.I Rauform	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	X-3-1	B-3	Sp-3-1
14 / 47	Bauchlappen, FIU-TK	S. ssp.I Rauform	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	nicht mehr anzüchtbar		

Fortsetzung der Tabelle 3.19: Phäno- und genotypische Charakterisierung der *Salmonella*-Isolate

Durchgang/ Proben- Nr.	Herkunft	Serovar	Phagen- typ <sup>2)</sup>	Resistenzbestimmung <sup>1)</sup>											PFGE		
				AMP 100	C 30	K 30	S 25	SU 300	SXT 25	TE 30	W 2,5	and.	Xbal	BlnI	Spel		
14 / 60	Handfläche, Evisz.	S. Infantis	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	X-3-2	B-3	Sp-3
14 / 60	Handfläche, Evisz.	S. Infantis	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	nicht mehr anzüchtbar	nicht mehr anzüchtbar	
14 / 60	Handfläche, Evisz.	S. Infantis	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	nicht mehr anzüchtbar	nicht mehr anzüchtbar	
14 / 60	Handfläche, Evisz.	S. Infantis	-	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	X-3	B-3	Sp-3	
14 / 60	Handfläche, Evisz.	S. Infantis	-	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	nicht mehr anzüchtbar	nicht mehr anzüchtbar		
14 / 91	Herz (Außen)	S. Infantis	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	X-3-2	B-3	Sp-3	
14 / 104	Tonsillen, FIU-TK	S. Infantis	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	nicht mehr anzüchtbar	nicht mehr anzüchtbar		
14 / 104	Tonsillen, FIU-TK	S. Infantis	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	nicht mehr anzüchtbar	nicht mehr anzüchtbar		
14 / 111	Lymphknoten, Org.	S. Infantis	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	nicht mehr anzüchtbar	nicht mehr anzüchtbar		
14 / 111	Lymphknoten, Org.	S. Infantis	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	X-3-2	B-3	Sp-3	

v.G. = or Gebrauch, Evisz. = Eviszzeration, KHS = Kettenhandschuh, FIU-TK = Fleischuntersuchung der Tierkörper, Org. = Organe

<sup>1)</sup> Bei alle übrigen getesteten Antibiotika wurden die Isolate als sensibel bewertet.

<sup>2)</sup> Die Phagentypisierung erfolgte ausschließlich bei S. Typhimurium und S. Enteritidis.

AMP= Ampicillin; C= Chloramphenicol; K= Kanamycin; S= Streptomycin; SU= Sulfonamid; SXT= Sulphamethoxazol/Trimethoprim; TE= Tetracyclin; W= Trimethoprim

### **Serovarietäten**

*Salmonella* (S.) Typhimurium konnte in den Durchgängen 4, 6, 11 und 13 aus den Probenmaterialien Messer vor Gebrauch (Eviszeration), Kettenhandschuh (Fleischuntersuchung Tierkörper), Bauchlappen (Eviszeration), Handfläche (Eviszeration), Kettenhandschuh (Fleischuntersuchung Tierkörper und Organe) und Tonsillen nachgewiesen werden.

*Salmonella* Enteritidis konnte am Probenahmetag 12 aus den Bauchlappen bei der Eviszeration isoliert werden.

*Salmonella* Infantis war an den Probenahmetagen 10 und 14 auf mehreren Proben (Bauchlappen bei der Fleischuntersuchung der Tierkörper und bei der Eviszeration, Herz (Außenfläche und Anschnitt), Handflächen (Eviszeration), Tonsillen und Lymphknoten nachweisbar.

*Salmonella* ssp. I Rauform: Hier kann wegen Strukturveränderungen der charakteristischen Lipopolysaccharid-Komplexe auf der Außenwand der Zellen keine Seroformel bestimmt werden. Diese nicht weiter identifizierbaren Subspezies konnten an den Probenahmetagen 9, 13 und 14 von Messern vor Gebrauch (Fleischuntersuchung Organe), von Bauchlappen (Eviszeration und Fleischuntersuchung Tierkörper), von den Handflächen (Eviszeration) sowie von den Kettenhandschuhen (Fleischuntersuchung der Organe) isoliert werden.

### **Phagentypen**

Am 4. Probenahmetag konnte *S. Typhimurium* DT 104 B low an der Position der Eviszeration (Messer vor Gebrauch) nachgewiesen werden.

Der einzige *Salmonella*-positive Nachweis am Probenahmetag 11 zeigte die Anwesenheit von *S. Typhimurium* DT 104 L auf den Kettenhandschuhen an der Position der Fleischuntersuchung der Tierkörper.

*S. Typhimurium* DT 120 wurde am 6. Probenahmetag aus den Tonsillen nachgewiesen sowie am 13. Probenahmetag ebenfalls aus den Tonsillen, auf den Bauchlappen bei der Eviszeration und von den Handflächen bzw. Kettenhandschuhen bei der Eviszeration bzw. bei der Fleischuntersuchung von Tierkörper und Organen.

Am 13. Probenahmetag wurde zudem aus einer Tonsillen-Probe *S. Typhimurium* U302 isoliert.

Aus den Bauchlappen bei der Eviszeration konnte am 12. Probenahmetag *S. Enteritidis* des Phagentyps PT 8 nachgewiesen werden.

### **Antibiotika-Resistenzen**

Das Ausmaß der Antibiotika-Resistenz der untersuchten Stämme war unterschiedlich und reichte von einer vollständigen Sensibilität gegenüber den getesteten Antibiotika bis hin zu Mehrfachresistenzen.

*S. Typhimurium* DT 104 B low aus dem 4. Probenahmetag wies Multiresistenz gegenüber Ampicillin, Chloramphenicol, Streptomycin, Sulfonamid, Sulphametoazol/Trimethoprim, Tetracyclin und Trimethoprim auf.

*S. Typhimurium* DT 120 vom 6. Probenahmetag war lediglich gegenüber Tetracyclin resistent.

Am 9. Probenahmetag konnten drei unterschiedliche *Salmonella* spp. I Rauform-Isolate gewonnen werden, von denen jene aus den Bauchlappen bei der Fleischuntersuchung der Tierkörper gemeinsame Resistenzen gegenüber den folgenden Antibiotika aufwiesen: Ampicillin, Kanamycin, Streptomycin, Sulfonamid, Tetracyclin.

*Salmonella* ssp. I Rauform von einem Messer (Fleischuntersuchung Organe, vor Gebrauch) zeigte ebenfalls Resistenzen gegenüber Ampicillin, Kanamycin, Streptomycin und Sulfonamid, jedoch nicht gegen Tetracyclin.

Von den Isolaten des 10. Probenahmetages wiesen vier Stämme Resistenzen auf. Sowohl bei einem Isolat vom Herzen (außen) als auch bei zwei Isolaten von Tonsillen lag eine Resistenz gegenüber Sulfonamid und Tetracyclin vor. Ein Isolat von einer weiteren Probe Herz außen war resistent gegenüber Sulfonamid.

*S. Typhimurium* DT 104L vom 11. Probenahmetag zeigte Resistenzen gegenüber Ampicillin, Streptomycin, Sulfonamid und Tetracyclin.

*S. Enteritidis* PT8 vom 12. Probenahmetag reagierte vollständig sensibel auf die getesteten Antibiotika.

Am 13. Probenahmetag waren alle *S. Typhimurium* DT 120-Isolate und ein *S. ssp* Rauform-Isolat resistent gegenüber Ampicillin, Streptomycin, Sulfonamid und Tetracyclin.

*S. Typhimurium* U302 wies keine Resistenzen gegenüber den getesteten Antibiotika auf.

Am 14. Probenahmetag reagierten die untersuchten Isolate vorwiegend sensibel auf die getesteten Antibiotika. Ausnahmen bildeten hier zwei Isolate von den Handflächen mit einer Resistenz gegenüber Tetracyclin.

### **Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE)**

Im Rahmen der PFGE wurden mit *BlnI* fünf, mit *XbaI* sechs und mit *SpeI* sieben verschiedene PFGE-Hauptmuster dargestellt. Die Anzahl der darstellbaren Banden lag bei *XbaI* zwischen 10 und 14 in einem Bereich von 20-1500 kB. Mit dem Enzym *BlnI* konnten 5 bis 14 Banden in einem Kilobasenbereich von 20 kB bis 2000 kB aufgetrennt werden. Mit *SpeI* waren 12 bis 14 Banden von 30 bis 800 Kilobasen darstellbar.

#### *Bandenmuster der untersuchten Proben:*

*S. Typhimurium* DT 104 B low vom 4. Probenahmetag zeigt die PFGE-Muster X6, B10 und Sp9.

*S. Typhimurium* DT 120 von Probenahmetag 6 verfügte über die Bandenmuster X1, B1-3 sowie Sp1.

Am 9. Probenahmetag konnten bei den *S. spp.* I Rauform-Isolaten drei unterschiedliche PFGE-Muster-Kombinationen dargestellt werden. Während ein Isolat die Musterkombination X1/B1/Sp2 aufwies, wichen die beiden anderen Isolate davon geringfügig ab. Das zweite Isolat aus derselben Probe zeigte die Musterkombination X1-2/B1/Sp1-1. Das Isolat vom Messer vor Gebrauch zeigte X1-1/B1-1/Sp1-1 als Bandenmuster.

Nahezu alle *S. Infantis*-Isolate des 10. Probenahmetages verfügten über identische PFGE-Bandenmuster (X3/B3/Sp3). Abweichungen ergaben sich bei einem Isolat



vom Herzen (Außen) und zwei Isolaten aus unterschiedlichen Tonsillen bei der Fleischuntersuchung der Tierkörper (X3/B3-2/Sp3). Bei einer weiteren Herz-Probe konnte ein drittes Muster dargestellt werden (X3/B3-1/Sp3).

Am 11. Probenahmetag zeigte der einzige isolierte *Salmonella*-Stamm (*S. Typhimurium* DT 104 L) das Bandenmuster X6/B10/Sp9.

*S. Enteritidis* PT8-Isolate des 12. Probenahmetages verfügte über die PFGE-Bandenmuster X2/B2/Sp4.

An Probenahmetag 13 konnten zwei unterschiedliche Bandenmusterkombinationen dargestellt werden: Der überwiegende Teil der Isolate (*S. Typhimurium*) zeigte die Bandenmuster X1/B1/Sp1. *S. Typhimurium* U302 verfügte über die Bandenmuster X4/B4/Sp5.

An Probenahmetag 14 war ein Teil der Isolate nicht mehr anzüchtbar, so dass keine Untersuchung mit der Pulsfeld-Gelelektrophorese erfolgen konnte.

Bei den übrigen Isolaten wurden drei verschiedene Bandenmusterkombinationen nachgewiesen. Ein Isolat vom 14. Probenahmetag von den Handflächen bei der Eviszierung zeigte die Musterkombination X3/B3/Sp3. Ein weiteres Isolate aus derselben Probe sowie Isolate vom Herz (außen) und einem Lymphknoten ergaben das PFGE-Bandenmuster X3-2/B3/Sp3. Zwei (in der Serovarietät unterschiedliche) Isolate aus einem Bauchlappen bei der Eviszierung sowie ein weiteres von einem Bauchlappen eines anderen Tieres bei der Fleischuntersuchung der Tierkörper verfügten über die Bandenmuster X3-1/B3/Sp3-1.

## **4 Diskussion**

### **4.1 Diskussion von Material und Methoden**

#### **4.1.1 Vorgehen bei Probenahme und Transport**

Bei der **Probenahme** zur Untersuchung von Messern und Geräteoberflächen in der Fleischgewinnung wurde häufig steriles Windeltuch verschiedener Größe verwendet, das vorher mit gepuffertem Peptonwasser sowie 0,1% Tween 80 befeuchtet worden war und steril aufbewahrt wurde (THORBERG und ENGVALL 2001; GIOVANNACCI et al. 2001; VON ALTROCK et al. 1999; HALD et al. 1999; VAN ELZEN und SNIJDERS 1993). Bei HALD et al. (1999) erfolgte die Probenahme mit Tupfern, wie sie bei VAN ELZEN und SNIJDERS (1993) beschrieben und im Jahr 2000 von SWANENBURG speziell für die Detektion von Salmonellen validiert worden ist. THORBERG und ENGVALL (2001) nahmen ihre Proben nach einer Abwandlung der SWANENBURG'schen Vorgehensweise. Durch Voruntersuchungen hatten die Autoren ebenfalls gewährleistet, dass die von ihnen gewählte Variante die gleiche Effektivität wie bei SWANENBURG (2000) aufwies (THORBERG und ENGVALL 2001).

In den hier beschriebenen Untersuchungen wurde Baumwollmull einer definierten Größe (10 x 10 cm) zur Herstellung der hier als Tupfer bezeichneten Vorrichtungen zur Probenahme verwendet. Ebenso wie im wissenschaftlichen Schrifttum beschrieben, erfolgte vor der Probenahme eine Befeuchtung der Tupfer und eine sterile Verpackung, die eine Probenahme ohne unerwünschte Kontamination der Tupfer ermöglichte. Im Rahmen eines Vorversuchs wurde die Tauglichkeit der gewählten Tupfermethode geprüft und die Qualität der Probenahme (Auffindung bzw. Wiederfindung einer bekannten Menge von Salmonellen) bestätigt (vergl. Kapitel 7.1). Wie auch bei LIMPITAKIS et al. (1999) wurde auf die Beigabe von Detergentien zur Befeuchtungsflüssigkeit verzichtet, da die Probenahme bei laufendem Betrieb stattfand und rückstandsfrei gestaltet sein musste.

Um den Eingriff in den laufenden Betrieb möglichst gering zu halten, wurde jeweils nur eine Seite der Messerklingen und der vordere Teil des Beils (entlang der Schneide) beprobt. Da die durchschnittliche Fläche aller in der Untersuchung

geprüften Messer ermittelt worden war, war eine Rückrechnung auf die Gesamtmesserfläche möglich.

Für die Untersuchung der Handflächen von Mitarbeitern in der Fleischgewinnung werden unterschiedliche Vorgehensweisen beschrieben:

In einer Untersuchung von KAMPELMACHER et al. (1961) haben die Mitarbeiter ihre Hände in einen mit Flüssigkeit gefüllten Kunststoffhandschuh getaucht und die Hand darin bewegt. Im Anschluss wurde die Flüssigkeit in den Handschuhen auf Salmonellen untersucht.

NORTJE et al. (1991) beprobten die Handflächen der Schlachthofmitarbeiter mittels Abklatschverfahren durch eine Agar-Wurst. Ob so alle Teile der Handfläche, die auch mit den Tierkörpern in Kontakt kommen, erfasst wurden, geht aus der Versuchsbeschreibung nicht hervor.

Das Eintauchen der Kettenhandschuhe in einen 500ml-Kolben mit 200 ml Verdünnungsflüssigkeit und anschließendes 1-minütiges Schütteln war bei MÜLLER (1994) die Vorgehensweise der Wahl. Als Bezugsgröße diente hier das Gewicht des Kettenhandschuhs.

Bei LIMPITAKIS et al. (1999) wurden die Hände des Schlachthofpersonals mit vorbereiteten Gewebetupfern abgetupfert. Es wurde nicht weiter beschrieben, welche Areale der Hand genau beprobt wurden.

Bei SWANENBURG et al. (2001) gaben sich Probennehmer (mit sterilen Handschuhen) und Schlachthofmitarbeiter die Hände während der Tupfer zwischen die Hände gelegt war.

Die in der vorliegenden Arbeit angewandte Art der Probenahme von den Handflächen der Mitarbeiter erfasst durch das Walken der feuchten Tupfer vollständig die Teile der Handfläche, die mit den Tierkörpern in Berührung kamen, darüber hinaus konnten jedoch keine weiteren Teile der Hand den Tupfer berühren. Ebenso wie bei VON ALTROCK et al. (1999) wurde ausschließlich die Hand untersucht, die nicht das Messer führte, um die Produktionsbedingungen realistisch wiederzuspiegeln. In welcher Art und Weise bei VON ALTROCK et al. (1999) die Tupfer mit den Handflächen in Berührung gebracht wurden, geht aus der Beschreibung jedoch nicht hervor.

Auf die Erfassung der Gesamtkeimzahl auf den Handflächen wurde in der vorliegenden Arbeit verzichtet. Zwar existiert eine hinreichende Anzahl von Veröffentlichungen zur Gesamtkeimzahl auf Handflächen (vorwiegend aus dem Bereich der Krankenhaushygiene), deren Veränderung im Laufe der Fleischgewinnung hier jedoch nicht den Kern der Fragestellung traf. Da Enterobacteriaceae und Salmonellen jedoch wichtige Hygieneparameter darstellen, wurden diese beiden Parameter erfasst, wie bei allen anderen Produkt berührenden Oberflächen auch.

Nicht bei allen Studien werden Angaben zum **Transport** der Proben gemacht. DE WIT und KAMPELMACHER (1981) transportierten ihre Tupferproben in Kühlboxen ohne Kühlelement und konnten so an warmen Tagen (20-25°C Außentemperatur) eine Transporttemperatur von 8-14°C erreichen, an kalten Tagen (<20°C Außentemperatur) lag die Transporttemperatur bei 8-10°C. LIMPITAKIS et al. (1999) hielten das Probenmaterial in isothermen Gefäßen bis zur Aufbereitung kühl. Bei HALD et al. (1999) wurde der Probentransport in der Regel bei 4-5°C vollzogen. Wenn die Proben jedoch am Tag der Probenahme aufbereitet wurden, wurde nicht notwendigerweise gekühlt.

GIOVANNACCI et al. (2001) transportierten die Tupferproben ebenfalls in Kühlboxen ohne weitere Hilfsmittel zum Ort der Aufbereitung, welche am gleichen Tag erfolgte.

Bei der vorliegenden Untersuchung erfolgte der Transport der Proben vom Schlachthof zum Labor in sterilen Stomacherbeuteln, die max. 3-4 Stunden in einer fest verschlossenen Kühlbox mit Kühlelementen aufbewahrt wurden. Dies gewährleistete, dass die Temperatur der Proben bis zur Aufbereitung nicht anstieg und eine Verschiebung der Gesamtkeimzahl nicht zu erwarten war.

### **4.1.2 Auswahl der Untersuchungsverfahren**

#### **4.1.2.1 Kulturelle Untersuchungsmethoden**

Für die Untersuchung auf Salmonellen wurde die Vorgehensweise nach der amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren §35 LMBG (L 00.00-20) gewählt, ab dem 6. Probenahmetag ergänzt um die Verwendung des DIASALM nach VAN

NETTEN und VAN DER ZEE (Merck Art. Nr. 9803). Es handelt sich um ein halbfestes Rappaport-Vassiliadis-Medium, welches durch spezifischen Farbumschlag sowie einen Wachstumshof, der die Beweglichkeit von Mikroorganismen darstellt, das Auffinden von Salmonellen um einen weiteren Faktor erleichtert.

Zwar konnten im Rahmen der Untersuchung 17 *Salmonella*-Isolate von DIASALM abgeimpft werden (siehe Tabelle 4.1), diese waren aber auch von MLCB oder BPLS zu isolieren. Der vollständige Rest der *Salmonella*-Stämme konnte nicht über DIASALM erfasst werden.

Tabelle 4.1: Isolate, die auf DIASALM angezüchtet wurden

Probenahmetag	Probenummer	Herkunft der Probe
6	104	Tonsillen
	104	Tonsillen
10	49	Bauchlappen
	49	Bauchlappen
	49	Bauchlappen
	92	Herz
	92	Herz
	93	Herz
	105	Tonsillen
11	64	Kettenhandschuh
12	46	Bauchlappen
	46	Bauchlappen
13	46	Bauchlappen
	60	Kettenhandschuh
	110	Tonsillen
14	46	Bauchlappen
	111	Lymphknoten

#### 4.1.2.2 Molekularbiologische Untersuchungsmethoden: PFGE

Die Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) wird häufig für die Charakterisierung von Salmonellen eingesetzt, einige Autoren sprechen vom „Goldstandard“ (OLIVE und BEAN 1999). Dennoch sind die ermittelten D-Indizes (SIMPSON`S-Index of Diversity, siehe Kap. 2.4) nicht als optimal zu bezeichnen (siehe Tabelle 2.14): In

keiner der in Kapitel 2 gezeigten Untersuchungen lag der D-Index bei 1, was einer 100%igen Unterscheidungsfähigkeit entspricht.

Die PFGE wurde in verschiedenen Studien mit dem Einsatz anderer molekularbiologischer Untersuchungsmethoden verglichen (MALORNY et al. 2001; LACONCHA et al. 1999; LIEBISCH und SCHWARZ 1996). Trotz der bevorzugten Verwendung als Goldstandard erwies sie sich nicht in allen Vergleichen als am besten geeignet zur diskriminatorischen Untersuchung von Salmonellen (STANLEY et al. 1995; THONG et al. 1995; LIN et al. 1996; AHMED et al. 2000; WEIGEL et al. 2004).

Der Einsatz der PFGE zur Feintypisierung von Salmonellen wird immer wieder, insbesondere vor dem Hintergrund der hohen Klonalität der Mikroorganismen, diskutiert: Salmonellen gelten als klonal und homogen, und sie sind genetisch stabil (PRAGER und TSCHÄPE 2003). Die Auswertung der PFGE ist vor diesem Hintergrund vorzunehmen. Wegen der grundsätzlich vorliegenden engen Verwandtschaftsverhältnisse bei Salmonellen, muss die Abwesenheit von Unterschieden nicht gleichsam bedeuten, dass die Isolate identisch sind (SPRATT 2004; WASSENAAR 2003). Bei LETELLIER et al. (1999) sowie LING et al. (1999) konnte *S. Typhimurium* DT104 mit der Pulsfeld-Gelelektrophorese nicht weiter unterteilt werden. STANLEY et al. 1995 konnten *S. Panama* als stark konservierten Organismus mittels PFGE ebenfalls nicht weiter subtypisieren. Nach LIEBANA et al. (2002) gerät die PFGE mit ihrer Aussagekraft bei *S. Enteritidis* an ihre Grenzen, und es sind wirkungsvollere Untersuchungsmethoden zur Feintypisierung erforderlich. Hier kommen die Untersuchung der „Fluorescent Amplified Fragment-Length Polymorphism“ (FAFLP) (SCOTT et al. 2001) oder die „Random Amplification of Polymorphic DNA“ (RAPD) (LIN et al. 1996) in Betracht.

WASSENAAR (2003) fordert, dass die Differenzierung von Stämmen grundsätzlich auf zwei genotypischen Untersuchungsmethoden basieren sollte, um mit der einen Methode Merkmale nachweisen zu können, die mit der anderen unentdeckt bleiben.

Dennoch wird die PFGE als genotypische Untersuchungsmethode für Salmonellen bei epidemiologischen Fragestellungen national und international bevorzugt eingesetzt. Ein Beleg dafür ist die Tatsache, dass sich nach dem Centre of Disease Control and Prevention (CDC) (WEIGEL et al. 2004; SWAMINATHAN et al. 2001) in

den USA auch das "Forschungsnetzwerk Lebensmittelinfektionen in Deutschland", aus dem das German-PulseNet hervorgegangen ist, für den routinemäßigen Einsatz der PFGE zur Feintypisierung von Salmonellen entschieden hat (<http://www.foodborne-net.de>). Auch im Nationalen veterinärmedizinischen Referenzlabor für Salmonellen wird die PFGE für die Untersuchung von Tier-, Lebens- und Futtermittelisolaten herangezogen, auch um epidemiologische Fragestellungen zu beantworten (PRAGER und TSCHÄPE 2003; RKI 2004a).

Die PFGE wird zur Untersuchung von Salmonellen unter verschiedensten Aspekten eingesetzt, wie Tabelle 2.16 zeigt. Die Feintypisierung ist für die Beantwortung bestimmter Fragestellungen unerlässlich, weil sie beispielsweise, wie in der vorliegenden Arbeit, die Übertragungswege von Salmonellen in einem begrenzten Areal mit Hilfe der PFGE offen legen kann.

So verfolgten GIOVANNACCI et al. (2001) Salmonellen in zwei Schlacht- und Zerlegebetrieben mittels Serotypisierung und Makrorestriktionsanalyse. Die Autoren verwendeten zur PFGE der isolierten *S. Typhimurium*- und *S. Derby*-Stämme die Enzyme XbaI und SpeI. Es konnten mit beiden Enzymen identische Isolate von unterschiedlichen Probenahmepositionen identifiziert werden, z.B. vom lebenden Tier und der Karkasse an verschiedenen Stationen im Prozess sowie von verschiedenen Geräteoberflächen (z.B. vom Tisch nach der Enthaarung, von der Enthaarungsmaschine und der Poliermaschine).

WEIGEL et al. (2004) verglichen verschiedene genotypische Untersuchungsmethoden mit der PFGE im Hinblick auf ihre Eignung für die Untersuchung möglicher Transmissionen von Salmonellen in Schweinebetrieben. Mit dem dabei verwendeten Pulse-Net-Protokoll wurden die Enzyme AvrII, SpeI und XbaI eingesetzt.

BOTTELDOORN et al. (2004) untersuchten verschiedene *Salmonella*-Stämme aus unterschiedlichen Kontaminationsquellen in zwei Schlachthöfen. Zur Subtypisierung von *S. Typhimurium*, *S. Derby* und *S. Ohio* mit der PFGE kamen XbaI und SpeI zum Einsatz. Die Autoren konnten übereinstimmende *S. Typhimurium*- und *S. Derby*-Isolate in Mesenteriallymphknoten, Fäzes und von den Oberflächen der Karkassen nachweisen. *S. Ohio* konnte mit der PFGE nicht weitergehend charakterisiert werden.

#### 4.1.2.2.1 Auswahl der Endonukleasen

Für die Makrorestriktionsanalyse von Salmonellen werden unterschiedliche Nukleasen eingesetzt, die in ihrer Aussagekraft unterschiedlich bewertet werden. Die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme XbaI, BlnI und SpeI entsprechen den in der Literatur am häufigsten beschriebenen Enzymen. Die in Tabelle 2.14 dargestellten D-Indizes machen deutlich, dass XbaI für *S. Enteritidis* und *S. Typhimurium* in vergleichenden Studien den höchsten diskriminatorischen Index ermöglicht. Daraus lässt sich erklären, dass XbaI auch dann das meist verwendete Enzym ist, wenn nur ein Enzym eingesetzt wird. Im Protokoll des PulseNets wird ebenfalls XbaI empfohlen. Auch der Hinweis von LIEBANA et al. (2001), die Wirkung von XbaI sei nicht von Punktmutationen beeinflusst, spielt hierbei eine Rolle. Ebenso konnten MURASE et al. (1996) nach zwölfacher Subkultivierung keine Veränderung von PFGE-Mustern mit dem Enzym XbaI nachweisen, wohingegen das PFGE-Muster mit BlnI durch die Subkultivierung beeinflusst wurde. Zuletzt sei darauf hingewiesen, dass XbaI von allen einsetzbaren Enzymen die geringsten Kosten verursacht, was dessen Verwendung bei den insgesamt hohen Kosten für die PFGE zusätzlich begünstigen dürfte.

Bei MALORNY et al. (2001) weist XbaI den niedrigsten D-Index auf. Es wird aber deutlich, dass eine Kombination mit anderen Enzymen die Aussagekraft erheblich erhöht. Dieser Aspekt wird auch von LACONCHA et al. (2000) betont. WEIGEL et al. (2004) zeigen, dass für eine möglichst genaue Aussagen über den Verwandtschaftsgrad von Isolaten (insbesondere hinsichtlich der Transmission von Salmonellen) mehrere (drei) Enzyme erforderlich sind.

Auch in der vorliegenden Arbeit konnte durch den Einsatz zusätzlicher Enzyme die Aussagekraft über den Verwandtschaftsgrad der Isolate erhöht werden.

Zunächst erwies sich SpeI als das Enzym mit der größten Aussagekraft. Mit XbaI wurden sechs verschiedene Hauptmuster generiert, mit BlnI fünf und mit SpeI sieben (vergl. Tabelle 3.19). Diese Angaben beziehen sich ausschließlich auf die in der Untersuchung isolierten Stämme, Referenzstämme wurden hier nicht mitgezählt.

Eine Gruppe von Isolaten mit gleichen Mustern auf der Basis eines Enzyms konnte bei nachfolgenden Untersuchungen durch ein anderes Enzym in weitere



Untergruppen aufgeteilt werden. So wurden beispielsweise in der Gruppe der Isolate mit dem Muster Sp3 durch das Enzym BlnI die drei PFGE-Muster B3, B3-1 und B3-2 dargestellt (Tab. 3.19, Proben vom 10. Probenahmetag). Durch den Einsatz von zwei bzw. drei Enzymen wurde die Menge der Informationen über einzelne Isolate erhöht, so dass den Isolaten eine höhere Anzahl von Merkmalen zugeordnet werden konnte. Je mehr Merkmale eines Isolats bekannt sind, desto genauer kann eine Unterscheidung von Isolaten vorgenommen werden. RIDLEY et al. (1998) geben in diesem Kontext an, dass die diskriminatorische Fähigkeit einer Methode umso höher ist, desto mehr unterschiedliche Muster durch sie dargestellt werden können.

Tabelle 4.2 zeigt die Unterteilung von Isolaten der vorliegenden Arbeit gleicher PFGE-Muster (gesamt aufgeführt in Tabelle 3.19), die sich aus dem Einsatz weiterer Enzyme ergeben hat. Beispielsweise konnten Isolate mit dem Muster X1 durch den Einsatz der Enzyme BlnI und Spel weitergehend differenziert werden: Innerhalb aller Isolate mit dem Muster X1 konnten zwei verschiedene Muster mit dem Enzym BlnI dargestellt werden sowie drei verschiedene Muster mit Spel.

Tabelle 4.2: Unterteilung von Isolaten mit gleichen Bandenmustern durch den Einsatz weiterer Enzyme

verwendetes Enzym	betreffendes Muster	Anzahl der Untergruppen nach Subdifferenzierung durch		
		Xbal	BlnI	Spel
Xbal	X1	-	2	3
	X3	-	3	0
BlnI	B1	3	-	3
	B3	3	-	2
Spel	Sp1-1	2	2	-
	Sp3	2	3	-

Mit der Wahl der für diese Arbeit eingesetzten Enzyme wird den genannten Studien insofern Rechnung getragen, als dass sowohl für *S. Typhimurium* als auch für *S. Enteritidis* jene Enzyme vertreten sind, denen in unterschiedlichen Studien jeweils der für diese Serovar höchste diskriminatorische Index zugesprochen wird.

Für *S. Infantis* (MERINO et al. 2003; WEGENER und BAGGESEN 1996) und *S. Typhimurium* U302 (LIEBANA et al. 2002; WALKER et al. 2001) liegen Studien vor, in denen die PFGE erfolgreich als Methode für epidemiologische Untersuchungen

eingesetzt wurde, wobei in der Regel Xbal zum Einsatz kam. Konkrete Darstellungen des diskriminatorischen Indexes oder vergleichende Studien mit anderen Enzymen liegen für diese Serovaren nicht vor.

Letztendlich orientiert sich die Auswahl der Enzyme in dieser Arbeit auch an der Vorgehensweise des Nationalen veterinärmedizinischen Referenzlabors für Salmonellen (PRAGER und TSCHÄPE 2003).

Nach WASSENAAR (2003) haben Endonukleasen in der PFGE eine höhere Aussagekraft, je mehr Banden bei der Restriktion entstehen. Die in der vorliegenden Arbeit entstandene Anzahl von Banden je Enzym wurde durch Zählen ermittelt und ist in Tabelle 4.3 vergleichend mit den Ergebnissen der Untersuchung von WEIGEL et al. (2004) aufgeführt. Die Autoren haben ebenfalls Salmonellen aus dem Umfeld der Schweineproduktion (Aufzucht) vor dem Hintergrund möglicher Transmissionen untersucht und im Gegensatz zu anderen Veröffentlichungen die der Tabelle 4.3 zu entnehmenden Angaben veröffentlicht.

Sowohl mit Xbal als auch mit Spel (als die in *beiden* Arbeiten verwendeten Nukleasen) konnte in der vorliegenden Arbeit durchschnittlich eine größere Anzahl von Banden als bei WEIGEL et al. (2004) erzeugt werden.

In der eigenen Arbeit wurden mit dem Enzym Spel durchschnittlich die meisten Banden erzeugt. Nach den Kriterien von WASSENAAR (2003) hat dieses Enzym demnach für die vorliegende Untersuchung die höchste Aussagekraft.

Tabelle 4.3: Anzahl der unterschiedlichen DNA-Fragmente je Enzym im Vergleich

Enzym	WEIGEL et al. (2004)	vorliegende Arbeit
Xbal	3-14 Banden	10-14 Banden (20-1500 kbp)
Spel	9-15 Banden	12-14 Banden (30-800 kbp)
BlnI	nicht verwendet	5-14 Banden (20-2000 kbp)
AvrII	4-14 Banden	nicht verwendet

#### 4.1.2.2.2 Vorgehensweise/Ablaufprotokoll

Das hier angewendete Ablaufprotokoll beruht auf einer Veröffentlichung von MALSOW et al. (1993) unter Berücksichtigung der Vorgaben zu einem verkürzten

Vorgehen nach MATUSHEK et al. (1996). Dieses Protokoll ist nicht nur für die Untersuchung von Salmonellen bzw. gramnegativen Mikroorganismen im Allgemeinen geeignet, sondern kann auch bei grampositiven Bakterien angewendet werden (MATUSHEK et al. 1996). Einige Punkte des Protokolls (z.B. Auswahl des Restriktionsenzym, Durchführung der Gelelektrophorese und Trennbedingungen) sind offen formuliert, um sie den jeweiligen Erfordernissen anpassen zu können.

Die vorliegende Vorgehensweise zeigt einige Unterschiede zum PulseNet-Protokoll aus dem Jahr 2003, welches vom German-PulseNet zur Vereinheitlichung der Anwendung veröffentlicht wurde ([http://www.foodborne-net.de/content/e25/e70/e580/index\\_ger.html](http://www.foodborne-net.de/content/e25/e70/e580/index_ger.html)). Zunächst sind für die Aufbereitung der DNA (Lysis, De-proteinisierung, Waschen) zwei Tage vorgesehen, im Gegensatz zu den in der vorliegenden Untersuchung veranschlagten 3 Tagen. Da das PulseNet-Protokoll auf die Charakterisierung von Salmonellen zugeschnitten ist, sind für die folgenden Arbeitsschritte konkrete Vorgaben aufgeführt: Als Restriktionsenzym ist XbaI vorgegeben. Für die Herstellung des Gels werden wahlweise zwei Agarosen angegeben. Zu den Trennbedingungen werden verschiedene Vorschläge gemacht, wobei eine Standardisierung durch den Markerstamm NCTC12416 (*S. enterica* serovar Typhimurium LT2) vorgesehen ist.

Als Vorteil des PulseNet-Protokolls (und auch als Intention des Netzwerks) ist die Vereinheitlichung der Vorgehensweise zu sehen. In der Konsequenz sind die Ergebnisse der Salmonellen-Untersuchungen nach dem PulseNet-Protokoll miteinander vergleichbar, auch wenn sie in unterschiedlichen Laboratorien durchgeführt wurden.

Dieses vereinheitlichte Protokoll lag zum Zeitpunkt der eigenen Untersuchung noch nicht vor. Eine Vergleichbarkeit der Gele mit anderen Untersuchungsergebnissen ist demnach nur laborintern möglich.

#### **4.1.2.2.3 Interpretation der PFGE-Muster**

Über die Vorgehensweise bei der Bewertung der Bandenmuster einer PFGE herrscht international kein Konsens. In der Regel wird auf eine Arbeit von TENOVER et al. (1995) zurückgegriffen, die jedoch nicht pauschal für alle Mikroorganismen angewendet werden kann (PRAGER und TSCHÄPE 2003; WASSENAAR 2003).

Kernfrage ist, welche Anzahl von abweichenden Fragmentmustern zur Unterscheidung zweier Bandenmuster führt oder wie lange zwei Bandenmuster noch als identisch anzusehen sind. Ausschlaggebend für die Beantwortung dieser Fragen scheint die Klonalität. PRAGER und TSCHÄPE (2003) bezeichnen für *S. Enteritidis* bereits ein bis zwei Fragmentmuster-Abweichungen als relevant für die Definition eines neuen Genotyps. Bei *S. Bovismorbificans* wurden Abweichungen von bis zu vier Fragmenten noch als tolerabel angesehen (PRAGER und TSCHÄPE 2003). SOOD et al. (2002) befinden die Kriterien von TENOVER et al. (1995) vor dem Hintergrund der hohen Klonalität der Salmonellen als zu streng und wollen zudem berücksichtigen, dass sich auch Plasmide in der Elektrophorese als Bande darstellen und so ein abweichendes Muster verursachen können, ohne dass der Unterschied in der chromosomalen DNA begründet wäre. Die Autoren untersuchten *S. Typhimurium* mit dem Enzym XbaI und legten fest, dass abweichend von TENOVER et al. (1995) erst ab einem Unterschied von 5 Banden und mehr ein neues Muster benannt wurde.

Um in der vorliegenden Arbeit bei eng verwandten Mustern auszuschließen, dass die Abweichungen durch ein Plasmid bedingt waren, wurde in Anlehnung an GARAIZAR et al. (2000) bei einigen Isolaten eine Elektrophorese ohne vorherige Inkubation mit einem Enzym durchgeführt (Daten hier nicht gezeigt). Wird die DNA von Mikroorganismen vor der Elektrophorese nicht durch Enzyme geteilt, so ist das Molekül zu groß, um in der PFGE zu wandern und stellt sich als stark anfärbbare Balken zu Beginn der Laufstrecke dar. Extrachromosomal lokalisierte Plasmide würden sich in diesem Fall jedoch auch ohne Inkubation darstellen lassen, da Moleküle dieser Größe in der PFGE auftrennbar sind. So würde sich ein Plasmid als singuläre Bande zeigen. In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch in keinem Fall auf diese Weise ein Plasmid dargestellt werden. Demnach wurde geschlossen, dass keine Plasmid-bedingten Banden vorlagen und in dieser Arbeit folglich auf eine derartige Vorunterscheidung verzichtet werden konnte.

Die Auswertung der Muster in der vorliegenden Arbeit wurde nach TENOVER et al. (1995) vorgenommen und die Muster entsprechend benannt. Bei der Bewertung der Verwandtschaftsverhältnisse wurden Abweichungen innerhalb der Hauptmuster (z.B. X1, X1-1, X1-2), die durch eine einzelne genetische Veränderung verursacht wurden, toleriert. Damit wurde den Hinweisen von MURASE et al. (1996) Rechnung getragen,

nach denen die Subkultivierung und Lagerung von Mikroorganismen deren PFGE-Muster beeinflussen kann. Die Gruppe von Isolaten, die nach TENOVER et al. (1995) „wahrscheinlich Teil eines Ausbruchs“ bzw. „nahe verwandt“ sind, werden hier somit demselben Ursprung zugeordnet. Wie bei SOOD et al (2002) wurden erst ab einer Abweichung von fünf oder mehr Fragmenten neue Hauptmuster benannt und somit die Nicht-Identität von Isolaten eindeutig deklariert.

## **4.2 Diskussion der Ergebnisse**

### **4.2.1 Diskussion der quantitativen Ergebnisse**

#### **4.2.1.1 Temperaturen in den Sterilisationsbecken**

Die derzeit übliche Vorgehensweise bei der Reinigung und Desinfektion von Messern ist der Fleischhygieneverordnung (FIHV Anlage 2, Kapitel 1, Punkt 1.7) zu entnehmen. Es wird dort eine ausreichende Anzahl von Einrichtungen zur Reinigung und Desinfektion in größtmöglicher Nähe zum Arbeitsplatz gefordert. Für die Arbeitsgeräte ist eine Behandlung mit Wasser von mindestens 82°C oder mit einem "anderen geeigneten Desinfektionsverfahren" vorgeschrieben. Der Verordnung fehlen nähere Angaben zur Verweildauer der Arbeitsgeräte im Wasser und zur Häufigkeit der Anwendung. Andere geeignete Desinfektionsverfahren sind zwar erwähnt, jedoch nicht näher beschrieben.

Zwar konnte EINSCHÜTZ (2004) im Versuch zeigen, dass eine Eintauchdauer bei 70°C für 10 Sekunden für Keimfreiheit auf den untersuchten Metalloberflächen sorgen kann. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit konnten dies jedoch nicht bestätigen, da auch bei höheren Wassertemperaturen die im Schlachthof verwendete Sterilisationsmethode nicht immer ausreichte.

Auch waren die geforderten Voraussetzungen unter Praxisbedingungen nicht immer gegeben, wie der Umstand zeigt, dass in der vorliegenden Untersuchung bei 52 über den gesamten Probenahmezeitraum hinweg gemessenen Wassertemperaturen (Einzelwerte) insgesamt 24 mal die geforderten 82°C unterschritten wurden. Davon lagen 6 Werte unterhalb von 70°C. Bei 4 Beprobungen enthielt das Sterilisations-

becken gar kein Wasser (vergl. Tab. 3.12). Im Durchschnitt aller Probenahmetage wurden die geforderten 82°C lediglich bei der Eviszeration (durchschnittlich 85,6°C) und bei der Fleischuntersuchung der Organe (durchschnittlich 82,1°C) erreicht. Bei der Spaltung (durchschnittlich 76,0°C) und der Fleischuntersuchung der Tierkörper (durchschnittlich 80,4°C) wurde diese Temperatur teilweise erheblich unterschritten. Auch bei EINSCHÜTZ et al. (2004) lagen die in der Praxis gemessenen Wassertemperaturen vorwiegend unterhalb von 82°C.

Die hier mitgeteilten Beobachtungen zur Reinigung und Desinfektion bestätigen die Aussage der Scientific Committee on Veterinary Measures relating to Public Health (SCVPH 2001), nach der die derzeitige Vorgehensweise ohne vorherige Reinigung von Messern als ineffektiv bewertet wird. Bereits in den Jahren 1988 und 1992 beschrieben SCHÜTT-ABRAHAM et al. die Hitzeokoagulation von Eiweißen auf Messerklingen und belegten, dass eine Reinigung und Desinfektion bei 82°C nicht den gewünschten Reinigungseffekt erzielt. WOLTERSDORF und MINTZLAFF wiesen 1996, wie auch das SCVPH (2001), auf organische Substanzen hin, die sich unter der Temperatureinwirkung gelöst haben und auf der Wasseroberfläche der Sterilisationsbecken schwimmend Ursache für eine Rekontamination der Messer sein können.

Die Ergebnisse zur aeroben Gesamtkeimzahl sowie zu den Enterobacteriaceae, insbesondere auf den Messern und Beilen vor Gebrauch, zeigen deutlich die Unzulänglichkeit der Vorgehensweise bei der Reinigung und Desinfektion der untersuchten Messer und Handbeile (siehe Kapitel 4.2.1.2 und 3). Es ist mit der durchgeführten Sterilisation nicht gelungen, die Mikroorganismen von den eingesetzten Handgeräten zu entfernen.

### **4.2.1.2 Aerobe Gesamtkeimzahl**

Die aerobe Gesamtkeimzahl in den Prozessabläufen der Fleischgewinnung kann als Hinweis auf die allgemeine Schlachthygiene aufgefasst werden. Dennoch existieren keine entsprechenden Grenzwerte für die Keimzahlen auf den Oberflächen der in der Fleischgewinnung eingesetzten Handgeräte während des laufenden Betriebes.

In der Entscheidung 2001/471/EG vom 8. Juni 2001 der Europäischen Kommission werden Grenzwerte für die Oberflächenkeimgehalte nach Reinigung und Desinfektion in Schlachthöfen und Zerlegebetrieben vorgegeben (Probenahme vor Schlachtbeginn). Zur Beprobung in solchen Betrieben sind diverse Probenahmestellen aufgeführt, u.a. Sterilisationsgeräte für Messer, Messer (Verbindung zwischen Scheide und Griff), Sägeblätter und sonstige Schneidgeräte oder Teile der Verarbeitungslinie, die oft mit Schlachtkörpern in Kontakt kommen. Die Grenzwerte für die Koloniezahl auf Oberflächen nach Reinigung und Desinfektion, die von der Änderung der Entscheidung 2001/471/EG vom 26. April 2004 nicht betroffen waren, sind in Tabelle 4.4 dargestellt.

Tabelle 4.4: Grenzwerte für die Koloniezahl bei Oberflächentests zur Überprüfung von Reinigung und Desinfektion in Schlacht- und Zerlegebetrieben (Entscheidung 2001/471 der Europäischen Kommission)

	<b>annehmbar</b>	<b>nicht annehmbar</b>
<b>Gesamtkeimzahl (GKZ)</b>	0-10/cm <sup>2</sup>	>10/cm <sup>2</sup>
<b>Enterobakterien</b>	0-1/cm <sup>2</sup>	>1/cm <sup>2</sup>

Die durchschnittliche Keimbelastung der hier vergleichbaren Messer und Beile „vor Gebrauch“ (also unmittelbar nach Reinigung und Desinfektion) aus der vorliegenden Arbeit würde nicht im annehmbaren Bereich im Sinne der Entscheidung 2001/471/EG liegen (vergl. Tab. 3.13 und 3.14).

Die vorliegenden Ergebnisse machen (siehe Tabelle 3.15) deutlich, dass die in der untersuchten Fleischgewinnungslinie verwendeten Messer in den Sterilisationsbecken nicht immer erfolgreich sterilisiert wurden. Sowohl die Messer als auch die Beile waren bereits vor Gebrauch mit etwa 2,7 bis 3,2 log KbE/cm<sup>2</sup> belastet. Die Verwendung führte zu einer Erhöhung der Gesamtkeimzahl um 0,5 - 1 Logarithmusstufen auf etwa 3,3 - 3,8 log KbE/cm<sup>2</sup>.

Die stärkste Erhöhung der Gesamtkeimzahl auf den Messern war bei der Eviszeration zu verzeichnen (vor Gebrauch 2,73 log KbE/cm<sup>2</sup>, nach Gebrauch 3,80 log KbE/cm<sup>2</sup>), was sich mit der Manipulation am stark keimbelasteten Magen-Darm-Trakt erklären lässt. Diese Ergebnisse gehen konform mit den Feststellungen von BERENDS et al. (1997), nach denen von der Position der Eviszeration mit das größte Risiko für die Kontamination der Karkassen ausgeht.

Die höchste Belastung der Messer vor Gebrauch fand sich an der Position der Fleischuntersuchung der Tierkörper. Diese lag etwa 0,5 Logarithmusstufen über der Keimbelastung der Messer vor Gebrauch bei der Fleischuntersuchung der Organe. Als Erklärungsansatz wäre eine insgesamt weniger hygienische Arbeitsweise an dieser Position denkbar. Zudem lag die durchschnittliche Wassertemperatur bei der Fleischuntersuchung der Tierkörper mit 80,4°C unterhalb der geforderten 82°C, wohingegen bei der Organuntersuchungsstelle die Wassertemperatur im Sterilisationsbecken bei 82,1°C lag. Daraus ist jedoch keine allgemein gültige Aussage abzuleiten. Es kann lediglich eine Erläuterung der hier beschriebenen Umstände und Ergebnisse erfolgen.

Auch die prozentuale Keimbelastung der Handgeräte erhöhte sich durch ihre Verwendung deutlich, so dass nach Gebrauch nicht mehr etwa 50-60%, sondern 95-99% der Messer belastet waren.

Eine Ausnahme bildeten die Beile: Hier zeigte sich die Gesamtkeimzahl vor und nach Gebrauch konstant, jedoch war bereits vor Gebrauch auf 92% der Beile eine Keimbelastung darstellbar. Der Gebrauch führte zu einer weiteren Erhöhung der prozentualen Belastung auf 99%.

Die Gesamtkeimzahl auf den Beilen war niedriger als auf den Messern. Ein Grund könnte hier der Umstand sein, dass der wenig kontaminierte Rücken zu spalten war, so dass bei der Spaltung weniger Keime auf das Beil gelangt sein könnten.

Aus dem Wasser der untersuchten Sterilisationsbecken konnte, bis auf die Proben vom 9. Probenahmetag bei der Fleischuntersuchung der Tierkörper und der Organe, keine Keimbelastung dargestellt werden.

### **4.2.1.3 Enterobacteriaceae**

Die Enterobacteriaceae gelten in Prozessabläufen der Lebensmittelgewinnung als Markerorganismus für eine mögliche Kontamination mit Darminhalt. Nach MOSSEL et al. (1995) werden, zurückgreifend auf INGRAM (1977), unter diesem Begriff Index- und Indikatororganismen zusammengefasst: Indexorganismen stehen direkt oder indirekt mit der Anwesenheit ökologisch ähnlicher pathogener Mikroorganismen im



Zusammenhang und zeigen somit eine mögliche Gesundheitsgefährdung bei entsprechendem Kontakt auf. Indikatororganismen weisen auf mögliche Verunreinigung während eines Prozessablaufs oder einen nicht gelungenen Herstellungs- oder Verarbeitungsprozess hin. Ein derartiger Markerorganismus kann durchaus beide Funktionen erfüllen (MOSSEL et al. 1995). Der Nachweis von Enterobacteriaceae auf Oberflächen in der Fleischgewinnung kann ein Zeichen dafür sein, dass Darminhalt auf die Oberflächen gelangt ist. Mit Darminhalt können auch pathogene Darmbakterien und Zoonoseerreger wie Salmonellen, Campylobacter oder Yersinien auf die Oberflächen gelangen und eine gesundheitliche Gefahr für den Konsumenten darstellen (BERENDS et al. 1997). Enterobacteriaceae dienen hier demnach sowohl als Index- als auch als Indikatororganismen, wobei mit dem eher prozessorientierten Ansatz der Arbeit ihre Funktion als Indikatorkeim im Vordergrund steht.

In der vorliegenden Untersuchung (Ergebnisse vergl. Tabelle 3.15) waren die Messer bereits vor Gebrauch mit durchschnittlich etwa 2,6 bis 3,3 log KbE/cm<sup>2</sup> Enterobacteriaceae kontaminiert. Die Belastung stieg nach Gebrauch auf durchschnittlich etwa 3,0 bis 3,6 log KbE/cm<sup>2</sup>. Die prozentuale Belastung der Messer mit Enterobacteriaceae lag mit etwa 1-5% vor Gebrauch erheblich niedriger als mit der aeroben Gesamtkeimzahl (51-67%). Durch den Gebrauch stieg dieser Anteil deutlich an auf etwa 27-34%.

Auf den Beilen konnten vor Gebrauch keine Enterobacteriaceae nachgewiesen werden. Durch den Gebrauch stieg zwar die Zahl der Enterobacteriaceae auf 2,4 log KbE/cm<sup>2</sup> an, es waren jedoch nur zwei Prozent der untersuchten Beile derartig belastet. Diese günstigen Ergebnisse lassen sich, wie bei der aeroben Gesamtkeimzahl, damit begründen, dass der Rücken als Kontaktfläche des Beils im Prozessverlauf weniger mit Darminhalt in Berührung kommen kann als die Kontaktflächen der Messer. So wäre der Bauchlappen im Falle einer Havarie des Magen-Darm-Traktes unmittelbar betroffen, wohingegen die Rückenpartie durchaus unbelastet bleiben könnte. Hinzu kommt, dass die Handbeile, wenn auch nicht regelmäßig nach jedem Tierkörper, so doch häufiger gründlich abgespült und auch abgerieben wurden. Möglicherweise liegt auch in dieser regelmäßigen, leichten mechanischen Reinigungsbehandlung die Begründung für das insgesamt bessere Abschneiden der Beile bei der hygienischen Bewertung als die Handgeräte.

Weder zu den Messern, noch zu den Beilen in der Fleischgewinnung beim Schwein stehen vergleichbare Daten zur Belastung der Oberflächen mit Enterobacteriaceae zur Verfügung, so dass ein Vergleich hier nicht möglich ist.

Angaben zur Belastung von Handflächen mit Enterobacteriaceae werden bei DE WIT und KAMPELMACHER (1981 und 1982) gemacht. Als Bezugsgröße diente dort die gesamte Hand, wohingegen in der vorliegenden Arbeit als Bezugsgröße ein Milliliter Dispergierflüssigkeit dient. In Tabelle 4.5 sind die Daten von DE WIT und KAMPELMACHER (1981 und 1982) den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit gegenübergestellt. Die absoluten Ergebnisse der Beprobungen der Handflächen und Kettenhandschuhe wurden durch Multiplikation mit 100 (es wurden 100 ml Dispergierflüssigkeit verwendet) auf die Bezugsgröße „gesamte Hand“ hochgerechnet. Die unterschiedlichen Vorgehensweisen bei den Probenahmen müssen somit bei einem Vergleich (Tab. 4.5) beachtet werden.

Tabelle 4.5: Belastung von Handflächen und Kettenhandschuhen mit Enterobacteriaceae in der Fleischgewinnung beim Schwein

	<b>Anzahl der Enterobacteriaceae in log KbE pro Handfläche</b>	<b>% Belastung mit Enterobacteriaceae</b>
<b>de Wit und Kampelmacher (1981)</b>	3,38	100
<b>de Wit und Kampelmacher (1982)</b>	3,57	36
<b>vorliegende Arbeit:</b> Eviszeration	4,6	54,8
	<b>Anzahl der Enterobacteriaceae in log KbE pro Kettenhandschuh</b>	<b>% Belastung mit Enterobacteriaceae</b>
<b>vorliegende Arbeit:</b>		
Fleischuntersuchung Tierkörper	4,8	38,1
Fleischuntersuchung Organe	4,5	47,6

Die absolute Belastung mit Enterobacteriaceae sowohl der Handflächen als auch der Kettenhandschuhe lag in der vorliegenden Arbeit etwa eine Logarithmusstufe über den Werten von DE WIT und KAMPELMACHER (1981 und 1982) für die dort untersuchten Handflächen, was auf eine schlechtere hygienische Handhabung der untersuchten Oberflächen hindeutet. Die prozentuale Belastung der Handflächen mit

Enterobacteriaceae bei DE WIT und KAMPELMACHER (1981) liegt jedoch mit 100% deutlich über allen anderen Vergleichsergebnissen.

Die prozentuale Belastung bei der Fleischuntersuchung der Tierkörper aus der vorliegenden Arbeit liegt mit 38,1% im Bereich der Ergebnisse von DE WIT und KAMPELMACHER (1982).

#### 4.2.2 Die qualitativen Ergebnisse (*Salmonella*)

Aus 24 der 1.638 untersuchten Proben der vorliegenden Arbeit wurden Salmonellen isoliert. Das entspricht einem Prozentsatz von 1,46%. Tabelle 4.6 zeigt ohne Berücksichtigung des originären Probenmaterials die Verteilung der Serovaren und der Phagentypen.

Aus drei der 24 positiven Proben wurden jeweils neben einer Rauform zusätzlich *S. Typhimurium* DT 120 bzw. *S. Infantis* isoliert (vergl. Kapitel 3.3.4.1 und Kapitel 4.2.3.3), so dass die Anzahl der aufgeführten Serovaren sich um drei auf 27 erhöht.

Tabelle 4.6: Verteilung der *Salmonella*-Serovaren und -Phagentypen in den untersuchten Proben

Serovar	Anzahl	Prozentualer Anteil [%]
<i>S. Infantis</i>	12	44,5
<i>S. ssp</i> I Rauform	6	22,2
<i>S. Typhimurium</i> DT120	5	18,5
<i>S. Enteritidis</i> PT 8	1	3,7
<i>S. Typhimurium</i> U 302	1	3,7
<i>S. Typhimurium</i> DT 104 B low	1	3,7
<i>S. Typhimurium</i> DT 104 L	1	3,7
	<b>27</b>	<b>100 %</b>

Die Angaben des Infektionsepidemiologischen Jahrbuchs meldepflichtiger Krankheiten für 2002 (RKI 2003) zeigen, dass sich das Auftreten der Serovaren bei dieser Untersuchung des Umfelds der Schweinefleischgewinnung nicht mit der Verteilung der Serovaren bei humanen Salmonellosen (*S. Enteritidis* 75%, *S. Typhimurium* 19%) deckt. STEINBACH und KROELL (1999) haben bei ihren Berechnungen den Anteil Schweinefleisch-bedingter humaner Salmonellosen an der Gesamtzahl humaner Salmonellosen mit 20% beziffert. Demnach kamen 80% der

Salmonellen, die humane Salmonellose auslösten, aus einer anderen Quelle als Schweinefleisch, was die Diskrepanz in der Serovarverteilung erklären kann.

HELMUTH et al. (2004) bezeichnen *S. Typhimurium* DT 104 als dominierende Serovar für Fleisch von Schwein, Rind und Kalb in Deutschland. Auch bei den Ergebnissen von DORN et al. (2004) zeigt sich eine Dominanz von *S. Typhimurium* DT 104, gefolgt von *S. Derby*. Unter den in Kapitel 2.1.1 dargestellten Fallberichten herrscht ebenfalls *S. Typhimurium* verschiedener Phagentypen als Ursache für Ausbrüche humaner Salmonellosen vor. Diese Ergebnisse spiegeln sich nicht in den hier gezeigten Daten wieder.

Die Dominanz von *S. Infantis* in der vorliegenden Arbeit deckt sich auch nicht mit der nahezu europaweiten Dominanz von *S. Typhimurium* (EU 2003). Lediglich in Dänemark wird derzeit *S. Infantis* als dritthäufigste Serovar isoliert. Eine Information darüber, ob die untersuchten Tiere aus Dänemark stammten, liegt jedoch nicht vor.

Die vorliegenden Ergebnisse (vergl. Tabelle 4.6) mit 44,5% *S. Infantis*, gefolgt von den Rauformen mit 22,2% und *S. Typhimurium* mit 25,9% (18,5% + 3,7% für DT 104 B low + 3,7% für DT 104 L) entsprechen eher den Daten der MEAT AND LIVESTOCK COMMISSION (2001). Hier wird aus einem (nord-) europäischen Vergleich von *Salmonella*-Infektionen bei Schweinen deutlich, dass zwar insgesamt in Europa *S. Typhimurium* und *S. Derby* vorherrschen, jedoch in Deutschland und Dänemark auch *S. Agona* und *S. Infantis* durchaus verbreitet sind.

Die Antibiotikaresistenz der vorliegenden Isolate war insbesondere vor dem Hintergrund allgemein zunehmender Antibiotikaresistenzen ein weiteres Merkmal zu deren Charakterisierung. Tabelle 4.7 gibt einen Überblick über das Auftreten von (Mehrfach-) Resistenzen unter den 38 verschiedenen Isolaten, die insgesamt aus den untersuchten Proben isoliert wurden.

Ein Vergleich mit den Ergebnissen von HELMUTH et al. (2004) zeigt teilweise Übereinstimmungen. Ähnlich der vorliegenden Arbeit waren bei HELMUTH et al. (2004) 36,9% der Isolate zweifach- bis multiresistent. Mit 40% waren weniger Isolate vollständig sensibel und mit 22% deutlich mehr Isolate einfach resistent. Mit den Isolaten, die bei HELMUTH et al. (2004) konkret vom Schwein oder aus

Lebensmitteln vom Schwein stammten (11% sensibel, 9,5% einfach und 79,5% mehrfach resistent), zeigte sich hingegen weniger Übereinstimmung.

Tabelle 4.7: Anzahl und Anteil von Resistenzen unter den *Salmonella*-Isolaten

<b>Resistenz</b>	<b>Anzahl</b>	<b>Prozentualer Anteil [%]</b>	
1-fach	4	10,5	10,5
2-fach	3	7,9	36,9
3-fach	0	0	
4-fach	8	21,1	
5-fach	2	5,3	
6-fach	0	0	
7-fach	1	2,6	
sensibel	20	52,6	52,6
	<b>38</b>	<b>100 %</b>	<b>100 %</b>

#### 4.2.2.1 Salmonellen auf den Oberflächen von Geräten

Mit zwei *Salmonella*-Nachweisen auf Messerklingen lag der prozentuale Anteil *Salmonella*-positiver Messer bei 0,3%. Die Messer stammten am 4. Probenahmetag von der Eviszeration der Bauchhöhle (*S. Typhimurium*) und am 9. Probenahmetag von der Position der Fleischuntersuchung der Organe (*S. ssp.* I Rauform). Bei der Eviszeration handelt es sich um eine Position, an der die Möglichkeit des Kontakts der Messer mit Magen-Darm-Inhalt besonders hoch ist. Der Nachweis auf den Messern spricht entweder für eine Nichtbenutzung der Sterilisationsbecken, eine zu kurze Verweildauer oder zu niedrige Temperaturen des Wassers. Da am 9. Probenahmetag in dem entsprechenden Sterilisationsbecken eine Keimbelastung von 3,59 log KbE/ml nachgewiesen wurde und die Wassertemperatur bei nur 50,3°C lag, liegt hier die unzureichend durchgeführte Reinigung und Desinfektion als Erklärung auf der Hand.

In den Wasserproben der Sterilisationsbecken konnten hingegen keine Salmonellen nachgewiesen werden. Vor dem Hintergrund der zwei Messer, die unmittelbar nach Entnahme aus dem Sterilisationsbecken *Salmonella*-positiv getestet wurden, kann jedoch das Vorkommen von Salmonellen in den Sterilisationsbecken nicht grundsätzlich ausgeschlossen werden.

Auch bei EINSCHÜTZ (2004) lagen die Wassertemperaturen der Sterilisationsbecken an den Positionen Eröffnen, Herz, Lymphknoten und Nachtrimmen vorwiegend unter den vorgeschriebenen 82°C, ein Wert ebenso nahe bei 50°C (55°C). Lediglich einer der 14 gemessenen Werte lag mit 95°C deutlich über 82°C. Auch fanden sich bei EINSCHÜTZ (2004) Hinweise auf inadäquate Nutzung der Sterilisationsbecken. Die Autorin konnte jedoch experimentell zeigen, dass für das Erreichen von Keimfreiheit auf künstlich kontaminierten Stahlträgern durchaus niedrigere Temperaturen geeignet sein können (z.B. 70°C Wassertemperatur, 10 sec Eintauchzeit).

Die Widrigkeiten in der Praxis, wie hoher Zeitdruck, unzureichende technische Ausstattung bzw. Durchführung der Reinigung und Desinfektion oder die mögliche Ansammlung organischer Substanzen im Sterilisationsbecken während des Prozessablaufes weisen hingegen klar hin auf die Notwendigkeit der Einführung von Reinigungs- und Desinfektionsmöglichkeiten mit kurzen Behandlungszeiten und niedrigen Temperaturen. Das Ergebnis der Reinigung und Desinfektion ließe sich etwa durch Ultraschall oder organische Säuren als zusätzlich Einfluss nehmende Faktoren verbessern (EINSCHÜTZ et al. 2004).

Die wenigen Angaben aus der Literatur zur *Salmonella*-Belastung von Messern in Schlachthöfen liegen höher als in der vorliegenden Arbeit. KAMPELMACHER et al. (1961) fanden Salmonellen auf 5% derjenigen Messer, die bei der Fleischuntersuchung zum Anschnitt von Lymphknoten verwendet wurden. Eine Begründung liegt möglicherweise darin, dass in der heutigen Vorgehensweise bei der Fleischuntersuchung das Anschneiden der Lymphknoten beim Schwein eher die Ausnahme darstellt.

Messer, die von PEEL und SIMMONS (1978) untersucht wurden, waren mit 57% (Einschneiden der Haut am Anus), 48% (nach Eintauchen desselben Messers in 82,2°C heißes Wasser) bzw. 48% (Durchschneiden der Muskulatur um das Rectum) deutlich höher mit Salmonellen kontaminiert als die hier untersuchten Messer. Die Nähe zum Rectum und damit ein deutlich höheres Risiko, mit Darminhalt in Berührung zu kommen, mögen hier ursächlich sein. Außerdem handelte es sich um Messer, die in der technologischen Gewinnung eingesetzt wurden und nicht bei der Kontrolle. Auch die bei PEEL und SIMMONS (1978) festgestellte 5%ige Belastung

der Messer, die bei der Eviszeration verwendet wurden, sowie die 15%ige Belastung mit Salmonellen bei der Position der Fleischuntersuchung war höher als in der hier vorliegenden Arbeit.

Bei LIMPITAKIS et al. (1999) lag die *Salmonella*-Belastung der untersuchten Messer vor Schlachtbeginn bei 3,6% und nach Schlachtende bei 2,8% und damit ebenfalls höher als bei den hier gezeigten Ergebnissen.

Von den Beilen konnte kein *Salmonella*-Nachweis im Bereich der Tierkörperspaltung geführt werden. Dies lässt sich damit erklären, dass der Rückenspeck möglicherweise geringer kontaminiert sein kann als die Bauchflächen.

Vergleichbare Untersuchungen zum handgeführten Beil sind dem Quellenmaterial nicht zu entnehmen, möglicherweise da der Grad der Mechanisierung in der Fleischgewinnung ständig zunimmt. Studien zur *Salmonella*-Belastung von Sägeblättern bei Bandsägen zeigen beträchtliche Kontaminationen: VON ALTROCK et al. (1999) fanden 6,7% der Sägeblätter mit *Salmonella* belastet. Bei SWANENBURG et al. (2001) waren 22% der untersuchten Proben von Bandsägen in zwei Schlachthöfen *Salmonella*-belastet. Bei THORBERG und ENGVALL (2001) hingegen konnte von den Sägeblättern der untersuchten Bandsäge (ebenso wie von anderen Umfeldproben) kein Salmonellen-Nachweis geführt werden.

Es konnten auch hier möglicherweise deshalb keine Salmonellen auf den Beilen nachgewiesen werden, weil (wie bereits an anderer Stelle als Begründung angeführt) das Handgerät regelmäßig und gründlich abgespült und abgerieben wurde. Die Ablagerung von Fleisch- und Fettresten, in denen Mikroorganismen sich bevorzugt anlagern, wurde damit möglicherweise verhindert.

Die *Salmonella*-Belastung der Handflächen und Kettenhandschuhe lag bei 5%. Die fünf Isolate stammen von den Kettenhandschuhen der Positionen Fleischuntersuchung der Tierkörper: 11. Probenahmetag (*S. Typhimurium* DT 104 L und *S. ssp I* Rauform) sowie 13. Probenahmetag (*S. Typhimurium* DT 120) und Fleischuntersuchung der Organe 13. Probenahmetag (*S. Typhimurium* DT 120). Von den Handflächen bei der Position Eviszeration wurde am 13. Probenahmetag vorwiegend *S. Typhimurium* DT 120 sowie *S. ssp I* Rauform nachgewiesen.

Diese Belastung entspricht den von SWANENBURG et al. (2001) und bei RHEAULT und QUESSY (1999) ermittelten Ergebnissen (5% bzw. 5,1%) und liegt auch in dem

Bereich der Ergebnisse (6,7%) von GAREIS et al. (1996). Ansonsten streuen die Angaben zur Kontamination von Handflächen in der Literatur breit. LIMPITAKIS et al. (1999) fanden vor Schlachtbeginn auf 2,7% und nach Schlachtende auf 6,8% der untersuchten Handflächen Salmonellen. Deutlich höhere Zahlen ergaben die Untersuchungen von DE WIT und KAMPELMACHER (1981 und 1982), die auf 30% bzw. 36% der untersuchten Handflächen von Schlachthofmitarbeitern Salmonellen nachwies. HALD et al. (1999) zeigten, dass der Grad der Kontamination des Umfeldes der Fleischgewinnung beim Schwein (und auch der Handflächen) von Betrieb zu Betrieb schwankt. In fünf Betrieben verliefen alle Untersuchungen diverser Tierkörper-, Organ- und auch Umfeldproben auf Salmonellen negativ, in sieben weiteren Betrieben schwankte die *Salmonella*-Kontamination zwischen 6,3 und 35,9% bei einem Mittelwert von 11,7%. Bei NORTJE et al. (1991) sowie THORBERG und ENGVALL (2001) konnten keine Salmonellen auf den untersuchten Händen nachgewiesen werden. VON ALTROCK et al. (1999) wiesen an den Positionen Afterausschnitt, Eviszeration und Fleischuntersuchung auf den Händen keine Salmonellen nach, bei der Entfernung der Tonsillen dagegen waren 0,7% der Handflächen positiv.

Eine Zusammenstellung der Salmonellen, die in der eigenen Arbeit von den Oberflächen der untersuchten Handgeräte isoliert werden konnten, ist in Tabelle 4.8. wiedergegeben.



Tabelle 4.8: Auftreten und Charakteristika von *Salmonella*-Isolaten auf Handgeräten in der Fleischgewinnungslinie

Probenmaterial	Probenahme-tag	Probenahmeposition	Charakteristika von <i>Salmonella</i> -Isolaten			
			Serovar	Phagentyp <sup>1</sup>	Resistenzen <sup>2</sup>	PFGE-Muster
Messer	4	Eviszeration, vor Gebrauch	S. Typhimurium	DT 104B low	AMP/C/S/SU/ SXT/TE/W	X6/B10/Sp9
	9	Fleischuntersuchung Organe	S. ssp. I Rauform		AMP/K/S/SU	X1-1/B1-1/Sp1-1
Beil	-	-	-			
Kettenhandschuh	11	Fleischuntersuchung Tierkörper	S. Typhimurium	DT 104L	AMP/S/SU/TE,	X6/B10/Sp9
	13	Fleischuntersuchung Tierkörper	S. Typhimurium	DT 120	AMP/S/SU/TE,	X1/B1/Sp1
	13	Fleischuntersuchung Organe	S. Typhimurium	DT 120	AMP/S/SU/TE,	X1/B1/Sp1
	13	Fleischuntersuchung Organe	S. ssp. I Rauform	-	AMP/S/SU/TE,	X1/B1/Sp1
	13	Eviszeration	S. Typhimurium	DT 120	AMP/S/SU/TE,	X1/B1/Sp1
Handfläche	13	Eviszeration	S. ssp. I Rauform	-	AMP/S/SU/TE,	X1/B1/Sp1
	14	Eviszeration	S. Infantis,	-	sensibel	X3-2/B3/Sp3
	14	Eviszeration	S. Infantis, ,	-	sensibel	nicht anzüchtbar für die PFGE
	14	Eviszeration	S. Infantis,	-	TE,	X3/B3/Sp3
	14	Eviszeration	S. Infantis,	-	TE,	nicht anzüchtbar für die PFGE
	14	Eviszeration	S. Infantis,	-	TE,	nicht anzüchtbar für die PFGE

<sup>1</sup> soweit bestimmt<sup>2</sup> AMP= Ampicillin; C= Chloramphenicol; K= Kanamycin; S= Streptomycin; SU= Sulfonamid; SXT= Sulphamethoxazol/Trimethoprim; TE= Tetracyclin; W= Trimethoprim

#### **4.2.2.2 Salmonellen auf Oberflächen und Organen der geschlachteten Tiere**

Die zum Teil erheblichen Unterschiede in Studienaufbau, Technik, Umfang und Zeitpunkt der Probenahme sowie Aufbereitung der Proben und Auswertungsmethode machen die Ergebnisse von Studien zur Prävalenz von Salmonellen beim Schwein nur begrenzt vergleichbar (BAGGESEN et al. 1996, LETELLIER et al. 1999, SWANENBURG et al. 2001), es sei denn, es handelt sich um aufeinander folgende Untersuchungen einer Autorengruppe, wie z.B. FEHLHABER et al. (1996). Ebenso liegt meist keine einheitliche Wahl des Probenmaterials vor, da die Autoren die Aussagekraft einzelner Probenmaterialien unterschiedlich bewerten.

OFFERMANN et al. (1998) wählten die Mesenterial-Lymphknoten als alleiniges Untersuchungsmaterial für ihre Studie, da diese als Prädilektionsorgan für Salmonellen im Schwein gelten. Auch McCAUGHEY et al. (1973) empfehlen die Untersuchung von Lymphknoten zur Erhebung der *Salmonella*-Prävalenz beim Schwein, um bei den untersuchten Tieren auch latente Infektionen erfassen zu können. Die Autoren zeigten, dass bei 1,3% *Salmonella*-positiver Fäzesproben in 6% der zugehörigen Lymphknoten Salmonellen nachweisbar waren (McCAUGHEY et al. 1973).

Derartige Unterschiede zwischen den Studien müssen nachfolgend unberücksichtigt bleiben, um bei den wenigen vorliegenden ähnlichen Studien überhaupt einen Bezug herstellen zu können. Kriterium für einen Vergleich bleibt die übereinstimmende Probenauswahl.

In der vorliegenden Arbeit weisen Tonsillen mit 5,1% den im Vergleich höchsten Anteil *Salmonella*-positiver Organ- bzw. Tierkörperteile auf. Eine ähnlich hohe Belastung der Tonsillen (5,3%) zeigte die Studie von BONARDI et al. (2003), bei der in Italien 150 Schlachttiere untersucht wurden. Die Autoren weisen darauf hin, dass es während der Entfernung von Salmonellen möglicherweise zu einer Verteilung von Salmonellen auf der Karkasse kommen kann. Die Salmonellen Belastung der Tonsillen von Schlachtschweinen in den Niederlanden lag nach SWANENBURG et al. (2001) mit 19,6% (n= 1.114) deutlich höher. Bei FRIES et al. (2002) lagen die Ergebnisse der 146 gepoolten *Salmonella*-Untersuchungen der Tonsillen von

Schweinen eines Mäster-Verbandes bei 17,1%. Die Autoren wiesen darauf hin, dass die Tonsillen als lymphatisches Gewebe im Verdauungstrakt eine erste Barriere gegen eindringende Mikroorganismen darstellen und so unabdingbar mit dem Erreger in Kontakt kommen. Tonsillen sind nach FRIES et al. (2001) als Probenmaterial geeignet für die Untersuchung auf Salmonellen.

Weitere Studien im wissenschaftlichen Schrifttum beziehen sich auf das Vorkommen von Salmonellen in Tonsillen von experimentell infizierten Schweinen (WOOD et al. 1989; WOOD et al. 1991) und können daher hier nicht zum Vergleich herangezogen werden.

Dies gilt ebenso für Vergleichswerte zu der Belastung der Mandibularlymphknoten und des Herzens (WOOD et al. 1991). Bei den Untersuchungen von Lymphknoten sind zudem vorwiegend Mesenteriallymphknoten untersucht worden. Zu Mandibularlymphknoten liegen keine Vergleichswerte vor.

Die zweithöchste *Salmonella*-Kontamination der hier gezeigten Untersuchung wiesen die Bauchlappen auf. Vergleichbare Daten aus anderen Studien liegen nicht vor. Die Tatsache, dass auch diese Bauchlappen mit Salmonellen behaftet waren, weist wiederholt darauf hin, dass es im Laufe der Fleischgewinnung bei der Eviszeration zu Havarien gekommen sein muss, durch welche die Bauchlappen direkt oder indirekt mit Salmonellen kontaminiert werden konnten. So werden erneut BERENDS et al. (1997) darin bestätigt, dass von der Eviszeration ein besonderes Risiko für die gesundheitliche Unbedenklichkeit des Schweinefleisches ausgeht.

Im Gegensatz zu allen anderen untersuchten Tierkörperteilen war der Rückenspeck nicht mit Salmonellen kontaminiert, was auch hier mit der niedrigen Enterobacteriaceae-Belastung und der geringen Gefahr einer Kontamination im Falle einer Havarie erklärt werden kann.

### **4.2.3 Verteilung von *Salmonella* in der Fleischgewinnungslinie beim Schwein**

Im Gegensatz zu der Darstellung des Auftretens von *Salmonella*-Isolaten (ja/nein) auf den untersuchten Tierkörpern, Tierkörperteilen und berührenden Geräteoberflächen in Kapitel 4.2.2 wird in diesem Kapitel gezielt die Anwesenheit und Übertragung von *Salmonella* in der Fleischgewinnungslinie vor dem Hintergrund ihrer phänotypischen und genotypischen Identizität diskutiert. Zunächst wird ein möglicherweise gehäuftes Auftreten innerhalb einzelner Probenahmetage (Kapitel 4.2.3.1) sowie ein wiederholtes Auftreten an verschiedenen Tagen während des ganzen Probenahmezeitraums betrachtet (Kapitel 4.2.3.2). Kapitel 4.2.3.3 behandelt das Vorkommen verschiedener Isolate in einer Probe. Die Interpretation des Auftretens von (identischen) *Salmonella*-Isolaten in den Arbeitsabläufen der Fleischgewinnung mit dem Bezug zu einzelnen Tierkörpern an einzelnen Probenahmetagen erfolgt in Kapitel 4.3.2.4.

Für den Anwesenheit von Salmonellen in einer Fleischgewinnungslinie kommt als wichtige Eintragsquelle das Tier, in dem vorliegenden Fall das Schwein, in Frage (BERENDS et al. 1997). Wie SOERENSEN et al. (1999) zeigten, kann es sich bei *Salmonella*-Nachweisen auf Geräteoberflächen um eine Hausflora handeln, die für eine kontinuierliche Kontamination der Tierkörper- und Geräteoberfläche sorgt. Dieser Frage wird im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht nachgegangen, da sich die Betrachtungen auf die Verteilung und Verschleppung von Salmonellen in der Fleischgewinnungslinie fokussiert, *nachdem* der Eintrag von Salmonellen erfolgt ist. Zudem würde auch der Versuchsaufbau eine solche Aussage, wie sie z.B. bei SOERENSEN et al. (1999) oder HALD et al. (1999) getroffen wurde, nicht zulassen. Hierzu wären z.B. Probenahmen von den Geräteoberflächen auch vor Arbeitsbeginn notwendig gewesen.

#### **4.2.3.1 Auftreten von *Salmonella* innerhalb eines Probenahmetages**

Um Häufungen, Verwandtschaften und Identitäten der Isolate innerhalb einzelner Probenahmetage bemerken zu können, werden die phänotypischen Merkmale der

Isolate in den Tabellen 4.9 bis 4.12 in Kombination mit den Ergebnissen der Restriktionsanalyse unabhängig von dem originären Probenmaterial dargestellt.

Wie auch der Tabelle 3.19 zu entnehmen ist, wurden an den Probenahmetagen 1, 2, 3, 5, 7 und 8 keine Salmonellen isoliert. An den Tagen 4, 6, 11 und 12 wurde jeweils nur ein Isolat von einer einzigen Probenahme-position nachgewiesen, so dass diese Tage in der folgenden Darstellung nicht aufgeführt werden.

Für eine detaillierte Aufstellung der unterschiedlichen Isolate von verschiedenen Positionen kommen die nachfolgend dargestellten Probenahmetage 9, 10, 13 und 14 in Frage.

Am **9. Probenahmetag** (vergl. Tabelle 4.9) wurde als einzige Serovar *S. ssp. I* Rauform gefunden. Die drei Isolate unterschieden sich im Resistenzverhalten und bei den PFGE-Mustern. Die beiden Proben identischer Herkunft (Durchgang 9/ Probennummer 47) wiesen gleiches Resistenzverhalten (AMP/K/S/SU/TE) auf, unterschieden sich jedoch bei XbaI im dargestellten Bandenmuster nach TENOVER et al. (1995) in den Folgen jeweils nur eines genetischen Ereignisses. Mit Spel konnten zwei eigenständige Hauptmuster dargestellt werden.

Bei dem Isolat 9/5 war das PFGE-Muster mittels Spel identisch mit dem Muster eines der Isolate mit der Bezeichnung 9/47; die Bandenmuster mit den Enzymen XbaI und BlnI unterschieden sich von beiden anderen Isolaten dieses Durchgangs jeweils in den Folgen eines genetischen Ereignisses und sind somit nach TENOVER et al. (1995) nahe verwandt. Es ist nicht nachzuvollziehen, ob die Mutationen, die für die Unterschiede in den Bandenmustern ursächlich sind, in der Tat schon bei der Isolierung vorhanden waren und somit ein Indiz für die Unterschiedlichkeit der Stämme darstellen. Ebenso wäre es denkbar, dass die Veränderungen in vitro bei der Lagerung oder Subkultivierung während der Untersuchungen entstanden sind (MURASE et al. 1996). Hier wird eine Identität als wahrscheinlich gesehen, dies vor dem Hintergrund der bekannten Homogenität von *Salmonella* und den gegebenen Lagerungszeiten.

Fazit: Vor dem Hintergrund, dass Resistenzen umweltbedingt verloren und erworben werden können, wurden die Isolate von Probenahmetag 9 einem gemeinsamen genetischen Ursprung zugeordnet.

Tabelle 4.9: Phänotypische und genotypische Merkmale der Salmonellen an Probenahmetag 9

<b>Probe- nahmetag/ -nummer</b>	<b>Serovar Phagentyp</b>	<b>Resistenzmuster</b>	<b>PFGE-Muster</b>
<b>9/47*</b>	<i>S. ssp. I</i> Rauform	AMP/K/S/SU/TE	X1-2/B1/Sp1-1
<b>9/47*</b>	<i>S. ssp. I</i> Rauform	AMP/K/S/SU/TE	X1/B1/Sp2
<b>9/5</b>	<i>S. ssp. I</i> Rauform	AMP/K/S/SU	X1-1/B1-1/Sp1-1

\* aus einer Probe stammende, unterschiedliche Isolate; vergl. Kapitel 4.2.3.3

Am **10. Probenahmetag** waren die untersuchten *S. Infantis*-Stämme gegenüber den getesteten Antibiotika vorwiegend empfindlich und verfügten über identische Restriktionsmuster (X3/B3/Sp3).

*S. Infantis* 10/101 war resistent gegenüber Sulfonamid und zeigte das Bandenmuster X3/B-3-1/Sp3. Die *S. Infantis*-Isolate mit den Bezeichnungen 10/103, 10/105 und 10/110 verfügten sowohl über identisches Resistenzverhalten (SU/TE) als auch über identische Bandenmuster in der Restriktionsanalyse (X3/B3-2/Sp3). Diese Isolate sind unter Verwendung der Kriterien von TENOVER et al. (1995) nahe verwandt.

Bei den Isolaten vom 10. Probenahmetag (vergl. Tabelle 4.10) zeigten sich bei der Untersuchung der Isolate mit den Enzymen XbaI und SpeI vollständige Übereinstimmungen. Lediglich nach der Untersuchung mit BlnI konnten kleine Abweichungen bei gleichbleibendem Hauptmuster dargestellt werden (Nummer 10/101, 10/103, 10/105, 10/110). Die Isolate können unter Berücksichtigung der genannten Homogenität von Salmonellen, lagerungsbedingten Einflüssen und dem identischen Probenumfeld (TENOVER et al. 1995; MURASE et al. 1996) einem übereinstimmenden genetischen Ursprung zugeordnet werden.

Tabelle 4.10: Phänotypische und genotypische Merkmale der Salmonellen an Probenahmetag 10

<b>Probe-nahmetag/-nummer</b>	<b>Serovar Phagentyp</b>	<b>Resistenzmuster</b>	<b>PFGE-Muster</b>
10/49	<i>S. Infantis</i>	sensibel	X3/B3/Sp3
10/92	<i>S. Infantis</i>	sensibel	X3/B3/Sp3
10/93	<i>S. Infantis</i>	sensibel	X3/B3/Sp3
10/101	<i>S. Infantis</i>	SU	X3/B3-1/Sp3
10/103	<i>S. Infantis</i>	SU/TE	X3/B3-2/Sp3
10/105*	<i>S. Infantis</i>	sensibel	X3/B3/Sp3
10/105*	<i>S. Infantis</i>	SU/TE	X3/B3-2/Sp3
10/110	<i>S. Infantis</i>	SU/TE	X3/B3-2/Sp3

\* aus einer Probe stammende, unterschiedliche Isolate; vergl. Kapitel 4.2.3.3

Am **13. Probenahmetag** (vergl. Tabelle 4.11) wurden *S. Typhimurium*-Isolate der Phagentypen DT 120 und U 302 sowie *S. ssp. I* Rauform nachgewiesen. Alle *S. Typhimurium* DT 120 Isolate sowie die Stämme in Rauform verfügten über ein einheitliches Antibiogramm und identische PFGE-Muster (AMP/S/SU/TE; X2/B1/Sp1) und sind somit jeweils vollständig identisch und einem gemeinsamen Ursprung zuzuordnen.

*S. Typhimurium* U302-Isolate ist vollständig sensibel gegenüber den getesteten Antibiotika und verfügt über das PFGE-Muster X4/B4/Sp5. Nach DORN et al. (2004) konnte seit 1997 *Salmonella Typhimurium* U302 im Bundesinstitut für Risikobewertung in Deutschland nur in 13 Fällen beim Schwein oder aus Schweinefleischprodukten isoliert werden. Der hier gelungene singuläre Nachweis hat für Deutschland demnach Seltenheitswert, ist jedoch für die Epidemiologie der Salmonellen in der hier untersuchten Fleischgewinnungslinie ohne Bedeutung.

Tabelle 4.11: Phänotypische und genotypische Merkmale der Salmonellen an Probenahmetag 13

<b>Probe-nahmetag/-nummer</b>	<b>Serovar Phagentyp</b>	<b>Resistenzmuster</b>	<b>PFGE-Muster</b>
<b>13/46</b>	<i>S. Typhimurium</i> DT 120	AMP/S/SU/TE	X1/B1/Sp1
<b>13/60*</b>	<i>S. Typhimurium</i> DT 120	AMP/S/SU/TE	X1/B1/Sp1
<b>13/60*</b>	<i>S. ssp. I</i> Rauform	AMP/S/SU/TE	X1/B1/Sp1
<b>13/61</b>	<i>S. Typhimurium</i> DT 120	AMP/S/SU/TE	X1/B1/Sp1
<b>13/62*</b>	<i>S. Typhimurium</i> DT 120	AMP/S/SU/TE	X1/B1/Sp1
<b>13/62*</b>	<i>S. ssp. I</i> Rauform	AMP/S/SU/TE	X1/B1/Sp1
<b>13/110</b>	<i>S. Typhimurium</i> U 302	sensibel	X4/B4/Sp5

\* aus einer Probe stammende, unterschiedliche Isolate; vergl. Kapitel 4.2.3.3



Die *Salmonella*-Isolate vom **14. Probenahmetag** (vergl. Tabelle 4.12) erwiesen sich durchgehend als *S. Infantis* oder als *S. ssp. I* Rauform. Die Reaktion auf die getesteten Antibiotika war, mit zwei Ausnahmen, vollständig sensibel.

Tabelle 4.12: Phänotypische und genotypische Merkmale der Salmonellen an Probenahmetag 14

Probe- nahmetag/ -nummer	Serovar Phagentyp	Resistenzmuster	PFGE-Muster
14/46*	<i>S. ssp. I</i> Rauform	sensibel	nicht mehr anzüchtbar
14/46*	<i>S. ssp. I</i> Rauform	sensibel	X3-1/B3/Sp3-1
14/46*	<i>S. Infantis</i>	sensibel	X3-1/B3/Sp3-1
14/47*	<i>S. ssp. I</i> Rauform	sensibel	nicht mehr anzüchtbar
14/47*	<i>S. ssp. I</i> Rauform	sensibel	X3-1/B3/Sp3-1
14/60*	<i>S. Infantis</i>	sensibel	X3-2/B3/Sp3
14/60*	<i>S. Infantis</i>	sensibel	nicht mehr anzüchtbar
14/60*	<i>S. Infantis</i>	TE	X3/B3/Sp3
14/60*	<i>S. Infantis</i>	TE	nicht mehr anzüchtbar
14/91	<i>S. Infantis</i>	sensibel	X3-2/B3/Sp3
14/104	<i>S. Infantis</i>	sensibel	nicht mehr anzüchtbar
14/104	<i>S. Infantis</i>	sensibel	nicht mehr anzüchtbar
14/111*	<i>S. Infantis</i>	sensibel	nicht mehr anzüchtbar
14/111*	<i>S. Infantis</i>	sensibel	X3-2/B3/Sp3

\* aus einer Probe stammende, unterschiedliche Isolate; vergl. Kapitel 4.2.3.3

Alle anzüchtbaren Isolate vom 14. Probenahmetag zeigten mit dem Makrorestriktionsenzym BlnI identische Bandenmuster (B3).

Die PFGE-Muster der Isolate vom 14. Probenahmetag mit den Probennummern 46 und 47 (*S. ssp. I* Rauform und *S. Infantis*) stimmten in den PFGE-Mustern auf der Grundlage aller verwendeten Enzyme überein (X3-1/B3/Sp3-1).

Isolate mit den Probennummern 14/60, 15/91 und 14/111 (*S. Infantis*) zeigten ein identisches Bandenmuster (X3-2/B3/Sp3), welches sich bei Verwendung der Enzyme XbaI und SpeI jeweils in den Folgen eines genetische Ereignisses nach TENOVER et al. (1995) um eine Bande von dem Muster der Isolate 14/46 und 14/47 (X3-1/B3/Sp3-1) unterschied, jedoch über gleiche Hauptmuster verfügt.

Zwei *S. Infantis*-Isolate mit der Probennummer 60 zeigten eine Einfach-Resistenz gegen Tetracyclin. Die dazugehörigen Bandenmuster (X3/B3/Sp3) unterschieden sich von den Mustern der anderen am gleichen Tag isolierten Stämme bei den Enzymen XbaI und SpeI jeweils in Folge eines genetischen Ereignisses.

Angesichts des massiven und ausschließlichen Auftretens dieser Serovar an diesem Probenahmetag und der Tatsache, dass alle Isolate über gleiche Hauptmuster verfügen, liegt es nahe, dass die *S. Infantis*-Isolate der unterschiedlichen Probenahmepositionen über ein und dieselbe Quelle in die Fleischgewinnungslinie gelangt und einem gemeinsamen genetischen Ursprung zuzuordnen sind.

#### **4.2.3.2 Wiederholtes Auftreten von *Salmonella* an verschiedenen Probenahmetagen**

Ein wiederholtes Auftreten phänotypisch und genotypisch vollständig identischer Salmonellen an verschiedenen (nachfolgenden) Probenahmetagen (PNT) konnte (im Gegensatz zu den gezeigten Übereinstimmungen innerhalb eines Tages) nicht festgestellt werden. Die Unterschiede zwischen einzelnen Isolaten von unterschiedlichen Probenahmetagen beliefen sich jedoch teilweise lediglich auf das Resistenzmuster oder Variationen des PFGE-Musters innerhalb eines Hauptmusters. Solche Isolate können, wie in Kapitel 4.2.3.1 diskutiert, dann einem gemeinsamen genetischen Ursprung zugeordnet werden, wenn sie aus einem gemeinsamen Umfeld stammen (Ort, Zeitpunkt). In Tabelle 4.13 sind entsprechende Isolate von unterschiedlichen Probenahmetagen aufgeführt, um die mögliche Zuordnung zu einem gemeinsamen Ursprung vor dem Hintergrund der unterschiedlichen Probenahmezeitpunkte diskutieren zu können.

Es waren vergleichbare Isolate vom 6. und 13. Probenahmetag, vom 10. und 14. sowie vom 4. und 11. Probenahmetag darstellbar. Die übrigen *Salmonella*-Stämme (vergl. Tabelle 3.19), wie *S. Enteritidis* vom 12. Probenahmetag und *S. Typhimurium* U 302, traten nicht wiederholt auf, so dass hier ein entsprechender Vergleich entfällt.

Tabelle 4.13: Vergleich von Isolaten von unterschiedlichen Probenahmetagen

Tag	Position	Serovar und Phagentyp	Resistenz	PFGE-Muster
6	Tonsillen, FIU Tierkörper	S. Typhimurium DT 120	TE	X1/B1-3/Sp1
13	Bauchlappen, Eviszeration; Handfläche, Eviszeration; KHS, FIU Tierkörper; KHS, FIU Organe	S. Typhimurium DT 120	AMP/S/SU/TE	X1/B1/Sp1
13	Handfläche, Eviszeration; KHS, FIU Organe	S. ssp. I Rauform	AMP/S/SU/TE	X1/B1/Sp1
10	Bauchlappen, FIU Tierkörper; Herz (Anschnitt); Tonsillen, FIU Tierkörper;	S. Infantis	sensibel	X3/B3/Sp3
10	Herz (Gesamt)	S. Infantis	SU	X3/B3-1/Sp3
10	Herz (Gesamt); Tonsillen, FIU Tierkörper	S. Infantis	SU/TE	X3/B3/Sp3
14	Bauchlappen, Eviszeration; Bauchlappen, FIU Tierkörper	S. ssp. I Rauform	sensibel	nicht mehr anzüchtbar für die PFGE
14	Bauchlappen, Eviszeration; Bauchlappen, FIU Tierkörper	S. ssp. I Rauform	sensibel	X3-1/B3/Sp3-1
14	Bauchlappen, Eviszeration;	S. Infantis	sensibel	X3-1/B3/Sp3-1
14	Handfläche, Eviszeration; Herz (Gesamt); Lymphknoten	S. Infantis	sensibel	X3-2/B3/Sp3
14	Handfläche, Eviszeration	S. Infantis	TE	X3/B3/Sp3
14	Handfläche, Eviszeration	S. Infantis	TE	nicht mehr anzüchtbar für die PFGE
14	Handfläche, Eviszeration; Tonsillen, FIU Tierkörper: Lymphknoten	S. Infantis	sensibel	nicht mehr anzüchtbar für die PFGE
4	Messer; v.G., Eviszeration	S. Typhimurium DT 104B low	AMP/C/S/SU/SXT/TE/W	X6/B10/Sp9
11	KHS, FIU Tierkörper	S. Typhimurium DT 104L	AMP/S/SU/TE	X6/B10/Sp9

v.G. = Vor Gebrauch; FIU = Fleischuntersuchung; KHS = Kettenhandschuh

Die hier aufgeführten Isolate vom **6. und vom 13. Probenahmetag** verfügen zwar über identische Hauptmuster (X1, B1, Sp1), können aber dennoch keinem gemeinsamen Ursprung zugeordnet werden. Die Probenahmetermine (6.08.1999 und 21.01.2000) liegen mit einem Abstand von fünf Monate zwar innerhalb der Spanne von einem Jahr, die TENOVER et al. (1995) bei epidemiologischen Betrachtungen von Isolaten für den Probenahmezeitraum angibt. WEIGEL et al. (2004) hingegen halten es jedoch angesichts genetischer Veränderungen mikrobieller Populationen bereits nach einem Monat für unwahrscheinlich, wirklich genetisch verwandte Isolate zu finden. Da Resistenzen in der Regel Plasmid-codiert

sind, können die unterschiedlichen Resistenzmuster durch Umwelteinflüsse induziert worden sein, ohne die PFGE-Muster zu beeinflussen. Ebenso kann die Ausbildung der Rauform des Isolats vom 13. Probenahmetags äußere Umwelteinflüsse widerspiegeln. Es liegen zudem keine Informationen über eine möglicherweise gleiche Herkunft der Tiere beim sechsten und 13. Probenahmetag vor.

Auch beim **10. und 14. Probenahmetag** liegen die Termine (8.11.1999 und 14.02.2000) nach WEIGEL et al. (2004) zu weit auseinander, um die Ergebnisse in einen gemeinsamen epidemiologischen Zusammenhang zu stellen. Auch in diesem Fall liegen keine Informationen über eine denkbarer Weise gleiche Herkunft der Tiere vor. Die im Vergleich mit anderen Probenahmetagen größere Anzahl von Isolaten mit geringen Abweichungen weist auf starke Umwelteinflüsse hin, die Ursache für die Entstehung von Rauformen oder Resistenzverlust bzw. -gewinn sein können. Die Abfolge der molekularbiologischen Aufbereitung ergab zudem für die Isolate vom 14. Probenahmetag die längste Lagerung, was nach MURASE et al. (1996) Einfluss auf die PFGE-Muster nehmen kann.

Für die Isolate vom **4. und 11. Probenahmetag** kann trotz der Übereinstimmung der genotypischen Identität der Isolate kaum ein gemeinsamer Ursprung angenommen werden. *S. Typhimurium* DT 104 ist in Nordeuropa weit verbreitet (MEAT & LIVESTOCK COMMISSION 2001) und so klonal, dass die Abwesenheit von Unterschieden bei der PFGE nicht automatisch Identität bedeuten muss. Demzufolge kann beispielsweise die Infektion zweier Schweineherden mit unterschiedlichen *S. Typhimurium* DT 104-Stämmen stattgefunden haben, die dennoch in der PFGE ein einheitliches Bild zeigen. Zudem hat sich die PFGE zur Feintypisierung von *S. Typhimurium* DT 104 bei MALORNY et al. (2001) als unzureichend erwiesen, so dass die untersuchten Isolate möglicherweise unterschiedlich sind, diese Unterschiede aber mit der PFGE hier nicht erfasst werden konnten.

Auch wenn also an verschiedenen Tagen Isolate wiederholt auftraten, die unter Berücksichtigung der Klonalität von Salmonellen und den Ergebnissen von MURASE et al. (1996) auf einen gemeinsamen genetischen Ursprung hinweisen können, lässt sich kein Zusammenhang zwischen den Isolaten von verschiedenen Probenahmetagen darstellen. Der zeitliche Abstand des Auftretens vergleichbarer

Isolate ist nach WEIGEL et al. (2004) zu groß, um einen gemeinsamen epidemiologischen Hintergrund zu unterstellen. Dies wäre jedoch nach TENOVER et al. (1995) und WEIGEL et al. (2004) Voraussetzung, um eine gleiche genetische Herkunft anzunehmen.

Es ist jedoch denkbar, dass sich zumindest über einen Probenahmetag hinweg die charakterisierten Stämme als eine Art Hausflora etablieren konnten. Diese Vermutung kann mit dem hier beschriebenen methodischen Vorgehen weder bestätigt noch ausgeschlossen werden.

#### **4.2.3.3 Wiederholtes Auftreten von *Salmonella* in einer Probe**

Aus einzelnen Proben konnten im Laufe der Identifizierung mehrere Isolate aus einer Probe angezüchtet werden, deren Herkunft in Tabelle 4.14 aufgeführt ist. Die Isolate aus einer Probe waren nicht immer identisch: Die Abweichungen zeigten sich zunächst bei der Serovarbestimmung, wo z.T. nur Rauformen dargestellt werden konnten. Ebenso waren abweichende Resistenz- und PFGE-Muster in den unterschiedlichen Isolaten aus einer Probe zu erkennen. Bei Isolaten, die für die PFGE nicht mehr anzüchtbar waren, kann ein Unterschied zumindest nicht ausgeschlossen werden.

Tabelle 4.14: Unterschiedliche *Salmonella*-Isolate aus einer Probe  
(vergl. Tabelle 3.19)

Probenahmetag/ -nummer	Serovar	Probenmaterial (Probenposition)	Unterscheidung in folgendem Merkmal
9/47	<i>S. ssp. I</i> Rauform	Bauchlappen (FIU Tierk.)	PFGE-Muster
10/105	<i>S. Infantis</i>	Tonsillen	Resistenzmuster, PFGE
13/60	<i>S. Typhimurium</i> DT120, <i>S. ssp. I</i> Rauform	Handflächen	Serovar
13/62	<i>S. Typhimurium</i> DT120, <i>S. ssp. I</i> Rauform	Kettenhandschuh (FIU Organe)	Serovar
14/46	<i>S. Infantis</i> , <i>S. ssp. I</i> Rauform	Bauchlappen (Eviszeration)	Serovar, PFGE ? <sup>1</sup>
14/47	<i>S. ssp. I</i> Rauform	Bauchlappen (FIU Tierk.)	PFGE ? <sup>1</sup>
14/60	<i>S. Infantis</i>	Handfläche	Resistenz, PFGE (?) <sup>1</sup>
14/104	<i>S. Infantis</i>	Tonsillen	PFGE? <sup>1</sup>
14/111	<i>S. Infantis</i>	Lymphknoten	PFGE ? <sup>1</sup>

FIU = Fleischuntersuchung, Tierk. = Tierkörper

<sup>1</sup> Die Isolate waren für die PFGE nicht mehr anzüchtbar. Ein Unterschied der entsprechenden Enzymmuster kann nicht ausgeschlossen werden.

Derartige Ergebnisse bestätigen die Forderung von MURASE et al. (1996) und WONDERLING et al. (2003), bei epidemiologischen Betrachtungen im Schlachthof aus einer Probe mehrere Isolate zu untersuchen. Die zuletzt genannten Autoren hatten in 54% ihrer Proben mehr als einen *Salmonella*-Typ auf den untersuchten Schweinekarkassen nachweisen können. Bei der Unterscheidung der Isolate kam dann als genotypische Untersuchungsmethode die PFGE mit dem Enzym XbaI zum Einsatz. In der vorliegenden Arbeit wurden in 37,5% der Proben mehrere unterschiedliche Isolate dargestellt.

#### 4.2.3.4 Wiederholtes Auftreten von *Salmonella* in den Arbeitsabläufen der Fleischgewinnungslinie

Im Unterschied zu Kapitel 4.3.2.2, in dem der Fokus auf den Übereinstimmungen der Isolate eines Probenahmetages liegt, wird in diesem Kapitel das ursprüngliche Probenmaterial der Isolate berücksichtigt. Betrachtet wird das Auftreten von Salmonellen eines möglichen gemeinsamen genetischen Ursprungs vor dem Hintergrund einzelner Arbeitszyklen und des jeweils beprobten Tieres. Anhand der Ergebnisse des 1., 6., 11. und 12. Probenahmetages waren keine Zusammenhänge darstellbar, am 9., 10., 13. und 14. Tag jedoch sehr wohl.

Die am **9. Probenahmetag** isolierten Salmonellen stammten aus verschiedenen Arbeitsbereichen [Fleischuntersuchung Organe (Messer vor Gebrauch) und Fleischuntersuchung Tierkörper (hier entnommen: Bauchlappen)]. Legt man für diesen Probenahmetag die Aussagen von TENOVER et al. (1995) über die Verwandtschaftsverhältnisse von Isolaten zugrunde, so liegt der Gedanke einer Identität nahe (Tab. 4.15). Hierzu müssen einige (kleinere) Unterschiede als durch in vitro entstandene Mutationen bedingt betrachtet werden (MURASE et al. 1996). So können die Isolate einem identischen Ursprung zugeordnet werden. Da alle Isolate von Tier 2 stammen, lassen auch die Arbeitsabläufe diese Schlussfolgerung zu: Die Tatsache, dass bei der Fleischuntersuchung der Organe auf dem Messer bereits vor Gebrauch *Salmonella* nachweisbar war, zeigt, dass bereits vor der Untersuchung von Tier 2 das Messer mit *Salmonella* kontaminiert worden sein muss. Nimmt man an, dass bei Schichtbeginn die eingesetzten Messer frei von Keimen gewesen sind, so kann hiermit die Übertragung von den Tierkörperteilen auf die Oberfläche der Handgeräte belegt werden. Hinzuweisen ist außerdem auf die offensichtlich mangelnde Unterbrechungsfunktion der Sterilisieranlage.

Tabelle 4.15: Herkunft, phänotypische und genotypische Charakterisierung von *Salmonella*-Isolaten am Probenahmetag 9

Tierkörper	Beprobungsbereich/ Material	Serovar	Resistenzmuster	PFGE-Muster
Tier 2	FIU Organe / Messer vor Gebrauch	S. ssp. I Rauform	AMP/K/S/SU	X1-1/B1-1/Sp1-1
	FIU Tierkörper/ Bauchlappen*	S. ssp. I Rauform	AMP/K/S/SU/ TE	X1/B1/Sp2
	FIU Tierkörper/ Bauchlappen*	S. ssp. I Rauform	AMP/K/S/SU/ TE	X1-2/B1/Sp1-1

\* aus einer Probe stammend

Die Isolate des **10. Probenahmetages** (vergl. Tabelle 4.16) stammten von verschiedenen Tierkörpern bzw. aus unterschiedlichen Arbeitsbereichen. So konnten bei der Verfolgung des Tieres 4 sowohl bei der Fleischuntersuchung des Tierkörpers (Bauchlappen, Tonsillen) als auch aus dem Bereich Fleischuntersuchung der Organe (Herz Anschnitt, Herz Außen) identische *Salmonella*-Isolate nachgewiesen werden (vergl. auch Kapitel 4.2.3.1). Ebenfalls im Arbeitsbereich der Fleischuntersuchung der Organe konnte beim 12. und beim 14. Tierkörper (jeweils Herz Außen) *Salmonella* nachgewiesen werden. Bei der Beprobung des 14. Tierkörpers war zudem bei der Fleischuntersuchung des Tierkörpers aus den Tonsillen ein Nachweis zu führen. Beide Isolate vom 14. Tierkörper sind phäno- und genotypisch identisch mit einem Isolat von Tier 4 (Fleischuntersuchung Tierkörper, Tonsillen). Hier ist eine Übertragung von Tier zu Tier darstellbar, an der im Prozessablauf die berührenden Oberflächen beteiligt gewesen sein müssen, da ohne ein solches Vehikel der Nachweis von Salmonellen auf der Außenfläche des Herzens nicht möglich gewesen wäre.

Am 10. Probenahmetag stammten alle *Salmonella*-Isolate von Organen oder Tierkörperteilen. Es konnte kein *Salmonella*-Nachweis direkt von einer der untersuchten Geräteoberflächen geführt werden.

Der vorliegende Nachweis von *S. Infantis* in den Tonsillen von Tier 4 legt die Vermutung nahe, dass die untersuchten Schlachttiere bereits vor Eintritt in die Fleischgewinnungslinie mit dem Erreger kontaminiert waren. Ob die Kontamination des Bauchlappens direkt oder indirekt durch Kontakt mit einem verschmutzten Messer erfolgte, konnte nicht geklärt werden. Dies gilt ebenfalls für die Außenfläche des Herzens an der Position der Fleischuntersuchung der Tierkörper. Der Nachweis von der Anschnittfläche des Herzens könnte nahe legen, dass das Messer bei der Fleischuntersuchung der Organe mit *S. Infantis* (X3/B3/Sp3) kontaminiert war. Ein entsprechender *Salmonella*-Nachweis ist jedoch nicht gelungen.



Tabelle 4.16: Herkunft, phänotypische und genotypische Charakterisierung von *Salmonella*-Isolaten am Probenahmetag 10

<b>Tierkörper</b>	<b>Beprobungsbereich/ Material</b>	<b>Serovar</b>	<b>Resistenzmuster</b>	<b>PFGE-Muster</b>
Tier 4	FIU Tierkörper Bauchlappen	<i>S. Infantis</i>	sensibel	X3/B3/Sp3
	FIU Tierkörper Tonsillen	<i>S. Infantis</i>	sensibel	X3/B3/Sp3
		<i>S. Infantis</i>	SU/TE	X3/B3-2/Sp3
	FIU Organe Herz Anschnitt	<i>S. Infantis</i>	sensibel	X3/B3/Sp3
	FIU Organe Herz Außen	<i>S. Infantis</i>	sensibel	X3/B3/Sp3
Tier 12	FIU Organe Herz Außen	<i>S. Infantis</i>	SU	X3/B3-1/Sp3
Tier 14	FIU Organe Herz Außen	<i>S. Infantis</i>	SU/TE	X3/B3-2/Sp3
	FIU Tierkörper Tonsillen	<i>S. Infantis</i>	SU/TE	X3/B3-2/Sp3

Alle Isolate vom **13. Probenahmetag**, die von Tier 1 oder Tier 2, bzw. aus deren Umfeld stammten, waren vollständig identisch. Ausnahme bildeten lediglich zwei Rauformen, die ansonsten phänotypisch und genotypisch mit den anderen Isolaten übereinstimmten. Die *Salmonella*-positiven Proben von Tier 1 stammten aus dem Bereich Eviszeration (Handfläche, Bauchlappen). Von Tier 2 konnte *Salmonella* bei der Fleischuntersuchung der Tierkörper (Kettenhandschuh) und Fleischuntersuchung der Organe (Kettenhandschuh) isoliert werden. Von Tier 14 wurden *S. Typhimurium* U302-Isolate gewonnen, die mit keinem der anderen isolierten Stämme verwandt sind (siehe Tabelle 4.17).

Der Nachweis von Salmonellen mit identischen Merkmalen von Bauchlappen und Handfläche bei der Eviszeration weist auf eine Übertragung von Salmonellen hin. Dies erfolgte entweder von dem Bauchlappen auf die Handfläche oder von der Handfläche auf den Bauchlappen.

Auch auf Kettenhandschuhen bei den beiden Positionen der Fleischuntersuchung konnten identische Salmonellen nachgewiesen werden, jedoch nicht auf den korrespondierenden Kontaktflächen an Tierkörper und Organen. Dennoch wird hiermit gezeigt, dass identische *Salmonell*-Isolate in der Fleischgewinnungslinie weitergereicht werden und diese Übertragung unter Beteiligung der Handgeräte stattfindet. Gerade die Kettenhandschuhe sind bekannt für ihre schwierige Hygienisierbarkeit.

Tabelle 4.17: Herkunft, phänotypische und genotypische Charakterisierung von *Salmonella*-Isolaten am Probenahmetag 13

Tier-körper	Beprobungs-bereich/ Material	Serovar	Resistenz-muster	PFGE-Muster
Tier 1	Eviszeration Bauchlappen	<i>S. Typhimurium</i> DT120	AMP/S/SU/TE	X1/B1/Sp1
	Eviszeration Handfläche	<i>S. Typhimurium</i> DT120	AMP/S/SU/TE	X1/B1/Sp1
		<i>S. Subsp. I</i> Rauform	AMP/S/SU/TE	X1/B1/Sp1
Tier 2	FIU Tierkörper Kettenhandschuh	<i>S. Typhimurium</i> DT120	AMP/S/SU/TE	X1/B1/Sp1
	FIU Organe Kettenhandschuh	<i>S. Typhimurium</i> DT120	AMP/S/SU/TE	X1/B1/Sp1
		<i>S. Subsp. I</i> Rauform	AMP/S/SU/TE	X1/B1/Sp1
Tier 14	FIU Tierkörper Tonsillen	<i>S. Typhimurium</i> U 302	sensibel	X4/B4/Sp5

Alle Isolate vom **14. Probenahmetag** stammen von Tier 1 und Tier 2 oder aus deren nahem Umfeld (vergl. Tabelle 4.18). Es konnten von Tierkörper 1 *Salmonella*-Isolate bei der Eviszeration (Bauchlappen und Handfläche) dargestellt werden. Von Tierkörper 2 konnte *Salmonella* in den Bereichen Fleischuntersuchung der Tierkörper (hier entnommen: Bauchlappen) sowie bei der Fleischuntersuchung der Organe (Herz Außen, Tonsillen, Lymphknoten) isoliert werden.

Tabelle 4.18: Herkunft, phänotypische und genotypische Charakterisierung von *Salmonella*-Isolaten am Probenahmetag 14

Tierkörper	Beprobungsbereich/ Material	Serovar	Resistenzmuster	PFGE-Muster
Tier 1	Eviszeration Bauchlappen	S. Subsp. I Rauform	sensibel	nicht anzüchtbar
		S. Subsp. I Rauform	sensibel	X3-1/B3/Sp3-1
		S. Infantis	sensibel	X3-1/B3/Sp3-1
	Eviszeration Handfläche	S. Infantis	sensibel	X3-2/B3/Sp3
		S. Infantis	sensibel	nicht anzüchtbar
		S. Infantis	TE	X3/B3/Sp3
Tier 2	FIU Tierkörper Bauchlappen	S. Subsp. I Rauform	sensibel	nicht anzüchtbar
		S. Subsp. I Rauform	sensibel	X3-1/B3/Sp3-1
	FIU Organe Herz Außen	S. Infantis	sensibel	X3-2/B3/Sp3
	FIU Tierkörper Tonsillen	S. Infantis	sensibel	nicht anzüchtbar
	FIU Tierkörper Lymphknoten	S. Infantis	sensibel	X3-2/B3/Sp3
		S. Infantis	sensibel	nicht anzüchtbar

Eine Zuordnung der Isolate von beiden Tieren zu einem gemeinsamen genetischen Ursprung kann vorgenommen werden (vergl. Kapitel 4.2.3.1). Dies, sowie die Übereinstimmung der Isolate von Tier 1 (Eviszeration Handflächen, *S. Infantis*, sensibel, X3-2/B3/Sp3) und Tier 2 (Fleischuntersuchung Organe, Herz Außen sowie Fleischuntersuchung Tierkörper, Lymphknoten, jeweils *S. Infantis*, sensibel, X3-2/B3/Sp3) zeigt deutlich die Manifestation der Salmonellen in der Gewinnungslinie. Auch der Nachweis von Salmonellen eines genetisch gleichen Ursprungs sowohl auf Bauchlappen und Handflächen bei der Eviszeration von Tier 1 als auch auf den (wahrscheinlich von denselben Handflächen berührten) Bauchlappen von Tier 2 zeigen eine Übertragung von Salmonellen a) von Tierkörperteil zu Produkt berührenden Hand(ober-)flächen und b) von Tierkörper zu Tierkörper durch c) verschiedene Arbeitspositionen zwangsläufig unter Beteiligung der Oberflächen als Vehikel.

## 5 Zusammenfassung

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist die Darstellung einer möglichen Beteiligung Produkt berührender Oberflächen der Fleischgewinnung beim Schwein an der Verteilung von Salmonellen über die Prozesslinie hinweg.

Über einen Zeitraum von 12 Monaten hinweg wurden an 14 Probenahmetagen insgesamt 1.638 Proben von vier Arbeitspositionen der „reinen Seite“ der Prozesslinie (Eviszation der Bauchhöhle, Spaltung des Tierkörpers, Fleischuntersuchung des Tierkörpers, Fleischuntersuchung der Organe) kulturell auf Salmonellen untersucht. Die Probenahme umfasste jeweils sowohl Produkt berührende Oberflächen vor und unmittelbar nach Kontakt (Messer vor und nach Gebrauch, Beil vor und nach Gebrauch, Handflächen und Kettenhandschuhe mittels Tupfer beprobt) als auch berührte Tierkörperteile und Organe (Bauchlappen, Rückenspeck, Tonsillen, Mandibularlymphknoten und Herz in destruktiver Probenahme) sowie das Wasser der Sterilisationsbecken. Zusätzlich wurden alle erhaltenen *Salmonella*-Isolate näher charakterisiert.

Bei den Produkt berührenden Oberflächen wurde mit der aeroben Gesamtkeimzahl und den Enterobacteriaceae der Hygienestatus kulturell erfasst. Alle erhaltenen *Salmonella*-Isolate von unterschiedlichen Proben wurden zur Darstellung von möglichen Übereinstimmungen sowohl phänotypischen Untersuchungen (Serotypisierung, ggf. Phagentypisierung, Resistenzbestimmung) unterzogen, als auch genotypisch mit der Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) (Enzyme: XbaI, BlnI und SpeI) untersucht.

Bei der Erfassung des Hygienestatus zeigte sich, dass die gebrauchsfertigen Messer nicht immer keimfrei waren. Die aerobe Gesamtkeimzahl der Messer lag bereits vor Gebrauch zwischen 2,7 und 3,2 log KbE/cm<sup>2</sup> bzw. ml. Die Belastung mit Enterobacteriaceae war 2,6 - 3,1 log KbE/cm<sup>2</sup> bzw. ml bei einer prozentualen Belastung von 1 - 5,1%. Mit der Nutzung der Messer stieg der aerobe Keimgehalt auf 3,3 - 3,8 log KbE/cm<sup>2</sup> bzw. ml um eine halbe bis eine Logarithmusstufe an. Ebenso stieg die Belastung der Messer mit Enterobacteriaceae auf 3,0 bis 3,6 log KbE/cm<sup>2</sup> bzw. ml. Die prozentuale Enterobacteriaceae-Belastung lag nach dem Gebrauch der Messer bei 26,5 – 33,7%.

Der aerobe Keimgehalt der Spaltbeile lag sowohl vor als auch nach Gebrauch bei 2,7 log KbE/cm<sup>2</sup>. Vor Gebrauch waren keine Enterobacteriaceae nachweisbar. Nach Gebrauch waren 2% der Spaltbeile Enterobacteriaceae-positiv. Die entsprechende Keimbelastung lag bei 2,4 log KbE/cm<sup>2</sup>.

Auf den Handflächen bzw. Kettenhandschuhen wurden 2,6 - 2,8 log Enterobacteriaceae/ml nachgewiesen bei einer prozentualen Belastung von 30,3 - 47,6%.

*Salmonella* konnte von verschiedenen Probenqualitäten nachgewiesen werden:

An der Position der Eviszeration der Tierkörper wurden Salmonellen isoliert von den Messern vor Gebrauch, den Handflächen und den Bauchlappen. Bei der Spaltung der Tierkörper erfolgte kein Nachweis von Salmonellen. Kettenhandschuhe, Tonsillen, Lymphknoten und Bauchlappen waren bei der Fleischuntersuchung der Tierkörper *Salmonella*-positiv. An der Position der Fleischuntersuchung der Organe waren die Messer vor Gebrauch, die Kettenhandschuhe und das Herz (Anschnitt und Außen) mit Salmonellen belastet. Die durchschnittliche Salmonellen-Belastung der Proben lag bei 1,46% und im Einzelnen wie folgt:

Tonsillen: 5,1%; Handflächen/Kettenhandschuh: 4,0%; Bauchlappen 3,1% ; Herz: 2,6% und Lymphknoten: 1,0%. Lediglich im Wasser der Sterilisationsbecken, auf den Messern nach Gebrauch, den Beilen und dem Rückenspeck waren keine Salmonellen nachweisbar.

Bei dem Vergleich der phänotypischen und genotypischen Charakteristika der erhaltenen *Salmonella*-Isolate zeigten sich vollständige und teilweise Übereinstimmungen: Isolate aus unterschiedlichen Probenmaterialien eines Probenahmetages konnten einem gemeinsamen genetischen Ursprung zugeordnet werden.

Die Zuordnung der Isolate zu den einzelnen Arbeitspositionen und Tierkörpern im Schlachtprozess zeigte ein wiederholtes Auftreten von Salmonellen gleichen genetischen Ursprungs in den Arbeitsabläufen der Fleischgewinnungslinie: Es konnten Übertragungen von Tierkörperteilen auf die Produkt berührende Oberflächen dargelegt werden. Ebenfalls belegte der Nachweis solcher identischen Isolate auf korrespondierenden Oberflächen eine Verteilung von Salmonellen von Tierkörper zu Tierkörper und über die Arbeitsbereiche hinweg (Ausnahme: Spaltung der Tierkörper) unter Beteiligung der untersuchten Oberflächen.

## 6 Summary

The aim of this study was the possible involvement of contact surfaces in the distribution of *Salmonella* through a pig processing line.

In total, 1638 samples were taken at 14 sampling days in the course of 12 months from four working positions (evisceration of the abdominal cavity, splitting the carcass, meat inspection of the carcass and meat inspection of the organs) and culturally tested for *Salmonella*. Samples were taken from contact surfaces prior to and immediately after the contact (knives prior to and after use, axe prior to and after use, palms, mesh gloves) as well as contact parts on carcass and organs (skirt steak, back bacon, tonsils, mandibular lymph node) and water in the sterilisation units. Additionally all *Salmonella* isolates were further characterised.

The samples from the contact surfaces were examined culturally for aerobic plate count and Enterobacteriaceae (EBC). For possible correspondence all *Salmonella* isolates were examined by phenotypic methods (serotyping, partly phage typing, resistance pattern), and genotypically using pulsed-field gel-electrophoresis (PFGE) (enzymes were XbaI, BlnI, SpeI).

**Hygiene:** The ready-to-use knives were not always sterile. The total aerobic plate count prior to use was 2.7 to 3.2 log APC/cm<sup>2</sup> resp. ml. The load with EBC was 2.6 to 3.1 log APC/cm<sup>2</sup> resp. ml with a percentage of 1 to 5.1%. With the use of the knives the total aerobic plate count increased about 0.5 to 1 logarithm to 3.3 - 3.8 log APC/cm<sup>2</sup> resp. ml. Also the Enterobacteriaceae count on the knives increased to 3.0-3.6 log APC/cm<sup>2</sup>. The percentage of the Enterobacteriaceae positive samples after use of the knives was 26.5 to 33.7%.

The total aerobic plate count on the axes prior to and after use was 2.7 log APC/cm<sup>2</sup>. Enterobacteriaceae have not been detected prior to use. After use the Enterobacteriaceae load was 2%. The according total aerobic plate count was 2.4 log APC/cm<sup>2</sup>.

On the palms resp. mesh gloves a number of 2.6 - 2.8 log EBC/cm<sup>2</sup> was detected with a percentage of 30.3 - 47.6% of samples.

*Salmonella* were detected from different sample qualities:

At the working position evisceration *Salmonella* were isolated from the knives prior to use from the palms and the skirt steak. No *Salmonellae* were detected at the splitting

position. Mesh gloves, tonsils, lymph nodes and skirt steak were *Salmonella* positive at the position meat inspection of the carcass. At the position meat inspection of the organs, *Salmonellae* were isolated from knives prior to use, mesh gloves and heart (cut and surface).

The percentage of the *Salmonella* load: tonsils was: 5.1%, palms/mesh gloves: 4.0%, skirt steak 3.1%, heart: 2.6%, and lymph nodes: 1.0%. Only from the water of the sterilisation units and from the back bacon *Salmonella* were not isolated.

Comparing the phenotypic and genotypic characteristics of the isolates, both complete and partial accordance have been found: isolates from different samples of one sampling day could be assigned to a common genetic origin.

The assignment of the isolates to single working positions and carcasses showed a repeated occurrence of *Salmonella* of a common genetic origin in the working flow of the processing line: transmission from parts of the carcass to the contact surfaces could be demonstrated. Such identical isolates on corresponding surfaces demonstrate the transfer of *Salmonella* from carcass to carcass and throughout working areas and positions (except for splitting) with involvement of the examined surfaces.

## **7 ANHANG**

### **7.1 Vorversuche / Qualitätssicherung**

#### **7.1.1 Maßnahmen zur Qualitätssicherung**

Die interne qualitative und quantitative Kontrolle der *Salmonella*-Identifizierung wurde im Vorfeld von allen an den Hauptversuchen beteiligten Personen durchgeführt.

Die Durchführung der einzelnen Arbeitsschritte des Vorversuches glich der Vorgehensweise in den Hauptversuchen und ist dort beschrieben. Eine kurze graphische Darstellung der Untersuchungsgänge sowie das Formblatt zur Dokumentation der Ergebnisse sind den Kapiteln 7.2 und 7.4 zu entnehmen.

#### **7.1.2 Vorversuch: Tupfer**

Die Vorversuche zur Gestaltung der Probenahmetechnik dienten der Ermittlung einer sachgerechten Befeuchtungsmethode für die verwendeten Baumwolltücher, die nachfolgend sowie im Text der Arbeit als Tupfer bezeichnet werden. Außerdem sollte sicher gestellt werden, dass bei der gewählten Probenahmetechnik eine Isolierung der von den Tupfern aufgenommenen Keime möglich war. Hierzu wurde eine bekannte Menge von Mikroorganismen auf die Tupfer aufgebracht. Mit der im Hauptversuch verwendeten Vorgehensweise gelang die Rückgewinnung dieser Keimmenge aus den experimentell kontaminierten Tupfern.

##### **7.1.2.1 Ermittlung einer sachgerechten Befeuchtungsmethode der Tupfer**

Um eine zweckmäßige Methode zur Befeuchtung der eingesetzten Tupfer zu erlangen, die auch eine praktikable Anwendung vor Ort gewährleistete, wurden im Vorfeld der Hauptversuche mehrere Befeuchtungs-Varianten miteinander verglichen. Die Versuchsvariationen sind in Tabelle 7.1 aufgeführt.



Alle Tupfer wurden nach der Befeuchtung einzeln in die Aluminiumfolie verpackt, auf der sie lagen. Die Beobachtungen bei der Durchführung des Vorversuches sowie die Beurteilung der Tupfer nach dem Autoklavieren sind der Tabelle 7.2 zu entnehmen.

Tabelle 7.1: Versuchsvarianten zur Tupferbefeuchtung

- Eintauchen der Tupfer in NaCl-Pepton, *Auswringen* mit sterilen Handschuhen bis die Tupfer noch feucht sind (jedoch nicht tropfen), Ausbreiten der Tupfer auf Aluminiumfolie;
- Eintauchen der Tupfer in NaCl-Pepton, *Abtropfen* der Tupfer in einem Trichter, Ausbreiten der Tupfer auf Aluminiumfolie;
- Ausbreiten der Tupfer auf Aluminiumfolie, Benetzen der Tupfer mit NaCl-Pepton durch dreimaliges *Sprühen* aus einer Sprühflasche;
- Ausbreiten der Tupfer auf Aluminiumfolie, Benetzen der Tupfermitte mit *5 ml* NaCl-Pepton aus einer sterilen Glaspipette;
- Ausbreiten der Tupfer auf Aluminiumfolie, Benetzen der Tupfermitte mit *8 ml* NaCl-Pepton aus einer sterilen Glaspipette.

Tabelle 7.2: Beobachtungen beim Tupfervorversuch

Variante	Anzahl der Tupfer	Beobachtungen bei der Befeuchtung	Beobachtungen nach dem Autoklavieren
Auswringen	10	schnell und einfach	gute Feuchte zur Probenahme, gleichmäßige Verteilung des NaCl-Peptons, kein Tropfen
Abtropfen	10	zeitaufwändig, Tupfer schon beim Einpacken in Folie sehr feucht	sehr nass, Tropfen nach dem Auspacken
Sprühen	10	Spritzwasserverluste	ungleichmäßige Verteilung des NaCl-Peptons
Pipette 5 ml	8	arbeitsaufwändig	Konzentration des NaCl-Peptons auf die Mitte, gute Feuchte, kein Tropfen
Pipette 8 ml	8	arbeitsaufwändig	ungleichmäßige Verteilung des NaCl-Peptons, Tropfen des Tupfers

Den Beobachtungen entsprechend wurden die in den Hauptversuchen benötigten Tupfer nach der als 'Variante Auswringen' beschriebenen Vorgehensweise behandelt.

Eine einheitliche Vorgehensweise wurde abschließend dadurch gewährleistet, dass im gesamten Versuchszeitraum die Tupfer immer von derselben Person vorbereitet wurden.

Die einzelnen Tupferpakete wurden entsprechend der benötigten Anzahl pro Probenahmedurchgang in einem Kunststoffbeutel zusammengefasst und autoklaviert. Die Verpackung der einzelnen Tupfer erfolgte so, dass die die Probe nehmende Person die autoklavierten Tupfer bei der Probenahme nicht berühren musste. Ebenso konnte die Abgabe des Tupfers in den Stomacherbeutel berührungsfrei erfolgen.

#### **7.1.2.2 Isolierung von Keimen aus experimentell kontaminierten Tupfern**

Im Rahmen dieses Vorversuches sollte gezeigt werden, dass Keime, die sich auf den (nach Kap. 7.1.2.1. vorbereiteten) Tupfern befanden, durch die in den Hauptversuchen angewandte Art der Probenaufbereitung wieder isoliert werden konnten.

Hierzu wurde zunächst eine Verdünnungsreihe aus einer mit Escherichia coli (E. coli) (Stammsammlung Bonn) beimpften Bouillon (24 h, 37°C) bis zu einer Verdünnungsstufe von  $10^{-9}$  angelegt und die Keimzahl der einzelnen Verdünnungsstufen der Grundsuspension im Plattengussverfahren bestimmt. Das Vorgehen entsprach dabei dem der Hauptversuche.

Aus den Verdünnungsstufen  $10^{-5}$  bis  $10^{-9}$  wurde je ein Milliliter Flüssigkeit auf einen der zu untersuchenden Tupfer verbracht. Jeder der so beimpften Tupfer wurde danach in einen sterilen Stomacherbeutel gegeben, welcher mit einer definierten Menge NaCl-Pepton aufgefüllt wurde. Es erfolgte eine gründliche Durchmischung im Masticator (Nr.400/480) bzw. im MIX 1 ® HOMOGENISATOR. Anschließend wurde aus diesen Grundsuspensionen jeweils eine Verdünnungsreihe bis zu einer Verdünnung von  $10^{-5}$  angelegt. Die Keimgehalte der einzelnen Verdünnungsstufen wurden im Plattengussverfahren ermittelt. Auch hier entsprach das Vorgehen dem der Hauptversuche und wird dort näher beschrieben.

Der Ermittlung der Keimzahlen aus der Grundsuspension und aus den Verdünnungsstufen der beimpften Tupfer ergab folgende Werte:

Grundsuspension (E.coli-Bouillon):  $3,1 \times 10^4$  KbE/ml

Beimpfte Tupfer:  $3,3 \times 10^4$  KbE/ml

In Tabelle 7.3 sind die Einzelergebnisse zusammengefasst.

Tabelle 7.3: E. coli-Gehalt der im Vorversuch angelegten Verdünnungsstufen

Verdünnungsstufe	E.coli-Bouillon	beimpfter Tupfer	
	Ergebnisse des Doppelansatzes (Platte A + Platte B)	ausgewertete Verdünnungsstufen	Ergebnisse
-5	-	-1 / -2	31 +39 / 6 + 4
-6	-	-1	6 + 3
-7	311 + 309	-1	1 + 0
-8	31 + 31		
-9	4 + 2		
<b>Keimzahl</b>	$3,1 \times 10^4$	$3,3 \times 10^4$	

Die experimentell auf die verwendeten Tupfer aufgebrachten Keime konnten demnach mit den im Hauptversuch verwendeten mikrobiologischen Nachweismethoden von den Tupfern isoliert werden.

### 7.1.3 Interne Qualitätssicherung (qualitativ und quantitativ)

Die Fähigkeit der Teilnehmer, sowohl die quantitativen als auch die *Salmonella*-Untersuchungen im Sinne der angewendeten Methodik korrekt durchzuführen, wurde in sieben Versuchsgängen (I-VII) in Vorfeld sichergestellt. Alle Teilnehmer waren in der Lage, die Untersuchungen korrekt durchzuführen.

In den Versuchsgängen I-III war aus dem Lyophilisat einer bekannten *Salmonella*-Reinkultur (*S. Enteritidis*) eine dezimale Verdünnungsreihe anzulegen. Aus jeder Verdünnungsstufe wurde eine quantitative Untersuchung durchgeführt. Außerdem wurde aus jeder Verdünnungsstufe eine Untersuchung auf *Salmonella* vorgenommen, um festzustellen, bis zu welcher Verdünnung die teilnehmenden Personen in der Lage waren, einen *Salmonella*-Nachweis zu führen. In Versuchsgang I und II wurde die Gesamtkeimzahl mit Hilfe des Plattengussverfahrens erfasst,

in Versuchsgang III wurde die Gesamtkeimzahl mit dem Oberflächenspatelverfahren ermittelt.

In *Versuchsgang IV* wurden aus dem Lyophilisat von *S. Enteritidis* zwei dezimale Verdünnungsreihen und aus dem Lyophilisat von *Staphylokokkus aureus* eine dezimale Verdünnungsreihe angelegt. Bei einer der Verdünnungsreihen von *S. Enteritidis* wurde jeder Verdünnungsstufe 1 ml der Ausgangsbouillon von *Staphylokokkus aureus* (ca.  $10^8$  KbE/ml) zugefügt. Aus den dezimalen Verdünnungsreihen der Reinkulturen war jeweils die Keimzahl der Ausgangsbouillon zu bestimmen. Aus der Mischkultur wurde ein qualitativer *Salmonella*-Nachweis geführt.

Bei *Versuchsgang V* wurde in gleicher Weise vorgegangen wie in Versuchsgang IV, als zusätzlicher Keim für die Mischkultur diente *E. coli*.

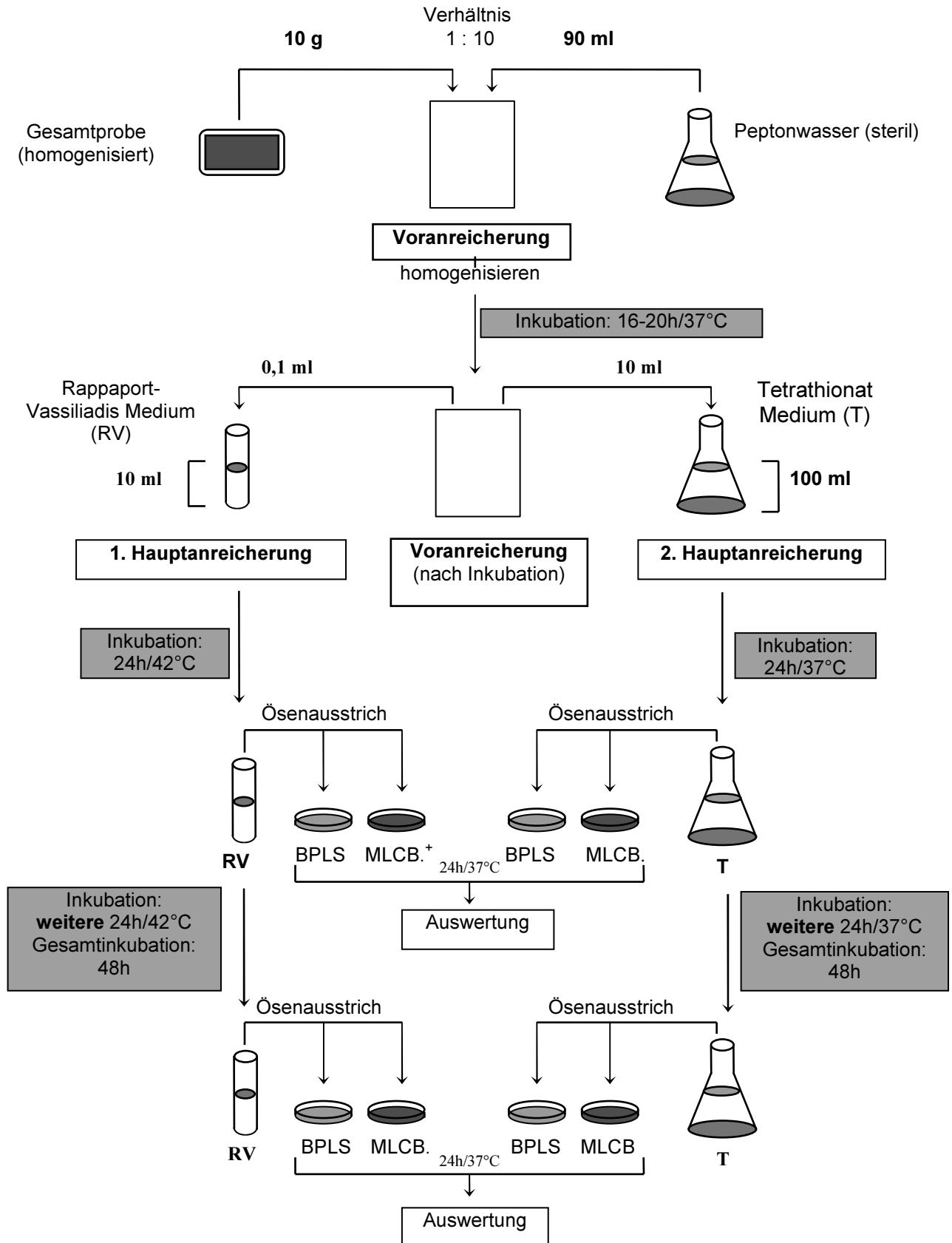
In *Versuchsgang VI* wurde zunächst ebenso verfahren wie in Versuchsgang V. Zudem wurden jeweils 2,5 ml der hergestellten Mischkultur (*S. Enteritidis* und *Escherichia coli*) in eine Hackfleischprobe (25 g) gegeben. Ein *Salmonella*-Nachweis aus dem Hackfleisch wurde direkt und in gleicher Weise nach 24stündiger Kühlung Lagerung des kontaminierten Hackfleisches durchgeführt.

In *Versuchsgang VII* haben die teilnehmenden Personen jeweils zwei Hackfleischproben auf Anwesenheit von *Salmonella* untersucht, ohne zu wissen, ob die Proben mit *Salmonella* kontaminiert waren. Ein Teil der Proben (jeweils 25 g) war versetzt mit 2,5 ml einer Mischung aus *E. coli*-Bouillon ( $10^5$ ) und *S. Enteritidis*-Bouillon ( $10^2$ ) im Verhältnis 1 zu 9 (Probenart A). Einem weiteren Teil der Hackfleischproben waren 2,5 ml sterile physiologische Kochsalzlösung beigemischt worden („Leerproben“).

Die Zuordnung der Probenart zu den einzelnen Teilnehmern und die Überprüfung der Ergebnisse wurden hier von einer außenstehenden (nicht am Projekt beteiligten) Person vorgenommen, damit die Teilnehmer in ihrer Ergebnisfindung nicht beeinflusst werden konnten.

## 7.2 Ablaufübersichten/Protokolle

### 7.2.1 Untersuchungsgang *Salmonella*



## 7.2.2 Durchführung einer Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE)

Nachfolgend wiedergegeben wird das Ablaufprotokoll für die PFGE des Instituts für Fleischhygiene und -technologie, Berlin.

Die hier verwendeten verkürzten Bezeichnungen für Lösungen erklären sich aus dem Text der Kapitels 3.2.5.4 und sind in Tabelle 3.9 erläutert.

### 1. Tag:

#### Zellysis

- 1- 1,5 ml von 5 ml Übernachtskultur in einem Eppendorf-Tube 5 min bei 10.000 U zentrifugieren
- Sediment aufnehmen in 1 ml eiskalter PIV-Lösung zentrifugieren (5 min bei 10.000 U) und in 0.5-1 ml -2 x Lysis-Lösung aufnehmen (Das Volumen ist abhängig von der Zelldichte)
- 135 µl dieser Suspension + 135 µl 1,2% LMP-Agarose (Low Melting Point, gekocht in PIV-Lösung und auf 50°C abgekühlt) im Eppendorf-Tube mischen und sofort in Gießblock (10er-Block, 20 x 10 x 1.5 mm) einpipettieren
- Gießblock kühlen: a) genau 5 min bei -20°C  
b) mindestens 20 min bei 4°C
- Agaroseblöckchen aus dem Gießblock entnehmen, oberen und unteren Rand beschneiden und die Blöckchen in ein Eppendorf-Tube geben
- Zugabe von 1 ml 1 x Lysislösung
- Inkubation über Nacht (37°C) unter leichtem Schütteln im Thermomixer (Schüttelinkubator, Fa. Eppendorf)

### 2. Tag:

#### Deproteinisierung

- Lysislösung entfernen [über mit Alkohol gereinigter Petrischale mit Hilfe eines "Glasschiebers" (Eigenbau) vorsichtig abgießen]
- 3 x mit je 1 ml ES-Puffer (für jeden Ansatz frisch ansetzen) waschen, jeweils für mind. 20 min
- 1 ml frisch angesetzte ESP-Lösung zufügen und bei 50°C für mind. 17 h im Thermomixer inkubieren

**3. Tag:****Waschen der Blöckchen**

- ESP-Lösung entfernen (über sauberer Petrischale mit Hilfe des Glasschiebers abgießen)
- Blöckchen in ein 50 ml-Zentrifugenglas überführen
- 3 x mit je 14 ml TE-Puffer unter gelegentlichem, vorsichtigen Aufwirbeln des Blöckchens waschen (je 60 min bei Zimmertemperatur);  
alternativ: Zentrifugengläser auf dem Horizontalschüttler bei 70 rpm schütteln, der Waschschrift kann dann auf 45 min verkürzt werden (Abgießen des TE-Puffers durch ein in 96% Ethanol p. A. gereinigtes Kunststoff-Teesieb: langsam abgießen - mit Glasschieber davor, auf Proben-Blöckchen achten, ggf. vorsichtig mit dem Glasschieber ins Zentrifugenglas zurückschieben)
- Teilen des Agarose-Blocks in "Probengröße" (ca. 4-5 x 10 mm)
- probengroße Blöckchen je in ein neues Eppendorf-Gefäß geben und
  - für Restriktionsenzym-Zugabe bereitstellen oder
  - Zugabe von TE pH 7.5 (s.o.) und Aufbewahrung im Kühlschrank (die Blöckchen sind so mind. 6 Monate verwendbar)

**Restriktase-Spaltung:**

- Blöckchen mit 1 ml Äquilibrierpuffer-Puffer (nach Angabe des Herstellers) versetzen und 30 min äquilibrieren
- Äquilibrierpuffer-Puffer entfernen (vorsichtig abgießen, Rest mit einer Pipette abnehmen) und
- 50 µl frischen 1 x Enzym-Puffer (vom Hersteller i.d.R. in 10-facher Konzentration mitgeliefert) auf die Blöckchen im Eppendorf-Tube geben
- anschließend 20 µl Restriktionsendnuklease-Lösung dazugeben (30 - 80 Units Enzym in entsprechender Verdünnung in Enzym-Puffer)
- Inkubation bei optimaler Reaktionstemperatur (Herstellerangabe) über Nacht im Thermomixer

**Gelherstellung:**

- 1,2% LMP- Agarose in 1 x TBE-Puffer kochen (3,6 g Agarose/300 ml TBE-Puffer) und auf ca. 50°C im Wasserbad abkühlen
- Die vom Hersteller mitgelieferte Gießform und den Kamm gut reinigen (mit

- 96%igem Ethanol) und auf einem waagrecht ausgerichteten Nivelliertisch aufstellen
- Der Gelträger wird ebenso gereinigt und an der Unterseite mit einem Streifen Kunststoff-Klebeband derart beklebt, dass noch ca. 10 cm überstehen, die zu einer Lasche zusammengeklebt werden. Der Gelträger wird so in die Gießform eingelegt, dass die drei Fixierpunkte an der Unterseite des Gelträgers in die drei Vertiefungen der Gießform eingedrückt sind. Die Klebeband-Lasche steht über und dient später zum Herausnehmen des Gels.
  - Einsetzen des Kamms in die entsprechende Halterung an der Gießform: Abstand zwischen Unterkante des Kamms und der Oberfläche des Gelträgers: ca. 1 mm
  - Die Agarose wird blasenfrei in die vorbereitete Form gegossen, wobei ein Rest Agarose (ca. 5 ml) zurückbehalten und bis zur weiteren Verwendung bei 50°C im Wasserbad aufbewahrt wird.
  - Erstarren lassen des Gels: da i.d.R. für die PFGE Low-melting-Agarose verwendet wird (erstarrt langsam bei 28-30°C), ist es ratsam, das Gel am Vortag herzustellen und über Nacht bei 4°C aufzubewahren.

#### **4. Tag:**

##### **Laden des Gels und Elektrophorese starten:**

- PFGE-Gerät vorbereiten: Kühlung anstellen, PFGE-Gerät einschalten und ca. 1.5 l TBE-Puffer in die Gelkammer geben (Darauf achten, dass der Ablaufschlauch für den Puffer abgezogen ist!), Anschalten der Umwälzpumpe und Puffer vorkühlen lassen
- Kamm aus Gel entfernen (durch vorsichtiges, gleichmäßiges Ziehen nach oben)
- Abstoppen der Restriktase-Reaktion im Eppendorf-Tube durch Zugabe von 25 µl ES-Puffer (frisch angesetzt) und 50 µl Bromphenolblau-Ladepuffer (frisch angesetzt), durch vorsichtiges Klopfen mischen
- Blöckchen mittels Glasschieber auf ein sauberes Deckgläschen bringen (in sauberer Petrischale) und von dort in die Slots überführen
- DNA-Längen-Standards einfüllen
- alle Slots mit LMP-Agarose verschließen (1,2%ig, Rest aus der Gelherstellung)



- das Gel in die Gelkammer setzen und mit TBE-Puffer bedecken (die Elektroden müssen mit Laufpuffer bedeckt sein)
- PFGE starten: ein gespeichertes Programm laden und die Elektrophorese starten (Im MAIN MENUE wird der Punkt FILER MENUE angewählt und mit Enter bestätigt, im FILER MENUE wird LOAD ausgewählt: es erscheint die Liste der gespeicherten Programme.)  
Mit der TAB-Taste wird das Laufprogramm angewählt und mit Enter geladen.  
Über EXIT verläßt man das FILER MENUE und startet den PFGE-Lauf vom MAIN MENUE (Menüpunkt START RUN) aus durch Drücken der Enter-Taste.

## **5. Tag:**

### **Auswertung**

- nach Beendigung des Laufs das Gel aus dem Gerät nehmen
- Gel 15 min anfärben in Ethidiumbromid-Lösung (0.5 µg/ml), anschließend 20 min wässern
- Dokumentation: mit der INTAS-Digitalkamera fotografieren und die Bilddatei speichern

### 7.3 Rezepturen von Medien, Chemikalien und Reagenzien

#### 7.3.1 Rezepturen der Medien aus Tabelle 3.1

##### Äsculin-Bouillon

zum Nachweis des Abbaus von Äsculin

Zusammensetzung: (Laborbuch Bonn)

Pepton aus Fleisch	10,0	g
Natriumchlorid	5,0	g
Aesculin	1,0	g
Aqua dest.	ad 1000,0	ml
pH 7,5		

##### Arginin-Bouillon nach SCHUBERT

zum Nachweis des Argininabbaus

Fertigmedium, Merck Art.Nr. 1.13892.0500

Zusammensetzung:

Pepton aus Casein	17,0	g
Pepton aus Soyamehl	3,0	g
D(+)-Glucose	0,5	g
Natriumchlorid	5,0	g
L-Argininmonohydrochlorid	10,0	g
Bromthymolblau	0,0075	g
Kresolrot	0,010	g
Brilliantgrün	0,00038	g
Aqua dest.	ad 1000,0	ml
pH 7,0 (+/- 0,2) bei 25°C, autoklavieren bei 121°C, 15 Min		

##### BPLS- (Brilliantgrün-Phenolrot-Lactose-Saccharose) Agar

als festes Selektivmedium für den *Salmonella*-Nachweis

Fertigmedium, Merck Art.Nr. 1.07237.0500

Zusammensetzung:

Pepton aus Fleisch	5,0	g
Pepton aus Casein	5,0	g
Fleischextrakt	5,0	g
Natriumchlorid	3,0	g
di-Natriumhydrogenphosphat	2,0	g
Lactose	10,0	g
Saccharose	10,0	g
Phenolrot	0,08	g
Brilliantgrün	0,0125	g

Agar-Agar	12,0	g
Aqua dest	ad 1000,0	ml

pH 6,9 (+/- 0,2) bei 25°C, autoklavieren bei 121°C, 15 Min

### **Caseinpepton-Glucose-Hefeextrakt-Agar (Plate-Count-Agar)**

zur Gesamtkeimzahlbestimmung mit dem Plattengussverfahren

Fertigmedium, Merck Art.Nr. 1.05463.0500/5000

Zusammensetzung:

Pepton aus Casein	5,0	g
Hefeextrakt	2,5	g
D(+)Glucose	1,0	g
Agar-Agar	14,0	g
Aqua dest.	ad 1000,0	ml

pH 7,0 (+/- 0,2) bei 25°C, autoklavieren bei 121°C, 15 Min

### **Diasalm nach VAN NETTEN und VAN DER ZEE**

als halbfestes Selektivmedium für den *Salmonella*-Nachweis

Fertigmedium, Merck Art.Nr. 1.09803.0500

Zusammensetzung:

Pepton aus Casein	13,5	g
Pepton aus Fleisch	13,5	g
Saccharose	7,5	g
Lactose	0,5	g
Ammoniumeisen(II)sulfat	0,2	g
Natriumthiosulfat	0,8	g
Kaliumdihydrogenphosphat	1,47	g
Magnesiumchlorid 6H <sub>2</sub> O	23,3	g
Malachitgrün	0,037	g
Bromkresolpurpur	0,08	g
Agar-Agar	2,7	g
Aqua dest.	ad 1000,0	ml

pH 5,5 (+/- 0,2) bei 25°C, auflösen in strömendem Dampf, nicht autoklavieren

MRSV-Selektiv-Supplement (10 mg Novobiocin), Merck Art.Nr.1.09874.0001

in 1ml sterilem destillierten Wasser lösen, Zugabe zum abgekühlten Medium (45-47°C)

### **Harnstoff-Bouillon**

zum Nachweis der Harnstoffverwertung

Fertigmedium, Merck Art.Nr. 1.08483.0500

Zusammensetzung:

Hefeextrakt	0,1 g
Kaliumdihydrogenphosphat	9,1 g
di-Natriumhydrogenphosphat	9,5 g
Harnstoff	20,0 g
Phenolrot	0,01 g
Aqua dest.	ad 1000,0 ml

pH 6,8 (+/- 0,2) bei 25°C, unter Erwärmung lösen, sterilfiltrieren oder im strömenden Dampf 5 Min schonend sterilisieren

### **Low-Melting-Point-Agarose**

1,2% Agarose (Agarose II, 0815, Amresco, Sofon, Ohio)

in TBE-Lösung

### **Lysin-Eisen-Agar**

zum gleichzeitigen Nachweis von Lysindecaboxylase und der Bildung von Schwefelwasserstoff

Fertigmedium, Merck Art.Nr. 1.1640.0500

Zusammensetzung:

Pepton aus Fleisch	5,0 g
Hefeextrakt	3,0 g
D(+)Glucose	1,0 g
L-Lysinmonohydrochlorid	10,0 g
Natriumthiosulfat	0,04 g
Ammoniumeisen(III)-citrat	0,5 g
Bromkresolpurpur	0,02 g
Agar-Agar	12,5 g
Aqua dest.	ad 1000,0 ml

pH 6,7(+/- 0,2) bei 25°C, autoklavieren bei 121°C, 15 Min

### **Malonat-Phenylalanin-Bouillon nach SHAW UND CLARK**

zum Nachweis der Malonatverwertung und Phenylalanin-desaminierung

Fertigmedium, Merck Art.Nr. 1.05419.0100

Zusammensetzung:

Hefeextrakt	1,0 g
Ammoniumsulfat	2,0 g

di-Kaliumhydrogenphosphat	0,6	g
Kaliumdihydrogenphosphat	0,4	g
Natriumchlorid	2,0	g
Natriummalonat	3,0	g
L-Phenylalanin	1,0	g
Bromthymolblau	0,025	g
Aqua dest.	ad 1000,0	ml

pH 6,6 (+/- 0,2) bei 25°C, autoklavieren bei 115°C, 10 Min

### **MLCB- (Mannit-Lysin-Kristallviolett-Brilliantgrün) Agar**

als festes Selektivmedium für den *Salmonella*-Nachweis

Fertigmedium, OXOID Art.-Nr. CM 783

Zusammensetzung:

Hefeextrakt	5,0	g
Pepton	10,0	g
Fleischextrakt 'Lab-Lemco'	2,0	g
Natriumchlorid	4,0	g
Mannit	3,0	g
L-Lysin	5,0	g
Natriumthiosulfat	4,0	g
Eisen(III)ammoniumcitrat	1,0	g
Brilliantgrün	0,0125	g
Kristallviolett	0,01	g
Agar	15,0	g
Aqua dest.	ad 1000,0	ml

pH 6,8 (+/- 0,1), unter Erwärmung lösen, nicht autoklavieren

### **MR-VP- (Methylrot-VOGES-PROSKAUER) Bouillon**

zur Durchführung der Methylrotprobe und des VOGES-PROSKAUER Tests

Fertigmedium, Merck Art.Nr. 1.05712.0500

Zusammensetzung:

Pepton aus Fleisch	7,0	g
D(+)-Glucose	5,0	g
Phosphatpuffer	5,0	g
Aqua dest.	ad 1000,0	ml

pH 6,9 (+/- 0,2) bei 25°C, autoklavieren bei 121°C, 15 Min

### **NaCl-Pepton**

Pepton (Casein, tryptisch verdaut)	1,0	g
Natriumchlorid	8,5	g
Aqua dest.	ad. 1000,0	ml

pH 7,0 +/-0,1 bei 25 °C, autoklavieren bei 121°C, 15 Min

### **Nitrat-Bouillon**

zum Nachweis von Nitratreduktion und Indolbildung

Fertigmedium, Merck Art.Nr. 1.10204.0500

Zusammensetzung:

Pepton aus Fleisch	8,6 g
Natriumchlorid	6,4 g
Kaliumnitrat	1,5 g

pH 7,2 (+/- 0,2) bei 25°C, autoklavieren bei 121°C, 15 Min

### **OF-(Oxidation-Fermentation) Testnährboden nach HUGH und LEIFFSON**

zur Erkennung des oxidativen und fermentativen Abbaus von Kohlenhydraten (hier: Glucose)

Fertigmedium, Merck Art.Nr.1.10282.0500

Zusammensetzung:

Pepton aus Casein	2,0 g
Hefeextrakt	1,0 g
Natriumchlorid	5,0 g
di-Kaliumhydrogenphosphat	0,2 g
Bromthymolblau	0,08 g
Agar-Agar	2,5 g
Aqua dest.	ad 1000,0 ml

pH 7,1 (+/-0,2) bei 25 °C, autoklavieren bei 121°C, 15 Min

Zugabe zum abgekühlten Medium: 100 ml pro Liter einer 10%igen sterilfiltrierten Lösung von D(+)Glucose; zur Testung des fermentativen Abbaus die Röhrcchen mit Paraffinöl überschichten

### **OF-(Oxidation-Fermentation) Testnährboden nach HUGH und LEIFFSON mit Ornithin**

zum Nachweis der Ornithindecaboxylase

Fertigmedium, Merck Art.Nr.1.10282.0500, als Basis

zusätzliche Inhaltsstoffe:

D(+)Glucose	1,0 g
L-Ornithinmonohydrochlorid	5,0 g

Die Zubereitung erfolgt entsprechend der Anleitung für den Basisnährboden.

**Phenolrot- Bouillon (Basis) mit Zusatz verschiedener Zucker**

zum Nachweis des Abbaus von Kohlenhydraten

Zusammensetzung:

Pepton aus Casein	5,0	g
Pepton aus Fleisch	5,0	g
Natriumchlorid	5,0	g
Phenolrot	0,018	g
Aqua dest.	ad 1000,0	ml

autoklavieren bei 121°C, 15 min

Zugabe zum abgekühlten Medium: sterilfiltrierte Lösung der verschiedenen Kohlenhydrate bis zu einer Endkonzentration von 5,0 bis 10,0 g/L

pH 7,4 (+/- 0,2) bei 25°C

Folgende Kohlenhydrate wurden im Einzelnachweis verwendet:

Adonit	(Merck Art.Nr. 1.00846)
L(+)Arabinose	(Merck Art.Nr. 1.10987)
Dulcitol	(Merck Art.Nr. 1.05990)
myo-Inositol	(Merck Art.Nr. 1.04728)
D(-)Mannit	(Merck Art.Nr. 1.05982)
Raffinose-Pentahydrat	(Merck Art.Nr. 1.07549)
L(+)Rhamnose-Monohydrat	(Merck Art.Nr. 1.04736)
Salicin	(Merck Art.Nr. 1.07665)
D(-)Sorbit	(Merck Art.Nr. 1.07758)

**Physiologische Kochsalzlösung (0,85 %)**zur Erstellung der Verdünnungsreihen und zur Voranreicherung von *Salmonella*

Fertigmedium, OXOID Art.-Nr. BR 53

Zusammensetzung:

Natriumchlorid	8,5	g
Aqua dest.	ad 1000,0	ml

pH 7,0 (+/- 0,1), autoklavieren

### **Salmonella-Anreicherungsbouillon nach RAPPAPORT**

zur selektiven Anreicherung von *Salmonella*

Fertigmedium, Merck Art.Nr. 1.10236.0500

Zusammensetzung:

Pepton aus Casein	5,0	g
Natriumchlorid	8,0	g
di-Kaliumhydrogenphosphat	0,8	g
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	40,0	g
Malachitgrün	0,12	g
Aqua dest.	ad 1000,0	ml

pH 6,0 (+/- 0,2) bei 25°C, autoklavieren bei 121°C, 20 Min

### **Simmons-Citrat-Agar**

zum Nachweis der Verwertung von Citrat als einziger Kohlenstoffquelle

Fertigmedium, Merck Art.Nr. 1.02501.0500

Zusammensetzung:

Ammoniumdihydrogenphosphat	1,0	g
di-Kaliumhydrogenphosphat	1,0	g
Natriumhydrochlorid	5,0	g
Natriumcitrat	2,0	g
Magnesiumsulfat	0,2	g
Bromthymolblau	0,08	g
Agar-Agar	13,0	g
Aqua dest.	ad 1000,0	ml

pH 6,6 (+/- 0,2) bei 25°C, autoklavieren bei 121°C, 15 Min

### **SIM-Nährboden**

zur Prüfung auf Sulfidbildung, Indolbildung und Beweglichkeit (*motility*)

Fertigmedium, Merck Art.Nr. 1.5470.0500

Zusammensetzung:

Pepton aus Casein	20,0	g
Pepton aus Fleisch	6,6	g
Ammoniumeisen(III)-citrat	0,2	g
Natriumthiosulfat	0,2	g
Agar-Agar	3,0	g
Aqua dest.	ad 1000,0	ml

pH 7,3 (+/- 0,2) bei 25°C, autoklavieren bei 121°C, 15 Min



**Standard-I-Nähragar**

zur Anzüchtung von Reinkulturen zur weiteren biochemischen und serologischen Differenzierung

Fertigmedium, Merck Art.Nr. 1.07881.5000

Zusammensetzung:

Peptone	15,0	g
Hefeextrakt	3,0	g
Natriumchlorid	6,0	g
D(+)-Glucose	1,0	g
Agar-Agar	12,0	g
Aqua dest	ad 1000,0	ml

pH 7,5 (+/-0,2) bei 25°C, autoklavieren bei 121°C, 15 Min

**TBG- (Tetrathionat-Brilliantgrün-Galle-Anreicherungs-) Bouillon**

zur selektiven Anreicherung von *Salmonella*

Fertigmedium, Merck Art.Nr. 1.05172.0500

Zusammensetzung:

Pepton aus Fleisch	8,6	g
Ochsengalle, getrocknet	8,0	g
Natriumchlorid	6,4	g
Calciumcarbonat	20,0	g
Kaliumtetrathionat	20,0	g
Brilliantgrün	0,07	g
Aqua dest	ad 1000,0	ml

pH 7,0 (+/- 0,2) bei Raumtemperatur, auflösen bei 90°C, nicht autoklavieren

**TSI-Agar (Eisen-Dreizucker-Agar, Triple-Sugar-Iron)**

zur Testung der Glucosespaltung, Lactosespaltung, Schwefelwasserstoffbildung und Gasbildung

Fertigmedium, Merck Art.Nr.1.03915.0500

Zusammensetzung:

Pepton aus Casein	15,0	g
Pepton aus Fleisch	5,0	g
Fleischextrakt	3,0	g
Hefeextrakt	3,0	g
Natriumchlorid	5,0	g
Lactose	10,0	g
Saccharose	10,0	g
D(+)-Glucose	1,0	g
Ammoniumeisen(III)-citrat	0,5	g
Natriumthiosulfat	0,5	g

Phenolrot	0,024 g
Agar-Agar	12,0 g
Aqua dest.	ad 1000,0 ml

pH 7,4 (+/-0,2) bei 25°C, autoklavieren bei 121°C, 15 Min

### **VRBD (Kristallviolett-Neutralrot-Galle-Glucose)-Agar nach MOSSEL**

zur Bestimmung der Enterobacteriaceae im Spatelverfahren

Fertigmedium, Merck Art. Nr. 1.10275.0500

Zusammensetzung:

Pepton aus Fleisch	7,0 g
Hefeextrakt	3,0 g
Natriumchlorid	5,0 g
D(+)Glucose	10,0 g
Gallesalzmischung	1,5 g
Neutralrot	0,03 g
Kristallviolett	0,002 g
Agar-Agar	13,0 g
Aqua dest.	ad 1000,0 ml

pH 7,3 (+/- 0,2) bei 25°C, auflösen im strömenden Dampf, nicht autoklavieren

### **7.3.2 Chemikalien und Reagenzien zur phänotypischen Untersuchung von Isolaten**

Zur Durchführung der *Gramfärbung* waren folgende Lösungen erforderlich:

#### 1) Karbolgentianaviolett:

Karbolgentianaviolett-Stammlösung:

5 g Gentianaviolett  
100 ml Ethanol 95%

Karbolgentianaviolett-Gebrauchslösung

10 ml Karbolgentianaviolett-Stammlösung  
90 ml einer 1%igen Phenollösung

#### 2) Lugolsche Lösung

Lugol-Stammlösung

5 g Jod  
10 g Kaliumjodid  
100 ml Aqua dest.

## 3) Entfärbemittel

Ethanol 96%

## 4) Safranin-Gegenfärbung

Safranin-Lösung (0,25%)

0,25 g Safranin O  
 10,0 ml Ethanol 95%  
 90,0 ml Aqua dest.

Zum Nachweis der *Cytochromoxidase* wurden Bactident<sup>®</sup>-Oxidase Teststäbchen der Firma Merck (Art. Nr. 1.13300.0001) verwendet.

Der mikrobielle Abbau von Nitrat in einer Nitrat-Bouillon wurde durch *GRIESS-ILOSVAYS Reagenz* (Merck Art. Nr. 1.09023.0500) bestätigt, welches sich aus Sulfanilsäure, 1-Naphtylamin und Essigsäure zusammensetzt. Um eine falschnegative Reaktion auszuschließen, wurde ggf. *Zinkstaub* zugesetzt (Merck Art. Nr. 1.08774).

Mit KOVÁCS-Indolreagenz (Merck Art. Nr. 1.09293) konnte die mikrobielle Bildung von Indol im SIM-Nährmedium nachgewiesen werden. Das Reagenz setzt sich zusammen aus n-Butanol, Salzsäure und 4-Dimethylaminobenzaldehyd.

Der Nachweis der Acetoinbildung aus Glucose erfolgt auf der MRVP-Bouillon mit Hilfe folgender Reagenzien:

*Kreatin-Lösung*

Kreatinmonohydrat	0,5 g
Aqua dest.	100,0 ml

*1-Naphtol-Reagenz*

1-Naphtol	6,0 g
Ethanol 96%	100,0 ml

*Kalilauge 40%*

Kaliumhydroxid	40,0 g
Aqua dest.	100,0 ml

Die Methylrot-Probe wurde auf der MRVP-Bouillon mit Methylrot-*Indikatorlösung* durchgeführt.

Methylrot-Indikatorlösung:

0,04 g Methylrot (Merck Art. Nr. 1.06076)  
60 ml Ethanol Absolut  
pH 5,0

Die Phenylalanin-desaminierung wurde auf der Malonat-Phenylalanin-Bouillon nach SHARK und CLARKE nachgewiesen. Dazu wurde das Nährmedium mit 0,1 N Salzsäure angesäuert und anschließend mit 10%iger wässriger Lösung von Eisen(III)chlorid (Eisen(III)-chlorid-Hexahydrat z.A., Merck Art. Nr. 1.03943) überschichtet.

Als Äsculin-Reagenz zum Nachweis des Äsculinabbaus diente 10%ige Eisen(III)citrat-Lösung (laborinterne Rezeptur, Laborbuch Bonn).

Der Nachweis der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität erfolgte mittels o-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galaktopyranosid (ONPG-Scheiben) der Firma Oxoid (Art. Nr. DD 13).

---

### **7.3.3 Chemikalien und Reagenzien zur genotypischen Untersuchung von Isolaten**

**96% Ethanol p.A.**

#### **Äquilibrier-Puffer**

Eigenprodukt nach Angabe des Enzymherstellers (pH: enzymoptimiert)

#### **Enzym-Puffer**

Vom Hersteller mitgeliefert (pH: enzymoptimiert)

#### **Restriktionsendonuklease-Lösungen**

XbaI 60U, BlnI 30U, SpeI 40U

jeweils mit:

10 mM Tris-HCl, pH 8

100 mM NaCl

7 mM MgCl<sub>2</sub>

7mM Mercaptoethanol

#### **Bromphenolblau-Ladepuffer**

40 mg Na<sub>2</sub>-EDTA (= Titriplex III)

4 g Saccharose,

3 mg Bromphenolblau

in 10 ml A. bidest

#### **Ethidiumbromid-Lösung 0,5 µg/ml**

Alle weiteren verwendeten Lösungen sind in Kapitel 3.2.5.4 beschrieben.

7.4 Dokumentationsvorlagen

7.4.1 Vorversuche (interne Qualitätssicherung)

**Qualitäts-Sicherung: Salmonella-Nachweis aus Rein- und Mischkulturen [persönlicher Bogen]**

Name: \_\_\_\_\_ Versuchsgang: \_\_\_\_\_ Isolat: \_\_\_\_\_  
 Datum: \_\_\_\_\_ Reinkultur: \_\_\_\_\_ geprüft am: \_\_\_\_\_  
 Labor-Nr.: \_\_\_\_\_ Mischkultur aus: \_\_\_\_\_ angesetzt am: \_\_\_\_\_

Verdünnungsstufe, dezimal	-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7	-8	-9	-10	-11	-12	-13	-14	-15
<b>1. Gesamtkeimzahl auf Plate-Count-Agar</b> (Rohdaten auf 2 Verdünnungsstufen)															

Gesamtkeimzahl:

2. Tetrathionat (10:100), 37°C	-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7	-8	-9	-10	-11	-12	-13	-14	-15
24h BPLS															
MLCB															
48h BPLS															
MLCB															

Salmonella typisches Ergebnis: +, fragliches Ergebnis: ?, negatives Ergebnis: -

3. Rappaport-V. (0,1:10), 42°C	-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7	-8	-9	-10	-11	-12	-13	-14	-15
24h BPLS															
MLCB															
48h BPLS															
MLCB															

Salmonella typisches Ergebnis: +, fragliches Ergebnis: ?, negatives Ergebnis: -

4. Salmonella-Nachweis	-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7	-8	-9	-10	-11	-12	-13	-14	-15
Angabe der Herkunft (Platte)															
<b>Bestätigung:</b>															
- biochemisch															
- serologisch															

positives Ergebnis: +

## 7.4.2 Gesamtkeimzahl

### Vordruck Gesamtkeimzahl (Schweine-Salmonellen-Projekt)

Proben-Nr.: \_\_\_\_\_  
 Probentyp: \_\_\_\_\_

Datum: \_\_\_\_\_

Verdünnungs- stufe	Platte 1	Platte 2

**Ergebnis (Plattenguß)**

\_\_\_\_\_

Proben-Nr.: \_\_\_\_\_  
 Probentyp: \_\_\_\_\_

Verdünnungs- stufe	Platte 1	Platte 2

**Ergebnis (Plattenguß)**

\_\_\_\_\_

Proben-Nr.: \_\_\_\_\_  
 Probentyp: \_\_\_\_\_

Verdünnungs- stufe	Platte 1	Platte 2

**Ergebnis (Plattenguß)**

\_\_\_\_\_

Proben-Nr.: \_\_\_\_\_  
 Probentyp: \_\_\_\_\_

Verdünnungs- stufe	Platte 1	Platte 2

**Ergebnis (Plattenguß)**

\_\_\_\_\_

Proben-Nr.: \_\_\_\_\_  
 Probentyp: \_\_\_\_\_

Verdünnungs- stufe	Platte 1	Platte 2

**Ergebnis (Plattenguß)**

\_\_\_\_\_

Proben-Nr.: \_\_\_\_\_  
 Probentyp: \_\_\_\_\_

Verdünnungs- stufe	Platte 1	Platte 2

**Ergebnis (Plattenguß)**

\_\_\_\_\_









**7.4.6 Salmonella (Biochemie)**

Datum \_\_\_\_\_

Durchgang	Nr.	Medium

Glu +	Lact -	H <sub>2</sub> S +	Gas +	Lysin +/+	Urea -	Bew. +	H <sub>2</sub> S +	Indol -	VPR 22°C -	VPR 37°C -

Omni	NaCl

Poly			NaCl
I	II	III	

**O-Phase**

NaCl	
Anti	

**H-Phase**

NaCl	
Anti	

Schwärmagar mit Anti \_\_\_\_

**H-Phase**

NaCl	
Anti	

Große Biochemie	
Methylrot (+)	
Citrat (+)	
Phenylalanin (-)	
Arginin (d)	
Ornithin (+)	
Malonat (d)	
Mannitol (+)	
Dulcitol (d)	
Salicin (-)	
Adonitol (-)	
Inositol (d)	
Sorbitol (+)	
Arabinose (+)	
Raffinose (-)	
Rhamnose (+)	
Aesculin (-)	
β-Galaktosidase (d)	

ERGEBNIS: \_\_\_\_\_

## 8 Literaturverzeichnis

AHMED, R., G. SOULE, W.H. DEMCZUK, C. CLARK, R. KHAKHRIA, S. RATNAM, S. MARSHALL, L.K. NG, D.L. WOODWARD, W.M. JOHNSON, and F.G. RODGERS (2000):

Epidemiologic typing of *Salmonella enterica* serotype enteritidis in a Canada-wide outbreak of gastroenteritis due to contaminated cheese.  
J. Clin. Microbiol. **38**, 2403-2406

ALLEN, K.J., and C. POPPE (2002):

Phenotypic and genotypic characterization of food animal isolates of *Salmonella* with reduced sensitivity to ciprofloxacin.  
Microb. Drug Resist. **8**, 375-383

AMMON, A., P. GASTMEIER, K. WEIST , M.H. KRAMER und L.R. PETERSEN (2001):

Empfehlungen zur Untersuchung von Ausbrüchen nosokomialer Infektionen  
RKI, Berlin

ANDERSON, E.S., L.R. WARD, M.J. SAXE, and J.D. DE SA (1977):

Bacteriophage-typing designations of *Salmonella typhimurium*.  
J. Hyg. **78**, 297-300

ANG KUCÜKER, M., V. TOLUN, R. HELMUTH, W. RABSCH, Ö. BÜYÜKBADABORAL, D. TÖRÜMKÜNEY-AKBULUT, S. SUSEVER, and Ö. ANG (2000):

Phage types, antibiotic susceptibilities and plasmid profiles of *Salmonella typhimurium* and *Salmonella enteritidis* strains isolated in Istanbul, Turkey.  
Clin. Microbiol. Infect. **6**, 593-599

ASAI, T., Y. OTAGIRI, T. OSUMI , T. NAMIMATSU, H. HIRAI, and S. SATO (2001):

Isolation of *Salmonella* from diarrheic feces of pigs.  
J. Vet. Med. Sci. **64**, 159-160

BAGGESEN, D.L., H.C. WEGENER, F. BAGER, H. STEGE and, J. CHRISTENSEN  
(1996):

Herd prevalence of *Salmonella* enterica infections in Danish slaughter pigs  
determined by microbiological testing.

Prev. Vet. Med. **26**, 201-213

BAIRD-PARKER, A.C. (1990):

Foodborne salmonellosis.

Lancet **336**, 1231-1235

BARBER, D.A., R.M. WEIGEL, R.E. ISAACSON, P.B. BAHNSON, and C.J. JONES  
(1999):

Spatial and temporal patterns of the distribution of *Salmonella* on swine farms  
in Illionois

in: Proc. of the 3<sup>rd</sup> International Symposium on the Epidemiology and Control  
of *Salmonella* in Pork, 05.08.-07.08.1999, Washington D.C., S. 97-100

BARBER, D.A., P.B. BAHNSON, R. ISAACSON, C.J. JONES, and R.M. WEIGEL  
(2002):

Distribution of *Salmonella* in swine production ecosystems.

J. Food. Prot. **65**, 1861-1868

BARRELL, R.A. (1987):

Isolations of *Salmonella* from humans and foods in the Manchester area:  
1981-1985.

Epidemiol. Infect. **98**, 277-284

BELOEIL, P.A., C. CHAUVIN, K. PROUX, N. ROSE, S. QUEGUINER, E. EVENO, C.  
HOUDAYER, V. ROSE, P. FRAVOLO, and F. MADEC (2003):

Longitudinal serological responses to *Salmonella* enterica of growing pigs in a  
subclinically infected herd.

Prev. Vet. Med. **60**, 207-226

BERENDS, B.R., H.A.P. URLINGS, J.M.A. SNIJDERS, and F. VAN KNAPEN (1996):  
Identification and quantification of risk factors in animal management and transport regarding *Salmonella* spp. in pigs.  
Int. J. Food Microbiol. **30**, 37-53

BERENDS, B.R., F. VAN KNAPEN, J.M.A. SNIJDERS, and D.A.A. MOSSEL (1997):  
Identification and quantification of risk factors regarding *Salmonella* spp. on pork carcasses.  
Int. J. Food Microbiol. **36**, 199-206

BERENDS, B.R., F. VAN KNAPEN, D.A.A. MOSSEL, S.A. BURT, and J.M.A. SNIJDERS (1998):  
Impact on human health of *Salmonella* spp. on pork in The Netherlands and the anticipated effects of some currently proposed control strategies.  
Int. J. Food Microbiol. **44**, 219-229

BESSA, M.C., M. COSTA, and M. CARDOSO (2001):  
Prevalence of *Salmonella* sp. in slaughtered pigs in Rio Grande Do Sul, Brazil in: Proc. of the 4<sup>th</sup> International Symposium on the Epidemiology and Control of *Salmonella* and other Foodborne Pathogens in Pork, 02.09.-05.09.2001, Leipzig, S. 189-191

BOCKEMUEHL, J. (1997):  
Situation der Salmonellose in Deutschland: Kurzfassung eines Vortrags vom Seminar: Salmonellen, 30.09.1997 in Hamburg, Hygiene Institut, Abteilung Bakteriologie  
<http://www.haccp.de/salmosit.htm>

BONARDI, S., F. BRINDANI, G. PIZZIN, L. LUCIDI, M. D'INCAU, E. LIEBANA, and S. MORABITO (2003):  
Detection of *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica* and verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in pigs at slaughter in Italy.  
Int. J. Food Microbiol. **85**, 101-110

BORCH, E., T. NESBAKKEN, and H. CHRISTENSEN (1996):

Hazard identification in swine slaughter with respect to foodborne bacteria.

Int. J. Food Microbiol. **30**, 9-25

BOTTELDOORN, N., M. HEYNDRICKX, N. RIJPENS, and L. HERMAN (2001):

The prevalence of *Salmonella*, campylobacter and VTEC in pig farms

in: Proc. of the 4<sup>th</sup> International Symposium on the Epidemiology and Control of *Salmonella* and other Foodborne Pathogens in Pork, 02.09.-05.09.2001,

Leipzig, S. 139-142

BOTTELDOORN, N., L. HERMAN, N. RIJPENS, and M. HEYNDRICKX (2004):

Phenotypic and molecular typing of *Salmonella* strains reveals different contamination sources in two commercial pig slaughterhouses.

Appl. Environ. Microbiol. **70**, 5305-5314

BOUGHTON, C., F.C. LEONARD, J. EGAN, G. KELLY, P. O'MAHONY, B.K. MARKEY, and M. GRIFFIN (2004):

Prevalence and number of *Salmonella* in irish retail pork sausages.

J. Food. Prot. **67**, 1834-1839

BREMER, V., K. LEITMEYER, E. JENSEN, U. METZEL, H. MECZULAT, E. WIESE, D. GERBER, H. TSCHAEPE, L. KREIENBROCK, S. GLASER, and A. AMMON (2004):

Outbreak of *Salmonella* Goldcoast infections linked to consumption of fermented sausage, Germany 2001.

Epidemiol. Infect. **132**, 881-887

BUNDESINSTITUT FÜR GESUNDHEITLICHEN VERBRAUCHERSCHUTZ UND VETERINÄRMEDIZIN (BGVV) [Hrsg.] (2001):

Deutscher Trendbericht über den Verlauf und die Quellen von Zoonosen-Infektionen nach der Zoonosen-RL (92/117/EWG) für das Jahr 2000

BUNDESINSTITUT FÜR RISIKOBEWERTUNG (BfR) (2005):

Salmonellen in Schweinefleisch - nach wie vor eine Risiko.

Pressemitteilung 06/2005 vom 12.02.2005

BURGSTALLER, G., G. BIERDERMANN, M. HUBER, L. PAHMEYER und J.P. RATSCHOW (1999):

Handbuch Schweineerzeugung

4., vollkommen überarb. und erw. Aufl., DLG-Verlag, Frankfurt, S. 265

CARLSON, A.R. and T. BLAHA (1999):

Investigations into the infection-contamination-infection cycle of zoonotic

*Salmonella* in swine farms: Investigation into the occurrence of *Salmonella* in 25 selected Minnesota swine farms

in: Proc. of the 3<sup>rd</sup> International Symposium on the Epidemiology and Control of *Salmonella* in Pork, 05.08.-07.08.1999, Washington D.C., S. 113-118

CARPENTER, J.A., J.G. ELLIOT, and A.E. REYNOLDS (1973):

Isolation of *Salmonellae* from pork carcasses.

Appl. Microbiol. **25**, 731-734

CAZABON, E.P., M.P. BERMENT, and N. SUPERSAD (1978):

*Salmonella* infection in market swine, Trinidad and Tobago.

Bull. Pan. Am. Health Organ. **12**, 51-54

CHIOU, C.S., T.L. LIAO, T.H. WANG, H.L. CHANG, J.C. LIAO, and C.C. LI (2004):

Epidemiology and molecular characterization of *Streptococcus pyogenes* recovered from scarlet fever patients in central Taiwan from 1996 to 1999.

J. Clin. Microbiol. **42**, 3998-4006

CHRISTENSEN, J., D.L. BAGGESEN, B. NIELSEN, and H. STYHN (2002):

Herd prevalence of *Salmonella* spp. in Danish pig herds after implementation of the Danish *Salmonella* Control Program with reference to a pre-implementation study.

Vet. Microbiol. **88**, 175-188



CONNERTON, P.L., C.M. LOC CARILLO, C. SWIFT, E. DILLON, A. COTT, C.E. REES, C.E. DODD, J. FROST, and I.F. CONNERTON (2004):

Longitudinal study of *Campylobacter jejuni* bacteriophages and their hosts from broiler chickens.

Appl. Environ. Microbiol. **70**, 3877-3883

CORNELL, J., and K.R. NEAL (1998):

Protracted outbreak of *Salmonella typhimurium* definitive phage type 170 food poisoning related to tripe, 'pig bag', and chitterlings.

Commun. Dis. Public Health **1**, 28-30

DAS, M.S., D.K. ROY, and S. DAS (1990):

Occurrence of *Salmonellae* in slaughtered pigs, goat meat, meat handlers and slaughter-house workers.

J. Commun. Dis. **22**, 39-42

DAVIES, P.R., F.G. BOVEE, J.A. FUNK, W.E. MORROW, F.T. JONES, and J. DEEN (1997):

Isolation of *Salmonella* serotypes from feces of pigs raised in a multiple-site production system.

J. Am. Vet. Med. Assoc. **212**, 1925-1929

DAVIES, R.H, R. DALZIEL, J.W. WILESITH, J. RYAN, S.J. EVANS, G.A. PAIBA, C. BYRNE, and S. PASCOE (2001):

National survey for *Salmonella* in pigs at slaughter in Great Britain in: Proc. of the 4<sup>th</sup> International Symposium on the Epidemiology and Control of *Salmonella* and other Foodborne Pathogens in Pork, 02.09.-05.09.2001, Leipzig, S. 162-173

DE SA, J.D.H., L.R. WARD, and B. ROWE (1980):

A scheme for the phage typing of *Salmonella hadar*.

FEMS Microbiol. Lett. **9**, 175-177

DE WIT, J.C., and E.H. KAMPELMACHER (1981):

Some aspects of microbial contamination of hands of workers in food industry.

Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B **172**, 390-400

DE WIT, J.C., and E.H. KAMPELMACHER (1982):

Microbiological aspects of washing hands in slaughter-houses.

Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B **176**, 553-561

DE WIT, J.C., and F.M. ROMBOUITS (1992):

Faecal microorganisms on the hand of carriers: *Escherichia coli* as a model for *Salmonella*.

Zbl. Hyg. **193**, 230-236

DEMCZUK, W., G. SOULE, C. CLARK, H.-W. ACKERMANN, R. EASY, R.

KHAKHIRA, F. RODGERS, and R. AHMED (2003):

Phage-based typing scheme for *Salmonella enterica* serovar Heidelberg, a causative agent of food poisonings in Canada.

J. Clin. Microbiol. **41**, 4279-4284

DEDIE, K., J. BOCKEMÜHL, H. KÜHN, K.J. VOLKMER und T. WEINKE (1993):

Bakterielle Zoonosen bei Tier und Mensch

Verlag Enke, Stuttgart

DELPECH, V., J. McANULTY, and K. MORGAN (1998):

A salmonellosis outbreak linked to internally contaminated pork meat.

Aust. N.Z. J. Public Health **22**, 243-246

DORN, C., A. SCHROETER, und R. HELMUTH (2004):

Stagnation auf hohem Niveau. Salmonellen beim Schwein – epidemiologische Situation und Bewertung des Verbraucherschutzrisikos.

Fleischwirtsch. **84**, 76-80

EBNER, P.D., and A.G. MATHEW (2001):

Three molecular methods to identify *Salmonella* enterica serotype Typhimurium DT104: PCR fingerprinting, multiplex PCR and rapid PFGE.  
FEMS Microbiol. Lett. **205**, 25-29

EINSCHÜTZ, K. (2004):

Wirksamkeitsprüfung verschiedener Verfahren zur Verminderung der Keimbelastung auf Handgeräten der Fleischgewinnung  
Vet. med. Diss., Freie Universität Berlin

EDEL, W., M. VAN SCHOTHORST, and E.H. KAMPELMACHER (1976):

Epidemiological studies on *Salmonella* in a certain area ("Walcheren Project"):  
I. The presence of *Salmonella* in man, pigs, insects, seagulls and in foods and effluents.  
Zbl. Bakteriologie. [Orig. A] **235**, 475-484

EDEL, W., and E.H. KAMPELMACHER (1976):

Epidemiological studies on *Salmonella* in a certain area ("Walcheren Project"):  
II. *Salmonella* in the mesenteric lymph nodes and rectal contents of normal pigs.  
Zbl. Bakteriologie. [Orig. A] **236**, 74-82

EDEL, W., M. VAN SCHOTHORST, F.M. VAN LEUSDEN, and E.H. KAMPELMACHER (1978):

Epidemiological studies on *Salmonella* in a certain area ("Walcheren project"):  
III. The presence of *Salmonella* in man, insects, seagulls and in foods, chopping-block scrapings from butcher's shops, effluent of sewage treatment plants and drains of butcher's shops.  
Zbl. Bakteriologie. [Orig. A] **242**, 468-480

FEHLHABER, K., A. KRÜGER, M. SCHNABEL und H.W. KRUTSCH (1996):

Untersuchungen zum *Salmonella*-Vorkommen bei tauglich beurteilten Schlachtschweinen.  
Fleischwirtsch. **76**, 1167-1169

FELIX, A., and B.R. CALLOW (1943):

Typing of paratyphoid B bacilli by means of Vi bacteriophage.

Br. Med. J. **2**, 127-130

FOODBORNE-NET

<http://www.foodborne-net.de>

FRIES, R., C. HILBERT, D. JAEGER und M. OETJEN (2002):

Zoonoseerreger in der Gewinnung von Schweinefleisch – Herkunftsbezogene Aufschlüsselung.

in: Proc. DVG, 43. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes "Lebensmittelhygiene", 24.09.-27.09.2002, Garmisch-Partenkirchen, S. 236-331

GARAIZAR, J., N. LOPEZ-MOLINA, I. LACONCHA, D. LAU BAGGESEN, A.

REMENTERIA, A. VIVANCO, A. AUDICANA, and I. PERALES (2000):

Suitability of PCR fingerprinting, infrequent-restriction-site PCR, and pulsed-field gel electrophoresis, combined with computerized gel analysis, in library typing of *Salmonella enterica* serovar enteritidis.

Appl. Environ. Microbiol. **66**, 5273-5281

GARDINER, K. (1991):

Pulsed Field Gel Electrophoresis.

Analytical Chemistry **63**, 658-665

GAREIS, M., R. ROTHENEDER und H. HECHELMANN (1996):

Vorkommen von *Salmonella* spp. in der Produktionslinie Schweinefleisch.

Fleischwirtsch. **76**, 1239-1243

GERICKE B., A. LIESEGANG, R. PRAGER, W. RABSCH und H. TSCHÄPE (2001):

Epidemiological and molecular analysis of *Salmonella* Typhimurium DT12 associated with consumption of pork in Thuringia

in : Proc. of the 4<sup>th</sup> International Symposium on the Epidemiology and Control of *Salmonella* and other Foodborne Pathogens in Pork, 02.09.-05.09.2001, Leipzig, S. 358-360

GESSNER, B.D., and M. BELLER (1994):

Protective effect of conventional cooking versus use of microwave ovens in an outbreak of salmonellosis.

Am. J. Epidemiol. **139**, 903-909

GIOVANNACCI, I., S. QUEGUINER, C. RAGIMBEAU, G. SALVAT, J.L.

VENDEUVRE, V. CARLIER, and G. ERMEL (2001):

Tracing of *Salmonella* spp. in two pork slaughter and cutting plants using serotyping and macrorestriction genotyping.

J. Appl. Microbiol. **90**, 131-147

GOH, Y.L., S.D. PUTHUCHEARY, and K.L. THONG (2000):

Application of ribosomal RNA gene restriction patterns analysis and pulsed-field gel electrophoresis in distinguishing *Salmonella weltevreden* isolates in Malaysia.

Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health **31**, 697-701

GORMAN, R., and C.C. ADLEY (2004):

Characterization of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium isolates from human, food, and animal sources in the Republic of Ireland.

J. Clin. Microbiol. **42**, 2314-2316

GUERRA, B., P. SCHROERS, and M.C. MENDOZA (2000):

Application of PFGE performed with XbaI to an epidemiological and phylogenetic study of *Salmonella* serotype typhimurium. Relations between genetic types and phage types.

New Microbiol. **23**, 11-20

HALD, T., A. WINGSTRAND, M. SWANENBURG, A. VON ALTROCK, N.

LIMPITAKIS, and B.M. THORBERG (2001):

Harvest epidemiology of *Salmonella* contamination in EU pig slaughterhouses

in : Proc. of the 3<sup>th</sup> International Symposium on the Epidemiology and Control of *Salmonella* in Pork, 05.08.-07.08.1999, Washington D.C., S. 273-276

HAMADA, K., and T. OSHIBE (2001):

Phylogenetic analysis of *Salmonella enteritidis* isolates from food poisonings using pulsed-field gel electrophoresis over the period of June 1997 to December 2000 in Hyogo Prefecture.

Jpn. J. Infect. Dis. **54**, 38-40

HARTWIG, N.R., and D.O. JONES (1976):

Survey for *Salmonellae* in porcine bile and cecums and on equipment surfaces in an Ohio abattoir.

J. Am. Vet. Med. Assoc. **169**, 1229-1230

HARVEY, R.B., R.C. ANDERSON, C.R. YOUNG, M.E. HUME, K.J. GENOVESE, R.L. ZIPRIN, L.A. FARRINGTON, L.H. STANKER, and D.J. NISBET (1999):

Prevalence of campylobacter, *Salmonella*, and arcobacter species at slaughter in market age pigs.

Adv. Exp. Med. Biol. **473**, 237-239

HEIR, E., B.A. LINDSTEDT, I. NYGARD, T. VARDUND, V. HASSELTVEDT, and G. KAPPERUD (2002):

Molecular epidemiology of *Salmonella typhimurium* isolates from human sporadic and outbreak cases.

Epidemiol. Infect. **128**, 373-382

HELMUTH R., B. GUERRA, B. MALORNY, A. MIKO, und A. SCHROETER (2004):

Erfassung phänotypischer und genotypischer Resistenzeigenschaften bei *Salmonella*- und *E.coli*-Isolaten vom Tier, Lebensmitteln, Futtermitteln und der Umwelt. Abschlussbericht zum Forschungsvorhaben

Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin

HICKMAN-BRENNER, F.W., A.D. STUBBS, and J.J. FARMER 3<sup>rd</sup> (1991):

Phage typing of *Salmonella enteritidis* in the United States.

J. Clin. Microbiol. **29**, 2817-2823

HOLTBY, I., G.M. TEBBUTT, E.M. GRUNERT, H.J. LYLE, and M.P. STENSON  
(1997):

Outbreak of *Salmonella* enteritidis phage type 6 infection associated with food items provided at a buffet meal.

Commun. Dis. Rep. CDR Rev. **7**, 87-90

HOLST, S. (1993):

*Salmonella* infection in Danish slaughter pigs.

Dansk. Vet. Tidsskr. **76**, 645-652

HORMACHE, E. und R. SALSAMENDI (1936) [ohne Titel]

zit. bei: McCaughey, W.J., T.G. McClelland and R.M. Roddy (1973):

*Salmonella* isolations in pigs.

Vet. Rec. **92**, 191-194

HUNTER, P.R. (1990):

Reproduceability and indices of discriminatory power of microbial typing methods.

J. Clin. Microbiol. **28**, 1903-1905

HUNTER, P.R., and M.A. GASTON (1998):

Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's Index of Diversity.

J. Clin. Microbiol. **26**, 2465-2466

HURD, H.S., J.D. McKEAN, R.W. GRIFFITH, I.V. WESLEY, and M.H. ROSTAGNO  
(2002):

*Salmonella* enterica infections in market swine with and without transport and holding.

Appl. Environ. Microbiol. **68**, 2376-2381

IBRAHIM, A.E. (1969):

Bacteriophage typing of *Salmonellae*. II. New bacteriophage typing scheme.

Appl. Microbiol. **18**, 748-54

INGRAM, M. (1977) [ohne Titel]

zit. bei: D.A.A. Mossel, J.E.L. Corry, and C.B. Striujk (1995)

Essentials of the microbiology of food

John Wiley & Sons Limited, Chichester

JACOBSSON, S., M. ISSA, M. UNEMO, A. BACKMAN, P. MOLLING, N. SULAIMAN, and P. OLCEN (2003):

Molecular characterisation of group A *Neisseria meningitidis* isolated in Sudan 1985-2001.

APMIS **111**, 1060-1066

JAY, J.M. (1996):

Modern food microbiology

5. Aufl., Chapman & Hall, New York

JAYARAO, B.M., G. BIRO, S. KOVACS, H. DOMJAN, and A. FABIAN (1989):

Prevalence of *Salmonella* serotypes in pigs and evaluation of a rapid presumptive test for detection of *Salmonella* in pig faeces.

Acta Vet. Hung. **37**, 39-44

JUNG, B.Y., W.W. LEE, H.S. LEE, O.K. KIM, and B.H. KIM (2001):

Prevalence of *Salmonella* in slaughter pigs in South Korea

in: Proc. of the 4<sup>th</sup> International Symposium on the Epidemiology and Control of *Salmonella* and other Foodborne Pathogens in Pork, 02.09.-05.09.2001,

Leipzig, S. 202-204

KAESBOHRER, A., D. PROTZ, R. HELMUTH, K. NOCKLER, T. BLAHA, F.J.

CONRATHS, and L. GEUE (2000):

*Salmonella* in slaughter pigs of German origin: an epidemiological study.

Eur. J. Epidemiol. **16**, 141-146



KAMPELMACHER, E.H., P.A.M. GUINEE, K. HOFSTRA, and A. VAN KEULEN  
(1961):

Studies on *Salmonella* in slaughter-houses.

Zbl. Veterinaermed. **8**, 1025-1042

KIM, S., S.G. CHUN, O.Y. LIM, M.S. PARK, Y.H. KANG, Y.H. PARK, and B.K. LEE  
(2004):

Genomic relationship of *Salmonella* enterica serovar typhimurium DT104  
isolates from Korea and the United States.

J. Microbiol. **42**, 14-19

KNIPPERS 2001

Molekulare Genetik

8. neubearb. Aufl., Georg Thieme Verlag, Stuttgart & New York

KORSAK, N., B. JACOB, B. GROVEN, G. ETIENNE, B. CHINA, Y. GHAFIR, and G.  
DAUBE (2003):

*Salmonella* contamination of pigs and pork in an integrated pig production  
system.

J. Food Prot. **66**, 1126-1133

KRAEMER, J. (2002):

Lebensmittelmikrobiologie

4. neubearb. Aufl, Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart, S. 33-46

KUCHLING, H. (1994):

Taschenbuch der Physik

14., neubearb. Aufl., Fachbuchverlag Leipzig, Leipzig

LACONCHA, I., N. LOPEZ-MOLINA, A. REMENTERIA, A. AUDICANA, I. PERALES, and J. GARAIZAR (1998):

Phage typing combined with pulsed-field gel electrophoresis and random amplified polymorphic DNA increases discrimination in the epidemiological analysis of *Salmonella enteritidis* strains.

Int. J. Food Microbiol. **40**, 27-34

LACONCHA, I., D.L. BAGGESEN, A. REMENTERIA, and J. GARAIZAR (2000):

Genotypic characterisation by PFGE of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis phage types 1, 4, 6, and 8 isolated from animal and human sources in three European countries.

Vet. Microbiol. **75**, 155-165

LAI, E., B.W. BIRREN, S.M. CLARK, M.I. SIMON, and L. HOOD (1989):

Pulsed Field Gel Electrophoresis.

BioTechniques **7**, 34-42

LALKO, J. (1965):

Evaluation of the method of phage and biochemical typing of *Salmonella paratyphi* B.

Biul. Inst. Med. Morsk Gdansk **16**, 147-168

LASZLO, V.G., and E.S. CSORIAN (1988):

Subdivision of common *Salmonella* serotypes: phage typing of *S. virchow*, *S. manhattan*, *S. thompson*, *S. oranienburg* and *S. bareilly*.

Acta Microbiol. Hung. **35**, 289-294

LASZLO, V.G., E.S. CSORIAN, and H. MILCH (1993):

Comparison of two *Salmonella enteritidis* phage typing methods.

Acta Microbiol. Hung. **40**, 255-263

LE BOURGOIS, P., M. LAUTIER, and P. RITZENTHALER (1993):

Chromosome mapping in lactic acid bacteria.

FEMS Microbiol. Rev. **12**, 109-123

LE MINOR, L.L. (1984):

Genus III. *Salmonella* Lignières 1900, 389<sup>AL</sup>

in: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volume 1.

Williams & Wilkins, Baltimore S. 427-458

LE MINOR, L.L., and M.Y. POPOFF (1987):

Designation of *Salmonella enterica* sp. nov., nom. rev., as the type and only species of the genus *Salmonella*.

Int. J. System. Bacteriol. **37**, 465-468

LEONTIDES, L., E. GRAFANAKIS, and C. GENIGEORGIS (2001):

Seroprevalence and antibiotic sensitivity of *Salmonella enterica* serotypes in Greek swine herds

in: Proc. of the 4<sup>th</sup> International Symposium on the Epidemiology and Control of *Salmonella* and other Foodborne Pathogens in Pork, 02.09.-05.09.2001,

Leipzig, S. 180-182

LETELLIER, A., S. MESSIER, J. PARE, J. MENARD, and S. QUESSY (1999):

Distribution of *Salmonella* in swine herds in Quebec.

Vet. Microbiol. **67**, 299-306

LEUE, C. (2005):

Herkunftsbezogenes Auftreten von *Salmonella* und *Campylobacter* in Lymphknoten von Mastschweinen

Vet. med. Diss., Freie Universität Berlin

LIEBANA, E. (2002):

Molecular tools for epidemiological investigations of *S. enterica* subspecies *enterica* infections.

Res. Vet. Sci. **72**, 169-175

LIEBANA, E., L. GARCIA-MIGURA, M.F. BRESLIN, R.H. DAVIES, and M.J. WOODWARD (2001):

Diversity of strains of *Salmonella enterica* serotype enteritidis from English poultry farms assessed by multiple genetic fingerprinting.

J. Clin. Microbiol. **39**, 154-161

LIEBANA, E., C. CLOUTING, L. GARCIA-MIGURA, F.A. CLIFTON-HADLEY, E. LINDSEY, E.J. THRELFALL, and R.H. DAVIES (2004):

Multiple genetic typing of *Salmonella* Enteritidis phage-types 4, 6, 7, 8 and 13a isolates from animals and humans in the UK.

Vet. Microbiol. **100**, 189-195

LIEBISCH, B., and SCHWARZ, S. (1996)

Molecular biological methods for epidemiological typing of *Salmonella* - a review.

Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. **109**, 348-354

LIESEGANG, A., and H. TSCHÄPE (2002):

Modified pulsed-field gel electrophoresis method for DNA degradation-sensitive *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* strains.

Int. J. Med. Microbiol. **291**, 645-648

LIN, A.W., M.A. USERA, T.J. BARRETT, and R.A. GOLDSBY (1996):

Application of random amplified polymorphic DNA analysis to differentiate strains of *Salmonella enteritidis*.

J. Clin. Microbiol. **34**, 870-876

LIMPITAKIS, N., A. GENIGEORGIS, A. ABRAHIM, L. LEONTIDES, S. GRAFANAKIS, and E. IOSIFIDOU (1999):

Post harvest epidemiology of *Salmonella enterica* in pork: Prevalence in the environment, carcasses and by-products in two slaughterhouses in Greece (1996-1998)

in: Proc. of the 3<sup>rd</sup> International Symposium on the Epidemiology and Control of *Salmonella* in Pork, 05.08.-07.08.1999, Washington D.C., S. 140-150

---

LINTON, A.H. (1979):

Salmonellosis in pigs.

Br. Vet. J. **135**, 109-112

LIU, S.L., A.B. SCHRYVERS, K.E. SANDERSON, and R.N. JOHNSTON (1999):

Bacterial phylogenetic clusters revealed by genome structure.

J. Bacteriol. **181**, 6747-6755

LLEWELLYN, L.J., M.R. EVANS, and S.R. PALMER (1998):

Use of sequential case-control studies to investigate a community *Salmonella* outbreak in Wales.

J. Epidemiol. Community Health **52**, 272-276

LU, P.L., I.J. HWANG, Y.L. TUNG, S.J. HWANG, C.L. LIN, and L.K. SIU (2004):

Molecular and epidemiologic analysis of a county-wide outbreak caused by *Salmonella* enterica subsp. enterica serovar Enteritidis traced to a bakery.

BMC Infect. Dis. **4**, 48

LUKINMAA, S., R. SCHILDT, T. RINTTILA, and A. SIITONEN (1999):

*Salmonella* enteritidis phage types 1 and 4: pheno- and genotypic epidemiology of recent outbreaks in Finland.

J. Clin. Microbiol. **37**, 2176-2182

MAGUIRE, H.C., A.A. CODD, V.E. MACKAY, B. ROWE, and E. MITCHELL (1993):

A large outbreak of human salmonellosis traced to a local pig farm.

Epidemiol. Infect. **110**, 239-246

MALORNY, B., A. SCHROETER, C. BUNGE, B. HOOG, A. STEINBECK, and R. HELMUTH (2001):

Evaluation of molecular typing methods for *Salmonella* enterica serovar Typhimurium DT104 isolated in Germany from healthy pigs.

Vet. Res. **32**, 119-129

MARTIN, R. (1996):

Elektrophorese von Nukleinsäuren

Heidelberg, Berlin, Oxford: Spektrum, Akademischer Verlag

MASLOW, J.N., A.M. SLUTSKY, and R.D. ARBEIT (1993):

Application of Pulsed-Field electrophoresis to molecular epidemiology

in: D.H. Persing, T.F. Smith, F.C. Tenover, and T.J. White (Eds.):

Diagnostic molecular microbiology, principles and application.

ASM, Washington D.C., S. 563-57

MATUSHEK, M.G., M.J. BONTEN, and M.K. HAYDEN (1996):

Rapid preparation of bacterial DNA for pulsed-field gel electrophoresis.

J. Clin. Microbiol. **34**, 2598-2600

MAURER, J.J. (2000):

Understanding the Molecular Methods for Typing Bacteria What does PFGE,  
RFLP, or BRENDA mean?

Poultry Informed Professional **34**, 1-6

McCAUGHEY, W.J., T.G. McCLELLAND, and R.M. RODDY (1973):

*Salmonella* isolations in pigs.

Vet. Rec. **92**, 191-194

McCLELLAND, M., R. JONES, Y. PATEL, and M. NELSON (1987):

Restriction endonucleases for pulsed field mapping of bacterial genomes.

Nucleic Acids Res. **15**, 5985-6005

MEAT & LIVESTOCK Commission (2001):

Review of research into *Salmonella* infection in pigs

<http://www.bpex.org/technical/researchArticles/pdf/SalmonellaReview.pdf>

MERINO, L.A., M.C. RONCONI, M.M. NAVIA, J. RUIZ, J.M. SIERRA, N.B. CECH, N.S. LODEIRO, and J. VILA (2003):

Analysis of the clonal relationship among clinical isolates of *Salmonella enterica* serovar Infantis by different typing methods.

Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo **45**, 119-123

MERTENS, P.L., J.F. THISSEN, A.W. HOUBEN, and F. STURMANS (1999):

An epidemic of *Salmonella typhimurium* associated with traditional salted, smoked, and dried ham.

Ned. Tijdschr. Geneeskd. **143**, 1046-1049

MINEYAMA, R., S. YOSHINO, and K. FUKUSHIMA (2004):

Genotypic analysis of strains of mutans streptococci by pulsed-field gel electrophoresis.

Microbiol. Res. **159**, 181-186

MOLBAK, K., D.L. BAGGESEN, F.M. AARESTRUP, J.M. EBBESEN, J. ENGBERG, K. FRYDENDAHL, P. GERNER-SMIDT, A.M. PETERSEN, and H.C. WEGENER (1999):

An outbreak of multidrug-resistant, quinolone-resistant *Salmonella enterica* serotype typhimurium DT104.

N. Engl. J. Med. **341**, 1420-1425

MOO, D., D. O'BOYLE, W. MATHERS, and A.J. FROST (1980):

The isolation of *Salmonella* from jejunal and caecal lymph nodes of slaughtered animals.

Aust. Vet. J. **56**, 181-183

MOSSEL, D.A.A., J.E.L. CORRY, and C.B. STRUIJK (1995)

Essentials of the microbiology of food

John Wiley & Sons Limited, Chichester

MUELLER, G. (1994):

Der Kettenhandschuh im Zerlegebetrieb aus hygienischer Sicht

Vet. med. Diss., Tierärztliche Hochschule Hannover

MURAKAMI, K., K. HORIKAWA, and K. OTSUKI (1999):

Epidemiological analysis of *Salmonella* enteritidis from human outbreaks by pulsed-field gel electrophoresis.

J. Vet. Med. Sci. **61**, 439-442

MURAKAMI, K., K. HORIKAWA, T. ITO, and K. OTSUKI (2001):

Environmental survey of *Salmonella* and comparison of genotypic character with human isolates in Western Japan.

Epidemiol. Infect. **126**, 159-171

MURASE, T., A. NAKAMURA, A. MATSUSHIMA, and S. YAMAI (1996):

An epidemiological study of *Salmonella* enteritidis by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE): several PFGE patterns observed in isolates from a food poisoning outbreak.

Microbiol. Immunol. **40**, 873-875

MURASE, T., M. YAMADA, T. MUTO, A. MATSUSHIMA, and S. YAMAI (2000):

Fecal excretion of *Salmonella* enterica serovar typhimurium following a food-borne outbreak.

J. Clin. Microbiol. **38**, 3495-3497

NAIR, S., S. ALOKAM, S. KOTHAPALLI, S. PORWOLLIK, E. PROCTOR, C. CHOY, M. McCLELLAND, S.L. LIU, and K.E. SANDERSON (2004):

*Salmonella* enterica serovar Typhi strains from which SPI7, a 134-kilobase island with genes for Vi exopolysaccharide and other functions, has been deleted.

J. Bacteriol. **186**, 3214-3223



NARAIN, J.P., and J.P. LOFGREN (1989):

Epidemic of restaurant-associated illness due to *Salmonella* newport.  
South. Med. J. **82**, 837-840

NG, D.P., K.T. GOH, M.G. YEO, and C.L. POH (1997):

An institutional outbreak of *Salmonella* enteritidis in Singapore.  
Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health **28**, 85-90

NORTJE, G.L., L. NEL, E. JORDAAN, K. BADENHORST, E. GOEDHART, and W.H. HOLZAPFEL (1990):

The aerobic psychotrophic populations on meat and meat contact surfaces in a meat production system and on meat stored at chill temperatures.  
J. Appl. Bacteriol. **68**, 335-344

OFFERMANN, U., L. AUDIGÉ, und T. JEMMI (1998):

Untersuchungen zur Häufigkeit und Verteilung von Salmonellen, Yersinien und Mykobakterien bei Schlachtschweinen in der Schweiz  
in: Proc. DVG, 39. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes "Lebensmittelhygiene",  
22.09.-25.09.1998, Garmisch-Partenkirchen, S. 230-233

OLIVE, D.M., and P. BEAN (1999):

Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms.  
J. Clin. Microbiol. **37**, 1661-1669

OLSEN, J.E., D.J. BROWN, M.N. SKOV, and J.P. CHRISTENSEN (1993):

Bacterial typing methods suitable for epidemiological analysis. Applications in investigations of Salmonellosis among livestock.  
Vet. Q. **15** 125-135

PEEL, B. and G.C. SIMMONS (1978):

Factors in the spread of *Salmonellas* in meatworks with special reference to kontamination of knives.  
Aust. Vet. J. **54**, 106-109

PLONAIT, H. und K. BICKHARDT (1988):

Lehrbuch der Schweinekrankheiten

Verlag Paul Parey, Berlin & Hamburg, S. 230-233

PRAGER, R., and H. TSCHAPE (2003):

Genetic fingerprinting (PFGE) of bacterial isolates for their molecular epidemiology.

Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. **116**, 474-481

QS-SYSTEM

<http://www.q-s.info.de>

RAHMAN, H. (2002):

Some aspects of molecular epidemiology & characterisation of *Salmonella* Typhimurium isolated from man & animals.

Indian J. Med. Res. **115**, 108-112

REGULA, G., B. CHOISAT, J. DANUSER, K.D.C. STÄRK, U. LEDERGERBER, and T. JEMMI (2001):

Prevalence of *Salmonella* in fattening pigs and pork from animal friendly farms in: Proc. of the 4<sup>th</sup> International Symposium on the Epidemiology and Control of *Salmonella* and other Foodborne Pathogens in Pork, 02.09.-05.09.2001, Leipzig, S. 217-219

RHEAULT, N., and S. QUESSY (2001):

Sampling of environment and carcasses for the detection of *Salmonella* in swine abbatoirs.

in: Proc. of the 4<sup>th</sup> International Symposium on the Epidemiology and Control of *Salmonella* and other Foodborne Pathogens in Pork, 02.09.-05.09.2001, Leipzig, S. 403-405

RIDLEY, A.M., E.J. THRELFALL, and B. ROWE (1998):

Genotypic characterization of *Salmonella* enteritidis phage types by plasmid analysis, ribotyping, and pulsed-field gel electrophoresis.

J. Clin. Microbiol. **36**, 2314-2321

ROBERT-KOCH-INSTITUT (RKI) und BUNDESINSTITUT FÜR  
GESUNDHEITLICHEN VERBRAUCHERSCHUTZ UND VETERINÄRMEDIZIN  
(BGVV) (1997):

Salmonellose - Erkennung, Bekämpfung, Verhütung (Merkblatt für Ärzte)

ROBERT-KOCH-INSTITUT (RKI) [Hrsg.] (1997):

Epidemiologisches Bulletin 24/97 (<http://www.rki.de>)

ROBERT-KOCH-INSTITUT (RKI) [Hrsg.] (1998):

Epidemiologisches Bulletin 8/98 (<http://www.rki.de>)

ROBERT-KOCH-INSTITUT (RKI) [Hrsg.] (1999):

Epidemiologisches Bulletin 15/99 (<http://www.rki.de>)

ROBERT-KOCH-INSTITUT (RKI) [Hrsg.] (2000):

Epidemiologisches Bulletin 23/00 (<http://www.rki.de>)

ROBERT-KOCH-INSTITUT (RKI) [Hrsg.] (2001a):

Epidemiologisches Bulletin 20/01 (<http://www.rki.de>)

ROBERT-KOCH-INSTITUT (RKI) [Hrsg.] (2001b):

Epidemiologisches Bulletin 22/01 (<http://www.rki.de>)

ROBERT-KOCH-INSTITUT (RKI) [Hrsg.] (2002a):

Epidemiologisches Bulletin 03/02 (<http://www.rki.de>)

ROBERT-KOCH-INSTITUT (RKI) [Hrsg.] (2002b):

Epidemiologisches Bulletin 18/02 (<http://www.rki.de>)

ROBERT-KOCH-INSTITUT (RKI) [Hrsg.] (2002c):

Epidemiologisches Bulletin 5/02 (<http://www.rki.de>)

ROBERT-KOCH-INSTITUT (RKI) [Hrsg.] (2002d):

Epidemiologisches Bulletin 25/02 (<http://www.rki.de>)

ROBERT-KOCH- INSTITUT (RKI) [Hrsg.] (2003):

Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2002  
Berlin, 2003

ROBERT-KOCH-INSTITUT (RKI) [Hrsg.] (2004):

Infektionsepidemiologisches Jahrbuch für 2004  
<http://www.rki.de>

ROBERT-KOCH-INSTITUT (RKI) [Hrsg.] (2004a):

Epidemiologisches Bulletin Nr. 18/2004 (<http://www.rki.de>)

ROBERT-KOCH-INSTITUT (RKI) [Hrsg.] (2004b):

Epidemiologisches Bulletin Nr. 45/2004 (<http://www.rki.de>)

ROBERT-KOCH-INSTITUT (RKI) [Hrsg.] (2005a):

Epidemiologisches Bulletin Nr. 07/2005 (<http://www.rki.de>)

ROBERT-KOCH-INSTITUT (RKI) [Hrsg.] (2005b):

Epidemiologisches Bulletin Nr. 33/2005 (<http://www.rki.de>)

ROTHENEDER, R., H. HECHELMANN und M. GAREIS (1997):

Salmonellen in der Produktionslinie Schweinefleisch - Vorkommen,  
Eintragsquellen und Konsequenzen.

Mitteilungsblatt der Bundesanstalt für Fleischforschung Kulmbach **36**, 166-168

ROWE, T.A., F.C. LEONARD, G. KELLY, P.B. LYNCH, J. EGAN, A.M. QUIRKE, and P.J. QUINN (2003):

*Salmonella* serotypes present on a sample of Irish pig farms.  
Vet. Rec. **153**, 453-456

SAUER, S., U. PUDICH, R. WERMTER, B. GERICKE, R. PRAGER, A. FRUTH, E. BROCKHAUS. H. TSCHÄPE, and W. RABSCH (2001):

An outbreak caused by *S. Typhimurium* DT177, BTa in Bavaria characterizes by an unusual antibiotic resistance and plasmid profile  
in: Proc. of the 4<sup>th</sup> International Symposium on the Epidemiology and Control of *Salmonella* and other Foodborne Pathogens in Pork, 02.09.-05.09.2001, Leipzig, S. 361-363

SCHÜTT-ABRAHAM, I., E. TROMMER, und R. LEVETZOW (1988):

Macht heißes Wasser Messer stumpf? Zur Wassertemperatur von 82°C bei der Reinigung in Schlachtbetrieben.  
Fleischwirtsch. **68**, 727-730

SCHÜTT-ABRAHAM, I., E. TROMMER, und R. LEVETZOW (1992)

Ultraschall im Steribecken? - Zum Einsatz von Ultraschall in Einrichtungen zur Reinigung und Desinfektion von Messern am Arbeitsplatz in Schlacht- und Zerlegebetrieben.  
Fleischwirtsch. **72**, 864-867

SCHMIEGER, H. (1999):

Molecular survey of the *Salmonella* phage typing system of Anderson.  
J. Bacteriol. **181**, 1630-1635

SCHROETER A., CH. DORN und R. HELMUTH (2000):

Bericht des Nationalen Veterinärmedizinischen Referenzlabors für  
Salmonellen im Jahr 2000

in: Deutscher Trendbericht über den Verlauf und die Quellen von Zoonosen-  
Infektionen nach der Zoonosen-RL (92/117/EWG) für das Jahr 2000  
zusammengestellt vom Nationalen Referenzlabor für die Epidemiologie der  
Zoonosen des BgVV

SCHROETER A., CH. DORN und R. HELMUTH (2001):

Bericht des Nationalen Veterinärmedizinischen Referenzlabors für  
Salmonellen im Jahr 2001

in: HARTUNG, M. (Hrsg.) (2002):

Bericht über die epidemiologische Situation der Zoonosen in Deutschland für  
2001

Berlin 2002 (BgVV-Heft 6/2002)

SCHWARTZ, D.C., and C.R. CANTOR (1984):

Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel  
electrophoresis.

Cell **37**, 67-75

SCIENTIFIC COMMITTEE ON VETERINARY MEASURES RELATING TO  
PUBLIC HEALTH (SCVPH) (2001):

The cleaning and disinfection of knives in the meat and poultry industry  
(2001).

Europ. Comm. Dir.- Gen. XXIV, Dir. C, Scientific Health Opinions, Unit C2-  
Management of

Scientific Committees II, Brussels

SCIENTIFIC COMMITTEE ON VETERINARY MEASURES RELATING TO PUBLIC  
HEALTH (SCVPH) (2003):

Opinion of the Scientific Committee on Veterinary Measures relating to Public  
Health on *Salmonellae* in Foodstuffs.

[http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scv/out66\\_en.pdf](http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scv/out66_en.pdf)

SCOTT, W.M. (1940) [ohne Titel]

zit. bei: McCaughey, W.J., T.G. McClelland and R.M. Roddy (1973):

*Salmonella* isolations in pigs.

Vet. Rec. **92**, 191-194

SCOTT, F., J. THRELFALL, J. STANLEY, and C. ARNOLD (2001):

Fluorescent amplified fragment length polymorphism genotyping of *Salmonella* Enteritidis: a method suitable for rapid outbreak recognition.

Clin. Microbiol. Infect. **7**, 479-485

SENO, M., M. SAKAI, and H. OGAWA (2004):

Genotypic diversity of *Salmonella* Enteritidis isolates from sporadic patients in limited area during one year.

J. Infect. **49**, 291-296

SIEGRIST H. H., L.CHAUX-DE-FONDS und D.S. BLANC (1995):

Typisierung von Bakterien: Methoden und epidemiologische Aussagekraft.

Swiss-Noso Band 2, Nr. 1, unpaginiert

SINELL H.J. (1992):

Einführung in die Lebensmittelhygiene

3. überarb. Aufl., Verlag Paul Parey, Berlin & Hamburg

SMITH, H.W. (1959) [ohne Titel]

zit. bei: McCaughey, W.J., T.G. McClelland and R.M. Roddy (1973):

*Salmonella* isolations in pigs.

Vet. Rec. **92**, 191-194

SOOD, S., T. PETERS, L.R. WARD, and E.J. THRELFALL (2002):

Combination of pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and single-enzyme amplified fragment length polymorphism (SAFLP) for differentiation of multiresistant *Salmonella enterica* serotype typhimurium.

Clin. Microbiol. Infect. **8**, 154-161

SORENSEN, O., M. McFALL, S. RAWLUK, G. OLLIS, M. SCHOONDERWOERD,  
and K. MANNINEN (2001):

*Salmonella enterica* in Alberta slaughter hogs  
in: Proc. of the 4<sup>th</sup> International Symposium on the Epidemiology and Control  
of *Salmonella* and other Foodborne Pathogens in Pork, 02.09.-05.09.2001,  
Leipzig, S. 183-185

SPRATT, B.G. (2004):

Exploring the concept of clonality in bacteria.  
Methods Mol. Biol. **266**, 323-352

STANLEY, J., N. BAQUAR, and A. BURNENS (1995):

Molecular subtyping scheme for *Salmonella panama*.  
J. Clin. Microbiol. **33**, 1206-1211

STATISTISCHES BUNDESAMT

<http://www.statistik-bund.de>

<http://www.statistikportal.de>

<http://www.destatis.de>

STEGE, H. (1994):

Screening af slagtesvin for *Salmonella*.

zit. bei: Baggesen, D.L., H.C. Wegener, F. Bager, H. Stege and J. Christensen  
(1996):

Herd prevalence of *Salmonella enterica* infections in Danish slaughter pigs  
determined by microbiological testing. Prev. Vet. Med. **26**, 201-213

STEGE, H., J. CHRISTENSEN, J.P. NIELSEN, D.L. BAGGESEN, C. ENØE and P.  
WILLEBERG (2000a):

Prevalence of subclinical *Salmonella enterica* infection in Danish finishing pig  
herds.

Prev. Vet. Med. **44**, 175-188



STEGE, H., T.K. JENSEN, K. MØLLER, P. BÆKBO, and S.E. JORSAL (2000b):

Prevalence of intestinal pathogens in Danish finishing pig herds.

Prev. Vet. Med. **46**, 279-292

STEINBACH, G. und M. HARTUNG (1999):

Versuch einer Schätzung des Anteils menschlicher *Salmonella*erkrankungen, die auf vom Schwein stammende Salmonellen zurückzuführen sind

Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. **112**, 296-300

STEINBACH, G. und U. KROELL (1999):

*Salmonellainfektionen* in Schweinebeständen - Zu ihrer Epidemiologie und Bedeutung für Erkrankungen des Menschen.

Dtsch. Tierärztl. Wschr. **106**, 282-288

STRUELENS M.J. (1998):

Molecular epidemiologic typing systems of bacterial pathogens: current issues and perspectives.

Mem. Inst. Oswaldo Cruz **93**, 581-585

SWAMINATHAN, B., T.J. BARRETT, S.B. HUNTER, R.V. TAUXE, and the CDC PULSENET TASK FORCE (2001):

PulseNet: The molecular subtyping network for foodborne bacterial disease surveillance, United States.

Emerging Infectious Diseases **7**, 382-389

SWANENBURG, M., J.M.A. SNIJDERS, DD:A. KREUZENKAMP, A.D.J. TIMAN, and H.AA.P. URLINGS (2000):

*Salmonella* in the pork production chain: sources of *Salmonella* on pork.

Thesis. University of Utrecht, The Netherlands

zit. bei: Thorberg, B.M. und A. Engvall (2001): Incidence of *Salmonella* in five Swedish slaughterhouses.

J. Food Prot. **64**, 542-545

SWANENBURG, M., B.R. BERENDS, H.A.P. URLINGS, J.M.A. SNIJDERS, and F. VAN KNAPEN (2001):

Epidemiological investigations into the sources of *Salmonella* contamination of pork.

Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. **114**, 356-359

TERAJIMA, J., A. NAKAMURA, and H. WATANABE (1998):

Epidemiological analysis of *Salmonella* enterica Enteritidis isolates in Japan by phage-typing and pulsed-field gel electrophoresis.

Epidemiol. Infect. **120**, 223-229

THONG, K.L., Y.F. NGEOW, M. ALTWEGG, P. NAVARATNAM, and T. PANG (1995):

Molecular analysis of *Salmonella* enteritidis by pulsed-field gel electrophoresis and ribotyping.

J. Clin. Microbiol. **33**, 1070-1074

THONG, K.L., S.A. BAKERI, K.S. LAI, Y.T. KOH, M.Z. TAIB, V.K. LIM, and R.M. YASIN (2004):

Research note: Molecular subtyping of *Salmonella* enterica serovar Tshiongwe recently isolated in Malaysia during 2001-2002.

Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health. **35**, 92-96

THORBERG, B.M. and A. ENGVALL (2001):

Incidence of *Salmonella* in five Swedish slaughterhouses.

J. Food Prot. **64**, 542-545

THORNTON, L., S. GRAY, P. BINGHAM, R.L. SALMON, D.N. HUTCHINSON, B. ROWE, D. NEWTON, and Q.U. SYED (1993):

The problems of tracing a geographically widespread outbreak of salmonellosis from a commonly eaten food: *Salmonella* typhimurium DT193 in north west England and north Wales in 1991.

Epidemiol. Infect. **111**, 465-471

THRELFALL, E.J., and J.A. FROST (1990):

The identification, typing and fingerprinting of *Salmonella*: laboratory aspects and epidemiological applications.

J. Appl. Bacteriol. **68**, 5-16

TSEN, H.Y., J.S. LIN, and H.Y. HSIH (2002):

Pulsed field gel electrophoresis for animal *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolates in Taiwan.

Vet. Microbiol. **87**, 73-80

VALDEZATE S., A. ECHEITA, R. DÍEZ, and M.A. USERA (2000):

Evaluation of phenotypic and genotypic markers for characterisation of the emerging gastroenteritis pathogen *Salmonella hadar*.

Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. **19**, 275-281

VAN DEN ELZEN, A.M., and J.M. SNIJDERS (1993):

Critical points in meat production lines regarding the introduction of *Listeria monocytogenes*.

Vet. Q. **15**, 143-145

VAN DER PALEN, C.J.N.M., I. EELDERINK-DE GRIP, A.E. EGGENKAMP, B.R. BERENDS, S.A. BURT, and J.M.A. SNIJDERS (1992):

Een oriënterend onderzoek naar het voorkomen van *Campylobacter jejuni* en *coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. en *Yersinia enterocolitica* in het schone gedeelte van de varkensslachtlijn.

zit. in: Berends, B.R., F. van Knapen, J.M.A. Snijders und D.A.A. Mossel (1997): Identification and quantification of risk factors regarding *Salmonella* spp. on pork carcasses.

Int. J. Food Microbiol. **36**, 199-206

VAN DER WOLF, P.J., J.H. BONGERS, A.R. ELBERS, F.M. FRANSSEN, W.A. HUNNEMAN, A.C. VAN EXSEL, and M.J. TIELEN (1999):

*Salmonella* infections in finishing pigs in The Netherlands: bacteriological herd prevalence, serogroup and antibiotic resistance of isolates and risk factors for infection.

Vet. Microbiol. **67**, 263-275

VAN DUIJKEREN, E., W.J.B. WANNET, D.J. HOUWERS, and W. VAN PELT (2002):

Serotype and phage type distribution of *Salmonella* strains isolated from humans, cattle, pigs, and chickens in the Netherlands from 1984 to 2001.

J. Clin. Microbiol. **40**, 3980-3985

VAN NETTEN P., J. LEENAERTS, G.M. HEIKANT, and D.A. MOSSEL (1986):

A small outbreak of salmonellosis caused by Bologna sausage.

Tijdschr. Diergeneeskd. **111**, 1271-1275

VON ALTROCK, A. (2001):

Results of the German investigation in the EU-Project *Salmonella* in Pork (Salinpork): Investigations on farms

in: Proc. of the 4<sup>th</sup> International Symposium on the Epidemiology and Control of *Salmonella* and other Foodborne Pathogens in Pork, 02.09.-05.09.2001, Leipzig, S. 198-201

VON ALTROCK, A., A. SCHÜTTE und G. HILDEBRANDT (1999):

Untersuchungsergebnisse aus Deutschland zu dem EU-Projekt "*Salmonella* in Pork (Salinpork)" - 2. Mitteilung: Untersuchungen am Schlachthof.

Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. **112**, 225-233

VON ALTROCK, A., A. SCHÜTTE und G. HILDEBRANDT (2000):

Untersuchungsergebnisse aus Deutschland zu dem EU-Projekt "*Salmonella* in Pork (Salinpork)" - 1. Mitteilung: Untersuchungen in den Beständen

Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. **113**, 191-201

---

WALKER, R.A., E. LINDSAY, M.J. WOODWARD, L.R. WARD, and E.J. THRELFALL (2001):

Variation in clonality and antibiotic-resistance genes among multiresistant *Salmonella enterica* serotype typhimurium phage-type U302 (MR U302) from humans, animals and foods.  
Microb. Drug Resist. **7**, 13-21

WARD, L.R., J.D. DE SA, and B. ROWE (1987):

A phage-typing scheme for *Salmonella enteritidis*.  
Epidemiol. Infect. **99**, 291-294

WASSENAAR, T.M. (2003):

Molecular typing of pathogens.  
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. **116**, 447-453

WEGENER, H.C., and D.L. BAGGESEN (1996):

Investigation of an outbreak of human salmonellosis caused by *Salmonella enterica* ssp. *enterica* serovar infantis by use of pulsed field gelelectrophoresis.  
Int. J. Food Microbiol. **32**, 125-131

WEIGEL, R.M., D.A. BARBER, R.E. ISAACSON, P.B. BAHNSON, and C.J. JONES (1999):

Reservoirs of *Salmonella* infection on swine farms in Illionois  
in: Proc. of the 3<sup>rd</sup> International Symposium on the Epidemiology and Control of *Salmonella* in Pork, 05.08.-07.08.1999, Washington D.C., S. 180-183

WHITE, D.G., S. ZHAO, R. SUDLER, S. AYERS, S. FRIEDMAN, S. CHEN, P.F. MCDERMOTT, S. MCDERMOTT, D.D. WAGNER, and J. MENG (2001):

The isolation of antibiotic-resistant salmonella from retail ground meats.  
N. Engl. J. Med. **345**, 1147-54

WICHELHAUS T. A., V. SCHAEFER und V. BRADE (2000):

Typisierungsverfahren in der Infektionsepidemiologie

Chemotherapie J. **9**, 93-98

WIELER, L.H. und R. BAUERFEIND (1999):

*Salmonella*-Infektion beim Tier und deren Bedeutung für die Human- und

Tiergesundheit

<http://www.animal-health-online.de/print/Salmonella.htm>

WINTER, P., F. SCHILCHER, Z. BAGO, D. SCHODER, M. EGERBACHER, W.

BAUMGARTNER, and M. WAGNER (2004):

Clinical and histopathological aspects of naturally occurring mastitis caused by  
*Listeria monocytogenes* in cattle and ewes.

J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health. **51**, 176-179

WOOD, R.L., A. POSPISCHIL, and R. ROSE (1989):

Distribution of persistent *Salmonella typhimurium* infection in internal organs of  
swine.

Am. J. Vet. Res. **50**, 1015-1021

WOOD, R.L., R. ROSE, N.E. COE, and K.E. FERRIS (1991):

Experimental establishment of persistent infection in swine with a zoonotic  
strain of *Salmonella newport*.

Am. J. Vet. Res. **52**, 813-819

WOLTERSDORF, W. und H.-J. MINTZLAFF (1996):

Verbesserung der Handhabungs-Hygiene von Rücken-Spaltsägen.

Fleischwirtsch. **76**, 482-485

WOODWARD, D.L., R. KHAKHRIA, and W.M. JOHNSON (1997):

Human salmonellosis associated with exotic pets.

J. Clin. Microbiol. **35**, 2786-2790

WONDERLING, L., R. PEARCE, F. M. WALLACE, J.E. CALL, I. FEDER, M. TAMPLIN, and J.B. LUCHANSKY (2003):

Use of pulsed-field gel electrophoresis to characterize the heterogeneity and clonality of *Salmonella* isolates obtained from the carcasses and feces of swine at slaughter.

Appl. Environ. Microbiol. **69**, 4177-4182

## **GESETZE, VERORDNUNGEN, RICHTLINIEN**

### **AMTLICHE SAMMLUNG VON UNTERSUCHUNGSVERFAHREN NACH §35 LMBG**

Untersuchung von Lebensmitteln – Vorbereitung der Proben (L06 00 – 16)

Untersuchung von Lebensmitteln – Bestimmung der aeroben Gesamtkeimzahl bei 30°C in Fleisch- und Fleischerzeugnissen (L06 00-18)

Untersuchung von Lebensmitteln – Nachweis von Salmonellen (L06 00 - 20)

### **FLEISCHHYGIENEVERORDNUNG (FIHV)**

Verordnung über die hygienischen Anforderungen und amtlichen

Untersuchungen beim Verkehr mit Fleisch

in der Fassung vom 02.04.2003

BGBI. I, S. 478

### **INFEKTIONSSCHUTZGESETZ (IfSG) –**

Gesetz zur Verhütung und Bekämpfung von Infektionskrankheiten beim

Menschen, Artikel 1 des Gesetzes zur Neuordnung seuchenrechtlicher

Vorschriften (Seuchenrechtsneuordnungsgesetz – SeuchRNeuG)

vom 20. Juli 2000, BGBI. I S. 1045

### **LEBENSMITTEL- UND BEDARFSGEGENSTÄNDEGESETZ (LMBG) –**

Gesetz über den Verkehr mit Lebensmitteln, Tabakerzeugnissen,

kosmetischen Mitteln und sonstigen Bedarfsgegenständen In der Fassung

vom 9. September 1997

BGBI. I S. 2296, 2391; 1998 S. 379; 2000 S. 1045; 2001 S. 2702; S. 2785 Art.

32

Entscheidung der Kommission (2001/471/EG) über Vorschriften zur regelmäßigen Überwachung der allgemeinen Hygienebedingungen durch betriebseigene Kontrollen gemäß Richtlinie 64/433/EWG.

Amtsbl. der EG, L165/48-53 vom 21.6.2001

In der Neufassung vom 26.4.2004, Amtsbl. der EU vom 30.4.2004, L144/1-4

Richtlinie 89/397/EWG über die amtliche Lebensmittelüberwachung vom 14. Juni 1989

Amtsbl. Nr. L 186 vom 30.06.1989 S. 0023 - 0026

Richtlinie 92 / 117 / EWG des Rates vom 17.12.1992 über Maßnahmen zum Schutz gegen bestimmte Zoonosen bzw. ihre Erreger bei Tieren und Erzeugnissen tierischen Ursprungs zur Verhütung lebensmittelbedingter Infektionen und Vergiftungen

Amtsbl. d. EG, Nr. L62 / 38 vom 13.03.1993

Richtlinie 2003/99/EG des Europäischen Parlaments und des Rates

Richtlinie 2002/99/EG des Rates vom 16. Dezember 2002 zur Festlegung von tierseuchenrechtlichen Vorschriften für das Herstellen, die Verarbeitung, den Vertrieb und die Einfuhr von Lebensmitteln tierischen Ursprungs

Amtsbl. Nr. L 18 vom 23.01.2003 S. 11



## **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. R. Fries danke ich nicht nur herzlich für die Überlassung des Themas und die fachliche Anleitung. Seine Betreuung trotz aller widrigen Umstände beim Start der Arbeit war stets besonders und verdient ebenso besonderen Dank.

Herrn Prof. Dr. J. Krämer danke ich für seine Bereitschaft, als Referent an der Landwirtschaftlichen Fakultät die Arbeit zu begutachten. Ebenso danke ich Herrn Prof. Dr. B. Kunz.

Ich danke den Mitarbeitern des Instituts für Anatomie, Physiologie und Hygiene der Haustiere der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, für die mit diesem Projekt ein Abschnitt zu Ende ging.

Den Mitarbeitern des Instituts für Fleischhygiene und -technologie der Freien Universität Berlin sei herzlich gedankt für die Bearbeitung der Isolate. Insbesondere danke ich Frau Lilo Bräutigam für ihren unermüdlichen Einsatz bei der PFGE und für all ihre wertvollen Hinweise.

Ich danke meiner Familie, in der mich jeder auf seine Art dem Ziel immer wieder ein Stückchen näher gebracht hat.

Für Seite 95 sei Dir, Mirela, ganz besonders gedankt. Anke, ich danke Dir für Deine einzigartige Darstellung der zu überwindenden Hürden. Danke, Niels, für Dein stets offenes Ohr.

Danke Dir, Enno, dass Du mich so unermüdlich begleitet und bestärkt hast. Deine unablässige Unterstützung war mir stets Rückhalt und die größte Hilfe.



## **Selbständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig ohne die unzulässige Hilfe Dritter und nur unter Nutzung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe.

Katja Dünnebier

Berlin, im Dezember 2005