

**Nachweis und molekulare Charakterisierung pathogener
und antibiotikaresistenter Bakterien isoliert aus legal und
illegal in die Europäische Union importierten Lebensmitteln
tierischer Herkunft**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Nicola Susan Rinn

Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde am FB Veterinärmedizin

Betreuerin: Prof. Dr. Corinna Kehrenberg, PhD

**Nachweis und molekulare Charakterisierung pathogener
und antibiotikaresistenter Bakterien isoliert aus legal und
illegal in die Europäische Union importierten Lebensmitteln
tierischer Herkunft**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Nicola Susan Rinn

Tierärztin aus Gießen

Gießen 2025

Dekan: Prof. Dr. Dr. Stefan Arnhold

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

1. Gutachterin: Prof. Dr. C. Kehrenberg

2. Gutachter: Prof. Dr. Walter Grünberg

Prüfer: Prof. Dr. Tobias Eisenberg

Tag der Disputation: Gießen, den 12.05.2026

Für meine Familie

„You can't move mountains by whispering at them.“

Alecia Beth Moore (P!nk)

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Nicola Susan Rinn

Publikationsverzeichnis

Diese Dissertation basiert in wesentlichen Teilen auf den zwei folgenden Publikationen:

Nicola Rinn, Ann-Sophie Braun, Anja Müller, Katharina Wadepohl, Bettina Gerulat, Franziska Kumm, Min Yue, Corinna Kehrenberg (2024):

Microbiological quality of raw beef imported into the European Union from third countries

Food Control 160. (2024): 110358. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2024.110358>

Nicola Rinn, Anja Müller, Ann-Sophie Braun, Gabriel Greif, Dagmar Stiefel, Corinna Kehrenberg (2025):

Food products confiscated from air passengers travelling from third countries into the European Union: Microbiological analyses and genomic characterization of zoonotic and multiresistant bacteria

Food Microbiology 131 (2025): 104783. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2025.104783>

Des Weiteren wurden Teile der Dissertation in folgenden Vorträgen präsentiert:

Vorträge

Rinn N, Braun AS, Wadepohl K, Müller A, Gerulat B, Kehrenberg C (2022)

Mikrobiologische Untersuchungen von aus Drittländern legal in die Europäische Union (EU) importiertem Rindfleisch.

62. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz der DVG, 25.10.-28.10.2022, Garmisch-Partenkirchen (Vortrag)

Rinn N, Braun AS, Wadepohl K, Müller A, Gerulat B, Kehrenberg C (2022)

Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen von aus Drittländern legal in die Europäische Union (EU) importiertem Rindfleisch.

Projektpräsentation am 14.10.2022 am Veterinär- und Einfuhramt Hamburg, Steinwerder (Vortrag)

Rinn N, Müller A, Braun AS, Greif G, Stiefel D, Kehrenberg C (2023)

Mikrobiologische Untersuchungen von illegal importierten Lebensmitteln tierischer Herkunft konfisziert von aus Drittländern in die Europäische Union (EU) einreisenden Flugpassagieren.

63. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz der DVG, 26.09.-29.09.2023, Garmisch-Partenkirchen (Vortrag)

Inhaltsverzeichnis

Publikationsverzeichnis	I
Inhaltsverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis	VI
1. Einleitung	1
2. Literaturübersicht	4
2.1 Import von Lebensmitteln tierischer Herkunft in die EU	4
2.1.1 Rechtliche Grundlagen für legal importierte Lebensmittel tierischer Herkunft	4
2.1.2 Bedeutung von Lebensmittelimporten tierischer Herkunft für die EU	5
2.1.3 Illegal importierte Lebensmittel tierischer Herkunft.....	6
2.2 Importierte Lebensmittel tierischen Ursprungs als Eintragsquellen für lebensmittelassoziierte bakterielle Pathogene	8
2.2.1 Legal importierte Lebensmittel tierischen Ursprungs als Eintragsquellen für lebensmittelassoziierte bakterielle Pathogene	8
2.2.2 Illegal importierte Lebensmittel tierischen Ursprungs als Eintragsquellen für lebensmittelassoziierte bakterielle Pathogene	9
2.3 Mikrobiologische Anforderungen an Lebensmittel tierischer Herkunft in der EU und in Deutschland	10
2.3.1 Mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel nach der Verordnung (EG) Nr. 2073/2005	10
2.3.2 Mikrobiologische Richt- und Warnwerte der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM)	11
2.4 Häufig nachgewiesene Lebensmittelinfektionserreger und ihre Bedeutung für die Lebensmittelsicherheit	12
2.4.1 Bedeutung von <i>E. coli</i> als Lebensmittelinfektionserreger und Relevanz bestimmter klonaler Linien von <i>E. coli</i> und STEC	12
2.4.2 <i>Salmonella enterica</i> als Lebensmittelinfektionserreger und bedeutende Serovare	15
2.4.3 <i>Listeria monocytogenes</i> als Lebensmittelinfektionserreger und bedeutende Serovare und klonale Linien	19
2.4.3 <i>Staphylococcus aureus</i> als Infektions- und Lebensmittelintoxikationserreger und Bedeutung bestimmter klonaler Linien von <i>S. aureus</i> einschließlich Methicillin-resistente <i>Staphylococcus aureus</i>	22
2.5 Einfluss von Lebensmittelimporten in die EU auf eine mögliche Verbreitung genotypischer Varianten von lebensmittelassoziierten Pathogenen	26
2.6 Nachweis von antibiotikaresistenten Bakterien von Lebensmitteln tierischer Herkunft ..	29
2.6.1 Monitoring von antibiotikaresistenten Bakterien in Lebensmitteln tierischer Herkunft innerhalb der EU	29

2.6.2 Antibiotikaresistenzen in legal und illegal importierten Lebensmitteln tierischer Herkunft ..	31
3. Zielstellung der Arbeit.....	33
4. Publikationen	34
4.1 Publikation 1	34
4.2 Publikation 2	61
5. Zusammenfassung der Ergebnisse und übergreifende Diskussion.....	104
5.1 Herkunft der untersuchten legal und illegal importierten Lebensmittel tierischer Herkunft	104
5.1.1 Herkunft der legal importierten Rindfleischproben	104
5.1.2 Herkunft und Probenspektrum der illegal importierten Lebensmittel tierischer Herkunft ..	105
5.2 Mikrobiologische Beschaffenheit legal und illegal importierter Lebensmittel tierischer Herkunft in die EU	106
5.2.1 Mikrobiologische Qualität von legal in die EU importiertem Rindfleisch anhand von Hygieneparametern	106
5.2.2 Nachweis von lebensmittelassoziierten Pathogenen in legal in die EU importiertem Rindfleisch	111
5.2.3 Mikrobiologische Qualität illegal importierter Lebensmittel tierischer Herkunft anhand von Hygieneparametern	115
5.2.4 Nachweis von lebensmittelassoziierten Pathogenen in illegal importierten Lebensmitteln tierischer Herkunft.....	118
5.3. Molekulare Charakteristika der aus legalen und illegal importierten Lebensmittel tierischer Herkunft gewonnenen Isolate.....	125
5.3.1 Shigatoxin-produzierende <i>Escherichia coli</i> (STEC).....	126
5.3.2 <i>Staphylococcus aureus</i> einschließlich MRSA	132
5.3.3 <i>Listeria monocytogenes</i>	141
5.3.4 <i>Salmonella enterica</i>	148
5.4 Antibiotikaresistenzen und Nachweis von Resistenzgenen in legal und illegal importierten Lebensmitteln tierischer Herkunft.....	151
5.4.1 Antibiotikaresistenzen von isolierten <i>Staphylococcus aureus</i> einschließlich MRSA.....	151
5.4.2 Nachweis von ESBL-produzierenden <i>Enterobacterales</i> sowie deren Genotypen	153
5.4.3 Weitere Antibiotikaresistenzen von ESBL-produzierenden <i>Enterobacterales</i> , kommensalen <i>E. coli</i> und STEC.....	155
5.5 Schlussfolgerung	160
6. Zusammenfassung	161
7. Summary	165
8. Literaturverzeichnis.....	169

Inhaltsverzeichnis

8.1 EU-Verordnungen.....	207
9. Anhang	209
Danksagung.....	220

Abkürzungsverzeichnis

CC	Klonaler Komplex (engl.: clonal complex)
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
DGHM	Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie
DIN	Deutsches Institut für Normung
DNA	Dexoxyribonucleic acid
EHEC	Enterohämorrhagische <i>Escherichia coli</i>
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control
EFSA	European Food Safety Authority
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
ESBL	Extended-spectrum β -lactamase
EU	Europäische Union
HACCP	Gefahrenanalyse und kritische Kontrollpunkte (engl.: Hazard Analysis and Critical Control Points)
IEC	engl.: immune evasion cluster
ISO	Internationale Organisation für Normung (International Organization for Standardization)
$\mu\text{g/g}$	Mikrogramm pro Gramm
KbE	Koloniebildene Einheit(en)
Log_{10}	Dekadischer Logarithmus/Zehnerlogarithmus
MLST	Multilocus-Sequenztypisierung (engl.: multilocus sequence typing)
MRSA	Methicillin-resistente <i>Staphylococcus aureus</i>
MSSA	Methicillin-sensible <i>Staphylococcus aureus</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl.: polymerase chain reaction)
PFGE	Pulsfeld-Gelelektrophorese
SE	Staphylokokken-Enterotoxine
ST	Sequenztyp
STEC	Shigatoxin-produzierender <i>Escherichia coli</i>
VO	Verordnung

1. Einleitung

Lebensmittel tierischer Herkunft werden jährlich in großen Mengen aus Drittländern, also Ländern, die nicht dem Europäischen Wirtschaftsraum angehören, in die Europäische Union (EU) importiert. Die EU hat sich seit ihrer Gründung 1993 zum größten gemeinsamen Binnenmarkt der Welt entwickelt und ist nach China und den USA der drittgrößte Importeur von Lebensmitteln (BMWK 2023; EC 2021a). Allein rund 400.000 Tonnen Rindfleisch werden jährlich in die EU importiert (EC 2021; EC 2023). Grundsätzlich müssen importierte Lebensmittel tierischen Ursprungs die gleichen gesetzlichen Anforderungen in Bezug auf die Lebensmittelhygiene und Lebensmittelsicherheit erfüllen wie innergemeinschaftlich erzeugte Produkte. Importierte Lebensmittel tierischen Ursprungs werden dafür an den Einfuhrstellen der EU-Außengrenzen kontrolliert, wobei nach EU-Recht lediglich eine Einfuhr aus zertifizierten Exportbetrieben zugelassen ist. Neben der Überprüfung der Begleitpapiere aller Warensendungen sind Produktuntersuchungen nur in einem bestimmten Stichprobenumfang vorgesehen. Weitergehende mikrobiologische Untersuchungen erfolgen lediglich risikoorientiert sowie im Rahmen festgelegter Kontrollpläne, so dass eine Kontamination der eingeführten Lebensmittel mit bakteriellen Zoonoseerregern potenziell unentdeckt bleiben kann. Darüber hinaus werden trotz Einfuhrverbot Lebensmittel tierischen Ursprungs illegal über den internationalen Reiseverkehr in die EU eingeführt. Ein Großteil dieser illegal eingeführten Lebensmittel wird ungekühlt und nicht adäquat verpackt transportiert (Schoder et al. 2015). Zudem entsprechen die Produktionsbedingungen dieser Lebensmittel häufig nicht den EU-Anforderungen, so dass die Einfuhr in Hinblick auf die Einhaltung der Lebensmittelhygiene als problematisch anzusehen ist (Spies 2008; Falk et al. 2013).

Zu den als kritisch für den Verbraucherschutz und für die öffentliche Gesundheit angesehenen und besonders wichtigen lebensmittelassozierten Krankheitserregern gehören laut der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit (engl.: European Food Safety Authority; EFSA): *Salmonella* spp., *Listeria (L.) monocytogenes*, Shigatoxin-produzierende *Escherichia (E.) coli* (STEC) und *Staphylococcus (S.) aureus* (EFSA 2022a). In der EU sind nach *Campylobacter* spp. mit über 148.000 (2022) gemeldeten Fällen, *Salmonella* spp. die am zweithäufigsten gemeldeten bakteriellen Erreger lebensmittelbedingter Krankheitsausbrüche mit mehr als 65.000 gemeldeten Fällen pro Jahr (EFSA 2022a; EFSA 2023). Die Erkrankung der humanen

Listeriose mit fast 3000 (2952 im Jahr 2022) gemeldeten Fällen tritt in der EU zwar seltener auf, hat jedoch die höchste Hospitalisierungs- und Sterberate und stellt insbesondere für ältere, schwangere oder immunsupprimierte Menschen ein hohes Risiko dar (EFSA 2022a; EFSA 2023). Des Weiteren gelten Infektionen mit STEC als klassische lebensmittelbedingte Erkrankungen und können beim Menschen zu akuten Magen-Darm-Erkrankungen, zu schweren Nierenerkrankungen bis hin zum Tod führen (Gyles 2007; FAO und WHO 2018). Analysen der EFSA und der Weltgesundheitsorganisation (WHO) zeigen, dass Rindfleisch und Rindfleischprodukte in den letzten Jahren einer der Hauptübertragungswege für STEC-Infektionen des Menschen waren (FAO UND WHO 2018; KOUTSOUMANIS et al. 2020). Legal importierte Lebensmittel tierischer Herkunft, bei denen Kontaminationen mit pathogenen bakteriellen Mikroorganismen festgestellt werden, werden über das europäische Schnellwarnsystem für Lebens- und Futtermittel (engl.: Rapid Alert System for Food and Feed; RASFF) erfasst und an den EU-Außengrenzen zurückgewiesen. Insbesondere Meldungen über den Nachweis von STEC in rohem Rindfleisch haben immer wieder zu Zurückweisungen an den EU-Außengrenzen geführt (Kononiuk et. al. 2017; Jansen et al. 2016).

Für die öffentliche Gesundheit sind zudem antibiotikaresistente Bakterien von großer Bedeutung. Infektionen mit antibiotikaresistenten Bakterien stehen in Verbindung mit gesteigerten Mortalitätsraten aufgrund begrenzter Therapieoptionen, längeren Hospitalisierungen und dementsprechend höheren Kosten für das Gesundheitssystem (Esteve-Paul et. al, 2015). Da lebensmittelliefernde Tiere als Vektoren für resistente Bakterien dienen können, stellen Lebensmittel tierischen Ursprungs bzw. der Kontakt mit kontaminierten Milch- und Fleischprodukten eine nicht zu unterschätzende Infektionsquelle für den Menschen dar (Larsen et al. 2016; Crago et al. 2012; Sergelidis und Angelidis 2017; EFSA und ECDC 2023; EFSA 2022b). In diesem Kontext sind ESBL/AmpC-produzierende Enterobacterales, die gegen häufig eingesetzte Beta-Laktam Antibiotika resistent sind, sowie Methicillin-resistente *S. aureus* (MRSA), die vorrangig als nosokomiale Erreger bekannt sind, aufgrund begrenzter Therapieoptionen ein Risiko für das öffentliche Gesundheitssystem (Bassetti et al. 2019; Esteve-Palau et al. 2015).

Studien konnten bereits zeigen, dass importierte Lebensmittel mit zoonotischen, multiresistenten bakteriellen Pathogenen mit teils ungewöhnlichen Resistenzmustern und für in der EU nicht gewöhnlich vorkommenden Genotypen kontaminiert sein

können (Rodríguez-Lázaro et al. 2015; Müller et al. 2016; Müller et al. 2018b; Nagy et al. 2015; Jansen et al. 2018). Dies ist insbesondere im Hinblick auf die Verbreitung ungewöhnlicher oder neu beschriebener Genotypen und Resistenzgene im Zuge des stetig zunehmenden globalen Handels und internationalen Flugverkehrs relevant (Müller et al. 2016; Müller et al. 2018b; Rodríguez-Lázaro et al. 2015; Jansen et al. 2019).

In dieser Arbeit wurde die mikrobiologische Qualität von legal über die Grenzkontrollstelle des Hamburger Hafens aus Drittländern eingeführtem Rindfleisch analysiert. Außerdem wurden illegal importierte Lebensmittel tierischen Ursprungs, die bei den Sicherheitskontrollen von aus Drittländern einreisenden Passagieren am Flughafen Frankfurt am Main konfisziert wurden, untersucht. Ein Fokus der Studie lag auf der Isolierung von pathogenen Keimen und Hygieneparametern sowie auf der molekularen Charakterisierung der bakteriellen Isolate. Dies diente zur Klärung der Fragestellung, inwiefern importierte Lebensmittel zur Verbreitung ungewöhnlicher oder unbekannter bzw. besonders virulenter und/oder resistenter Bakterien beitragen können. Ziel dieser Arbeit war es somit, zur Klärung der Einschätzung des von illegal und legal importierten Lebensmitteln tierischer Herkunft ausgehenden mikrobiologischen Risikos beizutragen.

2. Literaturübersicht

2.1 Import von Lebensmitteln tierischer Herkunft in die EU

2.1.1 Rechtliche Grundlagen für legal importierte Lebensmittel tierischer Herkunft

Lebensmittel, die aus Drittstaaten in die EU importiert werden, müssen grundsätzlich die gleichen hohen innergemeinschaftlichen Standards in Bezug auf die Lebensmittelsicherheit und Lebensmittelhygiene erfüllen wie in der EU hergestellte Produkte. Die Verordnung (VO) (EG) Nr. 178/2002 des Europäischen Parlaments und des Europäischen Rates legt dafür als „Basisverordnung“ die allgemeinen Grundsätze des Lebensmittelrechts zur Gewährleistung der Lebensmittelsicherheit fest. Für Lebensmittel tierischen Ursprungs sind die einzuhaltenden Hygienevorschriften sowie deren Überwachung in der Lebensmittelhygiene-Verordnung (EG) Nr. 852/2004 bzw. der Verordnung (EG) Nr. 853/2004 mit spezifischen Hygienevorschriften für Lebensmittel tierischen Ursprungs präzisiert. Darüber hinaus gelten die in der Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 festgelegten mikrobiologischen Kriterien auch für Lebensmittel, die außerhalb des Binnenmarktes erzeugt werden, worauf in Kapitel 2.3.1 näher eingegangen wird. Mit dem Ziel die Rechtsvorschriften innerhalb der EU zu bündeln, sind in der Basiskontroll-VO (EU) Nr. 2017/625 bzw. der Durchführungs-VO (D-VO) 2019/627, welche die ehemaligen VO (EG) Nr. 854/2004 und VO (EG) Nr. 882/2004 abgelöst haben, die für alle EU-Mitgliedstaaten verbindlichen Rahmenvorschriften für die amtlichen Lebensmittelkontrollen importierter Lebensmittel zusammengefasst. Diese legen fest, dass Lebensmittelimporte tierischen Ursprungs an den EU-Außengrenzen an den dafür vorgesehenen Grenzkontrollstellen von amtlichen Tierärzten kontrolliert werden, was in der VO (EU) Nr. 2019/2130 konkretisiert ist. Die Referenzkriterien für die Häufigkeitsraten der amtlichen Kontrollen für sämtliche Importe tierischer Erzeugnisse, die gemäß VO (EU) Nr. 2017/625 in den Verkehr gebracht werden, sind in der D-VO (EU) Nr. 2019/2129 im Anhang I definiert. Grundsätzlich ist dabei die Einfuhr von Lebensmitteln tierischen Ursprungs nur aus Drittländern oder Regionen zulässig, sofern diese in einer Positivliste nach der D-VO (EU) Nr. 2021/405 gemäß der VO (EU) Nr. 2017/625 aufgeführt sind. Da Lebensmittel tierischen Ursprungs neben den lebensmittelrechtlichen Anforderungen auch den tierseuchenrechtlichen Anforderungen der EU entsprechen müssen, wird bei allen Einfuhren an den Zollstellen eine Nämlichkeitskontrolle auf Übereinstimmung des Inhalts und der Kennzeichnung mit den Angaben des die Sendung begleitenden Gemeinsamen Gesundheitseingangsdokumentes durchgeführt (GGED-P; Codierung

„P“ für Lebensmittel tierischen Ursprungs). Warenuntersuchungen hingegen müssen lediglich entsprechend der Einstufung bestimmter Lebensmittel in Risikokategorien (I-V) in einem festgelegten prozentualen Umfang durchgeführt werden. Für die Warenuntersuchung von aus Drittstaaten importiertem Rindfleisch (Risikokategorie III), welches auch im Rahmen dieser Dissertation mikrobiologisch untersucht wurde (Publikation 1), ist eine Kontrollhäufigkeit von mindestens 15% vorgesehen. Die Untersuchung umfasst eine sensorische Produktuntersuchung sowie eine pH-Messung. Weiterführende Laboruntersuchungen erfolgen lediglich risikoorientiert sowie im Rahmen des mehrjährigen nationalen Kontrollplans der Bundesrepublik auf Basis der VO (EU) Nr. 2017/625. Gesundheitsbedenkliche Beanstandungen importierter Lebensmittel, die im Rahmen der amtlichen Kontrollen festgestellt werden, sind von den zuständigen Behörden an das europäische Schnellwarnsystem für Lebens- und Futtermittel (engl.: RASFF; Rapid Alert System for Food and Feed) weiterzuleiten. Etwaige Meldungen werden seitens der EU-Kommission validiert und den RASFF-Mitgliedern weitergeleitet. Mitglieder sind die Europäische Kommission selbst, die EU-Mitgliedsstaaten, die Staaten der Europäischen Freihandelsassoziation (EFTA-Staaten) Schweiz, Norwegen, Liechtenstein, Island, inklusive der EFTA-Überwachungsbehörde (engl.: EFTA-Surveillance Authority, ESA) sowie die Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (engl.: European Food Safety Authority, EFSA). Entsprechen Warensendungen nicht den innergemeinschaftlichen Rechtsvorschriften, wird die Einfuhr nicht genehmigt und entweder die Rücksendung in das jeweilige Herkunftsland oder die unschädliche Beseitigung angeordnet.

2.1.2 Bedeutung von Lebensmittelimporten tierischer Herkunft für die EU

Neben der EU-Eigenproduktion von tierischen Erzeugnissen ermöglicht der Import von Lebensmitteln eine Erhöhung der Lebensmittelvielfalt sowie einen Ausgleich zwischen Ländern mit unterschiedlichem Lebensmittelangebot (EC 2023e; Chatellier 2021). Zudem dient der Import zur Deckung der hohen Nachfrage der EU-Bevölkerung nach qualitativ hochwertigen Produkten und ist von großer ökonomischer Relevanz (EC 2023e; Chatellier 2021). In den vergangenen Jahren ist der Importwert tierischer Erzeugnisse der 27 EU-Mitgliedstaaten (exklusive Großbritannien) um 17,81% von 12,9 Mrd. Euro (2018) auf 15,2 Mrd. Euro (2022) gestiegen (EC 2023e). Dabei entspricht der Importwert tierischer Erzeugnisse einem prozentualen Anteil von 8,9%

des gesamten EU-Importwertes landwirtschaftlicher Erzeugnisse von insgesamt 171.766 Millionen Euro (2022) (EC 2023e).

Insbesondere Geflügelfleisch wird in großen Mengen jährlich in die EU importiert, sodass mit rund 800.000 Tonnen pro Jahr insgesamt ca. 23% der gesamten EU-Importe tierischer Erzeugnisse auf Geflügelfleisch fallen (Chatellier 2021). Auf Rindfleischimporte, die im Rahmen dieser Dissertation (Publikation 1) eingehend untersucht wurden, gehen insgesamt rund 21% der EU-Gesamteinfuhren tierischer Erzeugnisse zurück (Chatellier 2021). Trotz eines EU-internen Selbstversorgungsgrades mit Rindfleisch von über 100% (104% im Jahr 2018 und 108% im Jahr 2020), werden jährlich rund 400.000 Tonnen Rindfleisch in die EU importiert (BLE 2019; BLE 2022). Als Hauptexportländer gelten Großbritannien (28.3%), Brasilien (26.4%), Argentinien (16.9%) und Uruguay (13.8%) (2022) (EC 2023d). Rund 14% der gesamten Rindfleischimporte in die EU werden nach Deutschland importiert, wobei es sich bei nahezu der Hälfte (47,9%) um aus Argentinien stammendes Rindfleisch handelt (2020) (EC 2021). Der Import von Schweinefleisch aus Drittstaaten spielt in der EU als Hauptexportland von Schweinefleisch und Schweinefleischprodukten eine untergeordnete Rolle mit einer EU-internen Marksättigung von 131% (2021) (BLE 2022).

Faktoren, welche sich positiv auf EU-Lebensmittelimporte auswirken, sind die stetige demographische Stabilisierung der EU, verbesserte Agrarmarktzugänge für Drittstaaten, eine teils rückläufige Entwicklung in der Eigenproduktion tierischer Erzeugnisse in einigen EU-Mitgliedstaaten sowie die steigenden Qualitäts- und Sicherheitsstandards importierter Erzeugnisse (Chatellier 2021). Zudem unterliegt ein großer Teil der europäischen Einfuhren von tierischen Erzeugnissen zollfreien bzw. zollermäßigten Einfuhrkontingenten im Rahmen des Abkommens der Welthandelsorganisation, die eine erleichterte Einfuhr begünstigen.

2.1.3 Illegal importierte Lebensmittel tierischer Herkunft

Neben den legalen Lebensmittelimporten werden jährlich Lebensmittel tierischen Ursprungs illegal von Privatpersonen in die EU eingeführt. Grundsätzlich ist die illegale Einfuhr tierischer Erzeugnisse von aus Drittländern einreisenden Fahrgästen oder Flugpassagieren gemäß der VO (EU) Nr. 2019/2122 verboten. Ausgenommen davon sind bestimmte Waren wie Säuglingsnahrung, Fischereierzeugnisse sowie andere als die in Anhang I Teil 2 der VO (EU) Nr. 2019/2122 genannten Produkte (z.B. Honig) unter Einhaltung bestimmter Höchstmengen. Verstöße gegen diese gesetzlichen

Bestimmungen, die im Rahmen der amtlichen Einfuhrkontrollen an den EU-Grenzkontrollstellen festgestellt werden, führen zu einer Beschlagnahme und amtlichen Vernichtung der Erzeugnisse. Dabei gelten diese Beschränkungen nicht für die Einfuhr tierischer Erzeugnisse aus Andorra, Island, Liechtenstein, Nordirland, Norwegen, San Marino und der Schweiz. Zudem sind für Grönland und die Färöer Inseln besondere Einfuhrbestimmungen für Lebensmittel tierischen Ursprungs festgelegt.

Insgesamt handelt es sich bei den illegalen Einfuhren von tierischen Erzeugnissen für den privaten Verbrauch überwiegend um geringe Mengen, die jedoch angesichts der hohen Zahl von international reisenden Privatpersonen nicht zu unterschätzen sind. Obwohl laut der Internationalen Zivilluftfahrtorganisation (engl.: International Civil Aviation Organization, ICAO) die Anzahl der privat reisenden Flugpassagiere weltweit aufgrund der Covid-19-Pandemie von 4,5 Milliarden im Jahr 2019 auf 2,3 Milliarden im Jahr 2021 gesunken ist, wird für die kommenden Jahre ein erneuter Anstieg erwartet, so dass die Menge der illegal eingeführten Lebensmittel gleichzeitig steigen könnte (ICAO 2021). Schätzungen einer Studie zu Folge passieren 10 bis 50% der illegal eingeführten Produkte die Grenzkontrollstellen unentdeckt, so dass die Dunkelziffer illegal eingeführter Lebensmittel deutlich höher liegen kann (Jurado et al. 2019). Dies ist darauf zurückzuführen, dass aufgrund des hohen Verkehrsaufkommens nicht alle Gepäckstücke von Einreisenden kontrolliert werden können und die an den Grenzkontrollstellen durchgeführten Zollkontrollen in erster Linie risikoorientiert durchgeführt werden und sich vor allem auf das Vorkommen von Tierseuchen wie Maul- und Klauenseuche, Aviäre Influenza und Afrikanische Schweinepest in den jeweiligen Herkunftsländern und weniger auf das Vorkommen bakterieller Zoonoseerreger konzentrieren (Thiermann 2005; Jansen et al. 2019). Risikoabschätzungen zufolge werden rund 200.000 Tonnen Lebensmittel tierischer Herkunft jährlich illegal in die EU importiert (Jansen et al. 2019). Allein über den größten deutschen Flughafen, den Flughafen Frankfurt am Main (FRA), werden diesen Schätzungen zufolge jährlich ca. 2.800 Tonnen Lebensmittel tierischer Herkunft und über den größten österreichischen Flughafen, den Flughafen Wien, ca. 1.013 Tonnen Fleischprodukte illegal eingeführt (Beutlich et al. 2015; Falk et al. 2013).

2.2 Importierte Lebensmittel tierischen Ursprungs als Eintragsquellen für lebensmittelassoziierte bakterielle Pathogene

2.2.1 Legal importierte Lebensmittel tierischen Ursprungs als Eintragsquellen für lebensmittelassoziierte bakterielle Pathogene

Trotz der rechtlichen Vorgabe, dass aus Drittstaaten importierte Lebensmittel grundsätzlich die gleichen EU-internen Standards in Bezug auf die Lebensmittelsicherheit und Lebensmittelhygiene erfüllen müssen wie innergemeinschaftliche produzierte Erzeugnisse, ist nachgewiesen, dass importierte Lebensmittel tierischer Herkunft mit bakteriellen Pathogenen kontaminiert sein können (Stella et al. 2013; Jansen et al. 2018). In vergangenen Jahren (2008-2013) konnten vermehrt Zurückweisungen von Lebensmittelimporten tierischer Herkunft an den EU-Grenzkontrollstellen verzeichnet werden (Jansen et al. 2016). Dabei wurde über die Hälfte der über die RASFF registrierten Grenzzurückweisungen (58%) aufgrund des Nachweises von pathogenen Mikroorganismen zurückgeführt, wovon *Salmonella* spp. mit 56,8% am häufigsten in aus Drittstaaten importiertem Geflügelfleisch nachzuweisen waren (Jansen et al. 2016). Bei Betrachtung der gesamten RASFF-Meldungen in dem von der Europäischen Kommission veröffentlichten Jahresreport von 2020 fällt auf, dass sich der Anteil der Meldungen, die auf Zurückweisungen an den EU-Grenzkontrollstellen bezogen sind, reduziert hat. Im Jahr 2014 konnten noch rund 50% aller Meldungen auf Zurückweisungen an EU-Grenzkontrollstellen zurückgeführt werden, während dies im Jahr 2020 nur noch auf ein Drittel aller Meldungen zutraf (EC 2021b). Die Abnahme der Zurückweisungen muss jedoch vor dem Hintergrund der COVID-Pandemie betrachtet werden. Im Jahr 2020 wurden 208 (20%) der insgesamt 1056 gemeldeten Grenzzurückweisungen an den EU-Außengrenzen auf den Nachweis pathogener Mikroorganismen zurückgeführt (EC 2021b). Dabei handelte es sich bei 28 (13,5%) bzw. acht (3,85%) dieser Meldungen um Produkte der Kategorie „Geflügelfleisch“ bzw. „Fleisch- und Fleischprodukte“ (EC 2021b).

Aktuell sind wenig wissenschaftliche Daten zur mikrobiologischen Qualität von aus Drittstaaten importierten Lebensmitteln tierischer Herkunft bekannt. Ergebnisse einer Studie, in der über die Grenzkontrollstelle des Hamburger Hafens aus Drittländern importiertes, gefrorenes Geflügel- und Schweinefleisch untersucht wurde, zeigen, dass legal importiertes Fleisch mit lebensmittelassoziierten Pathogenen wie *S. aureus*, *Salmonella* spp. sowie ESBL-produzierenden *E. coli* kontaminiert sein kann (Jansen

et al. 2018). Eine weitere Studie ist publiziert, in der die mikrobiologische Qualität von aus Argentinien nach Italien legal importiertes Rindfleisch untersucht wurde, in der insgesamt eine geringe Kontaminationsrate mit *Enterobacteriaceae* nachweisbar war und keine *E. coli* sowie *L. monocytogenes* detektiert werden konnten (Stella et al. 2013).

2.2.2 Illegal importierte Lebensmittel tierischen Ursprungs als Eintragsquellen für lebensmittelassoziierte bakterielle Pathogene

Aus lebensmittelhygienischer Sicht kritisch zu bewerten ist, dass illegal importierte Lebensmittel tierischer Herkunft überwiegend ungekühlt und nicht adäquat verpackt transportiert werden. Zudem handelt es sich in erster Linie um in Privathaushalten hergestellte Produkte, bei denen die Einhaltung der strengen Hygienevorschriften, die für gewerblich hergestellte Lebensmittel gelten, häufig nicht gewährleistet ist (Falk et al. 2013). Darüber hinaus ist eine effektive Überwachung von Gesundheitsrisiken, die von importierten Lebensmitteln ausgehen, wie sie für legal importierte Produkte über das RASFF erfolgt, für illegal importierte Produkte nicht gleichwertig umsetzbar (Beutlich et al. 2015; Jansen et al. 2019).

Insgesamt ist die aktuelle Datenlage zur mikrobiologischen Beschaffenheit von Lebensmitteln, die illegal über den privaten Reiseverkehr in die EU eingeführt werden, sehr begrenzt. Darüber hinaus unterscheiden sich die durchgeführten Studien hinsichtlich der untersuchten Lebensmittelmatrices, der Herkunftsländer der Proben sowie der angewandten Untersuchungsmethoden (Jansen et al. 2019). Insgesamt konnte bisher gezeigt werden, dass illegal importierte Lebensmittel tierischen Ursprungs als Vektoren für zoonotische bakterielle Pathogene dienen können (Jansen et al. 2019; Beutlich et al. 2015; Müller et al. 2018b; Rodríguez-Lázaro et al. 2015).

In den Studien waren in illegal importierten Fleisch- und Fleischprodukten am häufigsten *L. monocytogenes* mit einer Nachweisrate von 5% nachweisbar, wohingegen in illegal importierten Milchprodukten am häufigsten *S. aureus* detektiert wurde (Beutlich et al. 2015; Schoder et al. 2015; Ciolacu et al. 2016; Jansen et al. 2019). In von Flugpassagieren konfiszierten Fleisch- und Fleischprodukten ließen sich bei insgesamt 2% dieser Lebensmittel *Salmonella* spp. nachweisen (Jansen et al. 2019; Schoder et al. 2015; Beutlich et al. 2015; Rodríguez-Lázaro et al. 2015). Für Shigatoxin-produzierende *E. coli* (STEC) sind Nachweisraten in illegal importierten Fleisch- und Fleischprodukten von 0,5% beschrieben, wohingegen in Milch- und

Milchprodukten eine höhere Kontaminationsrate von 2,2% dokumentiert ist (Jansen et al. 2019; Schoder et al. 2015; Nagy et al. 2015).

Neben den mikrobiologischen Untersuchungen kommt insbesondere den molekularen Untersuchungen von bakteriellen Pathogenen, die aus legal und illegal importierten Lebensmitteln isoliert wurden, eine besondere Relevanz zu. Studien haben gezeigt, dass diese Produkte als Vektoren für neue oder in der EU üblicherweise nicht vorkommende Genotypen sowie für besonders virulente und multiresistente Stämme fungieren können, worauf in den Kapiteln 2.4.5 bzw. 2.5 eingegangen wird (Müller et al. 2018b; Müller et al. 2016; Jansen et al. 2018; Rodríguez-Lázaro et al. 2015).

2.3 Mikrobiologische Anforderungen an Lebensmittel tierischer Herkunft in der EU und in Deutschland

2.3.1 Mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel nach der Verordnung (EG) Nr. 2073/2005

Die Überwachung der Lebensmittelsicherheit in der EU und in Deutschland erfolgt zum einen durch amtliche Kontrollen und zum anderen durch Eigenkontrollen der Lebensmittelunternehmer. Diesbezüglich wurden auf der Grundlage der VO (EG) Nr. 852/2004 mit der im Amtsblatt der EU vom 22. Dezember 2005 veröffentlichten VO (EG) Nr. 2073/2005 harmonisierte mikrobiologische Kriterien für den Lebensmittelbereich festgelegt, die von den Lebensmittelunternehmern einzuhalten sind. Ziel dieser Kriterien ist der gesundheitliche Schutz der Bevölkerung durch die Gewährleistung der mikrobiologischen Sicherheit von in der EU produzierten sowie importierten Lebensmitteln. Zur Gewährleistung der Einhaltung der Kriterien sind Lebensmittelunternehmer verpflichtet, in regelmäßigen Abständen Eigenkontrollen durchzuführen, die in der VO (EG) Nr. 2073/2005 hinsichtlich der Häufigkeit der Probenahme, der anzuwendenden analytischen Referenzmethode nach DIN EN ISO sowie der einzuhaltenden produktspezifischen mikrobiologischen Grenzwerte konkretisiert sind. Die mikrobiologischen Kriterien dienen der Überprüfung der guten Hygienepaxis, der HACCP-gestützten Verfahren und geben darüber Auskunft, inwiefern Lebensmittel bzw. deren Herstellungs- und Verarbeitungsprozesse akzeptabel sind. Grundsätzlich sind zwei Arten von mikrobiologischen Kriterien zu unterscheiden. Bei den Prozesshygienekriterien handelt es sich um eine Bewertung der Akzeptabilität der Verfahren bzw. der Prozesshygiene und bezieht sich auf für nicht

im Handel befindliche Erzeugnisse. Im Falle unbefriedigender Ergebnisse werden Maßnahmen erforderlich, die seitens der Lebensmittelunternehmer zu befolgen sind. Diese Maßnahmen können unter anderem Kontrollen der allgemeinen Hygiene, Verbesserungen der Produktionshygiene und der Auswahl und/oder Herkunft der Rohstoffe umfassen. Zusätzlich sind Lebensmittelunternehmer angehalten, die Ursachen für mikrobiologische Kontaminationen zu evaluieren und Verbesserungsmaßnahmen durchzuführen. Bei den Lebensmittelsicherheitskriterien handelt es sich um Kriterien, bei dem die Akzeptabilität eines Erzeugnisses (Lebensmittels) während der Haltbarkeitsdauer festgelegt wird. Diese beziehen sich auf den Nachweis von grundsätzlich als pathogen eingestuften Mikroorganismen sowie deren Metaboliten und gebildeten Toxinen. Bei einer Überschreitung der Grenzwerte ist das Erzeugnis in der vorliegenden Form nicht verkehrsfähig und muss vom Lebensmittelunternehmer aus dem Verkehr gezogen oder, falls das Erzeugnis den Endverbraucher bereits erreicht hat, zurückgerufen werden.

2.3.2 Mikrobiologische Richt- und Warnwerte der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM)

Die Fachgruppe der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) veröffentlicht seit 1988 unter Berücksichtigung des europäischen und nationalen Lebensmittelrechts rechtlich nicht bindende Empfehlungen zur objektiven Beurteilung des hygienisch-mikrobiologischen Zustands bestimmter Lebensmittel (DGHM 2023; DGHM 2018). Ziel ist es, ergänzend zur Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 Richt- und Warnwerte für Lebensmittelkategorien festzulegen, für die es keine gesetzlichen mikrobiologischen Beurteilungskriterien gibt, die aber aus Sicht des gesundheitlichen Verbraucherschutzes für erforderlich gehalten werden (DGHM 2023). Die Richt- und Warnwerte der DGHM liegen für 15 verschiedene Lebensmittelkategorien vor, die Produkte tierischer und nicht tierischer Herkunft umfassen (DGHM 2023). Die einzelnen Lebensmittelkategorien sind in mehrere Unterkategorien unterteilt, so dass es z.B. für rohes Fleisch wie für Rindfleisch, Schweinefleisch, Lammfleisch, Geflügelfleisch sowie Hackfleisch aus Schweine- und/oder Rindfleisch ebenso wie für einzelne Milch- und Milchprodukte wie Salzlakekäse jeweils mikrobiologische Empfehlungen gibt (DGHM 2021; 2022; 2023). Die Richt- und Warnwerte gelten für im Verkehr befindliche Lebensmittel während der Mindesthaltbarkeitsdauer und beziehen sich unter Berücksichtigung der Zusammensetzung, der Verarbeitungsprozesse sowie

der Zweckbestimmung des Produktes auf ein bestimmtes Lebensmittel bzw. eine bestimmte Lebensmittelkategorie. Die Richtwerte sind als Orientierung zu verstehen, um das produktspezifisch zu erwartende mikrobielle Keimspektrum sowie die nachgewiesenen Keimzahlen im Hinblick auf die Einhaltung einer guten Hygiene- und Herstellungspraxis einordnen zu können (DGHM 2023). Als mikrobiologisch unauffällig gelten nach Auffassung der DGHM Lebensmittel, deren Keimgehalte kleiner oder gleich dem Richtwert sind. Da eine Überschreitung des DGHM-Richtwertes ein Hinweis auf Hygienemängel oder auf eine zu lang festgelegte Haltbarkeit sein kann, ist eine Verbesserung der Hygiene- und Herstellungspraxis oder die festgesetzte Haltbarkeitsdauer zu prüfen (DGHM 2018). Eine Warnwertüberschreitung weist hingegen auf einen Verstoß gegen die gute Hygiene- und Herstellungspraxis hin. Bei der Überschreitung von Warnwerten für pathogene Mikroorganismen, wie z.B. *Salmonella* spp. kann laut DGHM eine Gesundheitsgefährdung durch den Verzehr des Lebensmittels erwartet oder zumindest nicht ausgeschlossen werden.

2.4 Häufig nachgewiesene Lebensmittelinfektionserreger und ihre Bedeutung für die Lebensmittelsicherheit

2.4.1 Bedeutung von *E. coli* als Lebensmittelinfektionserreger und Relevanz bestimmter klonaler Linien von *E. coli* und STEC

Escherichia coli besiedeln als gramnegative kommensale Bakterien natürlicherweise den Magen-Darm-Trakt von Säugetieren und Vögeln (RKI 2011). Zusätzlich sind einige *E. coli*-Stämme aufgrund ihrer Humanpathogenität von Relevanz und können zu intestinalen sowie extraintestinalen Infektionen führen (RKI 2011; Gyles 2007). Die Erregeraufnahme erfolgt meist fäkal-oral durch den Kontakt mit Fäzes, fäkal kontaminierten Lebensmitteln oder seltener durch eine direkte Übertragung von Mensch zu Mensch (RKI 2011).

Unter den pathogenen *E. coli*-Stämmen sind Shigatoxin-produzierende *E. coli* (STEC), die aufgrund ihrer Toxinbildung zu blutigen Durchfallerkrankungen (hämorrhagische Colitis) und Nierenversagen (hämolytisch-urämisches Syndrom, HUS) führen können, von großer Bedeutung (Gyles 2007). Ursprünglich wurden diejenigen STEC, die in der Lage sind humane Erkrankungen hervorzurufen, als enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC) bezeichnet, wobei durch den Nachweis neuer STEC-Stämme bei erkrankten Personen eine scharfe Abgrenzung zwischen STEC und EHEC nicht möglich ist (RKI 2022; IfSG 2001). Insgesamt wurden in Deutschland im Jahr 2021, 1601 EHEC-

Erkrankungen gemeldet (RKI 2022). Innerhalb der EU lag 2021 die gemeldete Anzahl an STEC-Fällen bei 7111 mit einer Hospitalisierungsrate von rund 16% (EFSA 2022a). Dabei unterliegen laut EFSA die gemeldeten STEC-Infektionen in den Jahren 2018-2022 keinen signifikanten Schwankungen mit rund 7000 gemeldeten Fällen jährlich (EFSA 2023). In der EU stehen STEC-Infektionen an vierter Stelle der am häufigsten gemeldeten lebensmittelbedingten Infektionen mit 408 registrierten lebensmittelassoziierten Krankheitsausbrüchen (2022) (EFSA 2023). Da insbesondere Wiederkäuer als Reservoir für EHEC-Stämme fungieren, sind als tierische Risikoprodukte insbesondere rohes Rindfleisch und Rohmilchprodukte als die wichtigsten Infektionsquellen für den Menschen beschrieben (EFSA 2022a; RKI 2021). Dabei ließen sich nach Angaben der EFSA 2021 in 5,7% (288) der aus 16 EU-Mitgliedsstaaten untersuchten rohen Rindfleischproben (5095) und in 2% (14) der insgesamt 714 untersuchten Milch- und Milchprodukte aus 6 EU-Mitgliedsstaaten STEC nachweisen (EFSA 2022a).

In der Lebensmittelkette dienen *E. coli* primär als Indikatorkeime für Hygienemängel und fäkale Kontaminationen (Buchanan 2000). In der Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 sind für bestimmte Lebensmittelkategorien (Hackfleisch/Faschiertes, Separatorenfleisch, Fleischzubereitungen sowie für Käse aus Milch oder Molke, welcher einer Wärmebehandlung unterzogen wurden) Grenzwerte für *E. coli* als Prozesshygienekriterium definiert. Ebenso wurden von der DGHM Richt- und Warnwerte für *E. coli* für bestimmte Lebensmittelkategorien sowie Warnwerte für STEC für einzelne Produktgruppen (Rohwürste und Lammfleisch) festgelegt (DGHM). Einigen EHEC-Serogruppen, die sich anhand der Antigenvariationen der Oberflächenantigene (O- und H-Antigene) bestimmen lassen, kommt eine besondere Bedeutung zu. In der EU ist nach der jährlichen Zoonosenberichterstattung der EFSA die EHEC-Serogruppe O157:H7 am häufigsten in humane Krankheitsgeschehen involviert, wobei in den letzten Jahren der Nachweis von nicht-O157 STEC wie O26, O103, O111, O121 und O145 zunehmend an Bedeutung gewonnen hat (EFSA 2022a). Innerhalb von Deutschland lagen 2021 laut des epidemiologischen Jahresberichtes des RKIs lediglich für 12% (226) der EHEC-Erkrankungen Angaben zur Serogruppe vor (RKI 2022). Von diesen ließen sich 10% (23) nicht typisieren. Die am häufigsten genannte Serogruppe der übermittelten EHEC-Erkrankungen war O157 in 22% (50) der Fälle, gefolgt von O26 (12%, 27) und O145 und O146 mit jeweils 8% (17 und 19 Fälle) (RKI 2022).

Neben einer Einteilung in Serogruppen lassen sich *E. coli* bzw. STEC mittels der Multi-Locus-Sequenztypisierung (MLST) anhand des Vorhandenseins identischer Allele von insgesamt sieben Haushaltsgenen zu einem Sequenztyp zuordnen (Larsen et al. 2012). Unter den humanpathogenen klonalen Linien zeigen die MLS-Typen ST69, ST73, ST95 und ST131 eine dominierende Prävalenz in klinischen Isolaten (Riley 2014; Mathers et al. 2015; Jaureguy et al. 2008; Banerjee et al. 2013; Tartof et al. 2005). Der ExPEC-Sequenztyp ST131 (O25b:H4) gilt dabei als der weltweit am häufigsten nachgewiesene *E. coli*-Klon im Zusammenhang mit humanen Infektionen (Doumith et al. 2015). Zu dem Sequenztyp ST131 gehören weitere klinisch relevante Stämme, die bereits in Lebensmitteln, insbesondere in Hähnchen- und Putenfleisch, nachgewiesen werden konnten (Wetzel und Fieseler 2020; Roer et al. 2019; Díaz-Jiménez et al. 2020). Studien zeigen zudem eine enge genetische Verwandtschaft zwischen klinischen ST131-Isolaten und solchen, die aus Fleisch isoliert wurden, wodurch das potentiell gesundheitliche Risiko eines Verzehrs mit ST131 kontaminiertem Fleisch verdeutlicht wird (Liu et al. 2018; Wetzel und Fieseler 2020; Roer et al. 2019).

Mittels PCR-Verfahren lassen sich anhand der An- bzw. Abwesenheit drei bestimmter Gen-Abschnitte (*chuA*, *yjaA* und *TspE4.C2*) *E. coli* in vier phylogenetische Hauptgruppen unterteilen (A, B1, B2, D) (Clermont et al. 2000), wobei dieses Phylotypisierungssystem in den letzten Jahren um die drei weiteren Gruppen (C, E und F) ergänzt worden ist (Clermont et al. 2013). Virulente extraintestinale Stämme (ExPEC) können hauptsächlich zur Gruppe B2, D und F zugeordnet werden, wohingegen die meisten kommensalen Stämme zu den Gruppen A und B1 gehören (Clermont et al. 2000; Herzer et al. 1990; Picard et al. 1999; Xia et al. 2022).

Für die Pathogenität von STEC spielen die von diesen gebildeten Shigatoxine eine essentielle Rolle, bei welchen man zwischen zwei an unterschiedliche Gen-Loci bindende Toxine, Stx1 und Stx2, unterscheidet, die in weitere Subtypen (kodiert durch die Gene *stx1a* bis *stx1c* und *stx2a* bis *stx2i*) unterteilt werden können (Gyles 2007; Scheutz et al. 2012). Wobei in jüngsten Studien die *stx2*-Nomenklatur der Gene um weitere *stx2*-Subtypen (*stx2j-stx2m*) erweitert wurde (Bai et al. 2021; EFSA 2020). Der Gen-Nachweis von *stx1*- sowie der von den *stx2b*- und *stx2e*-Genen in klinischen STEC-Isolaten ist vorrangig mit milden Krankheitsverläufen assoziiert, wohingegen der Nachweis der Gen-Subtypen *stx2a*, *stx2c* und *stx2d* mit schwereren Verläufen in Verbindung gebracht wird (RKI 2011; Bai et al. 2013; Rivas et al. 2016; Melton-Celsa

2014). Zusätzlich ist der Nachweis des *eae*-Gens von Bedeutung für die Pathogenität von STEC (Minh et al. 2015). Dieses Gen liegt auf einer chromosomalen Pathogenitätsinsel (engl.: „locus of enterocyte effacement“; LEE), dessen Genprodukt ein wichtiges Bindungsprotein (Intimin) ist, das eine enge Anheftung an Darmepithelzellen ermöglicht und für die Pathogenität von Relevanz ist (Karmali 2004; Minh et al. 2015; Naseer et al. 2017). Insbesondere der Nachweis des *ehxA*-Gens (codierend für Enterohämolysin A) ist in klinischen Isolaten als kritischer Faktor in der Pathogenese des Hämolytisch-urämischen Syndroms (HUS) beschrieben (Hua et al. 2021a).

Eine präzise Methode der molekularen Feintypisierung von *E. coli* einschließlich STEC stellt die Ganzgenomsequenzierung (engl.: „Whole-genome sequencing“; WGS) dar, die in den letzten Jahren zur Bestimmung der Virulenz und Resistenzen zunehmend an Bedeutung gewonnen hat (Clermont et al. 2000; Herzer et al. 1990; Picard et al. 1999; Xia et al. 2022).

Escherichia coli ist die Spezies, bei der am häufigsten ESBL-Gene nachgewiesen werden, worauf in Kapitel 2.5 eingegangen wird (Halkman und Halkman 2014; Mladenović et al. 2021; Buchanan 2000; EFSA und ECDC 2023). Zudem zeichnen sich einige *E. coli*-Stämme durch eine hohe genetische Diversität aus, die insbesondere auf die Fähigkeit der Bakterien zum horizontalen Gentransfer zurückzuführen ist, wodurch ihnen bei der Akkumulation und Verbreitung von Antibiotikaresistenzen eine große Bedeutung zukommt (Robins-Browne et al. 2016).

2.4.2 *Salmonella enterica* als Lebensmittelinfektionserreger und bedeutende Serovare

Bei Salmonellen handelt es sich um gramnegative Stäbchen der Gattung *Salmonella*, bestehend aus zwei Spezies (*S. enterica* und *S. bongori*) (Porwollik et al. 2004; Grimont 2008). Bei *S. enterica* ist eine Subklassifizierung in sechs Subspezies festgelegt, von denen *S. enterica* subsp. *enterica* die bedeutsamste humanpathogene Rolle zu kommt (Porwollik et al. 2004; EFSA 2022a; EFSA 2021; Grimont 2008).

Bei der humanen Salmonellose handelt es sich um eine klassische Lebensmittelinfektion, die in der EU und in Deutschland nach der Campylobacteriose die am zweit häufigsten vorkommende bakterielle gastrointestinale Infektion mit 65.208 (2022) gemeldeten Fällen in der EU und 9141 Fällen (2022) in Deutschland ist (EFSA 2021; EFSA 2022a; RKI 2016a). Die humane Salmonellose manifestiert sich

meist als akute, selbstlimitierende Darmentzündung mit einer hohen Hospitalisierungsrate innerhalb der EU von 17,31% (2022) (RKI 2016a; EFSA 2023). Abhängig von dem Gesundheitszustand der infizierten Person und der Infektionsdosis können sich aus den initialen Darmentzündungen schwere bis tödlich verlaufende Allgemeininfektionsgeschehen mit septischem Verlauf entwickeln, wobei die Sterberate in der EU (0,12%, 2021) und in Deutschland (0,14%, 2021) niedrig ist (EFSA 2022a; RKI 2016a; RKI 2022). Als Hauptinfektionsquellen gelten insbesondere Lebensmittel tierischen Ursprungs wie rohe oder unzureichend erhitzte Eier bzw. eihaltige Speisen sowie rohes Fleisch und Rohwurstsorten (EFSA 2023; RKI 2016a). Laut EFSA 2023 wurde bei der Auswertung von Daten aus insgesamt 15 EU-Mitgliedstaaten bei amtlich entnommenen Proben im Hinblick auf die Einhaltung der Lebensmittelsicherheitskriterien gemäß der Verordnung (EU) Nr. 2073/2005 festgestellt, dass frisches Geflügelfleisch mit 9,0% am häufigsten mit Salmonellen kontaminiert war, gefolgt von Fleischerzeugnissen aus Geflügelfleisch, die zum Verzehr in erhitztem Zustand bestimmt sind, mit 8,1%. (EFSA 2024). Innerhalb der EU konnten in den Jahren 2022 und 2023 ein Prozentanteil von 43% (86 von 200) bzw. 32% (83 von 258) der lebensmittelbedingten Salmonelloseausbrüche, bei denen ein direkter Zusammenhang zwischen einem Lebensmittel und den Erkrankungsfällen bestand (engl.: strong-evidence outbreak), auf den Verzehr von Eiern und Eiprodukten zurückgeführt werden (EFSA 2023; EFSA 2024). In der Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 ist eine Nulltoleranz (in 10 g bzw. 25 g nicht nachweisbar) für *Salmonella* spp. in verschiedenen Lebensmittelmatrices festgesetzt und gilt für in Verkehr gebrachte Erzeugnisse während der Haltbarkeitsdauer. Ebenso liegen seitens der DGHM Empfehlungen bezüglich einer Nulltoleranz für mehrere Lebensmittel vor.

Salmonella spp. lassen sich nach dem White-Kaufmann-Le Minor Schema in über 2600 Serovare untergliedern, wobei das Serovar hinweisend für jeweilige Pathogenität des Wirtorganismus sein kann (Brown et al. 2021). Grundsätzlich gilt jedoch jedes Serovar als potenziell humanpathogen (Brown et al. 2021).

Um einen Überblick über die Verteilung der *Salmonella*-Serovare in der EU bei den am häufigsten vorkommenden lebensmittelliefernden Tierarten und den Lebensmittelmatrices zu erhalten, wurden 2023 insgesamt 19.295 Salmonellen-Isolate untersucht (EFSA 2024). Die meisten *S. Enteritidis*-Isolate (62,6%) wurden bei „Masthähnchen und Masthähnchenfleisch“ und bei „Legehennen und Eiern“ mit 28,4% identifiziert. Die Mehrheit der *S. Typhimurium*-Isolate (43,2%) wurden ebenfalls bei

„Masthähnchen und Masthähnchenfleisch“ nachgewiesen, wobei ein Drittel (30,4%) aus „Schweinen und Schweinefleisch“ isoliert wurde. Ein Großteil der monophasischen *S. Typhimurium*-Isolate (65,4%) wurde aus „Schweinen und Schweinefleisch“ isoliert (EFSA 2024). Diese Daten müssen jedoch im Hinblick dessen betrachtet werden, dass die Hälfte der Isolate von Masthähnchen (52,4%) und 20,6% aus Masthähnchen-Fleisch stammten und die jeweiligen Tier- und Lebensmitteldaten aus derselben Quelle zu Kategorien zusammengefasst wurden (EFSA 2024).

In der EU lagen bei 72,3% (47.122 von 65.208) der humanen Salmonellose-Fälle Informationen über das beteiligte Serovar vor. Von diesen war in über 54,6% (2022) der humanen Salmonellose-Fälle innerhalb der EU das Serovar *S. Enteritidis* involviert (EFSA 2023). Wie in Tabelle 1 aufgeführt, wird am zweithäufigsten in der EU das Serovar *S. Typhimurium* (12,1%) im Kontext mit humanen Infektionsgeschehen nachgewiesen, gefolgt von der monophasischen *S. Typhimurium*-Variante mit 10,4% sowie von *S. Infantis* (2,3%) und *S. Derby* (1,1%) (EFSA 2023). In Deutschland wurde für 67% (6139) der insgesamt 1941 nachgewiesenen humanen Salmonellose-Fälle ein Serovar angegeben. Dabei wurde im Jahr 2022 auch am häufigsten das Serovar *S. Enteritidis* nachgewiesen, jedoch lag der prozentuale Anteil mit 38% niedriger als auf EU-Ebene (EFSA 2023). Bei rund 30% der untersuchten Isolate wurde *S. Typhimurium* (inklusive der monophasischen Variante) nachgewiesen, gefolgt von *S. Infantis* (3,4%) und *S. Newport* (1,3%), *S. Chester* (1,2%), *S. Derby* (1,1%) und *S. Agona* (0,98%) (Tabelle 1) (RKI 2022).

Tabelle 1. Verteilung der Salmonellen-Serovare der gemeldeten humanen Salmonellose-Fälle in der EU und in Deutschland¹, 2022.

Serovar	EU ²		Deutschland ³	
	Fallzahlen	Anteil (%)	Fallzahlen	Anteil (%)
Enteritidis	25.737	54,6	2322	38
Typhimurium	5694	12,1	1849	30
Monophasisches Typhimurium	4906	10,4		
Infantis	1093	2,3	208	3,4
Newport	522	1,1	80	1,3
Derby	513	1,1	69	1,1
Napoli	448	0,95	- ⁴	-
Agona	343	0,73	60	0,98
Chester	338	0,72	75	1,22
Coeln	333	0,71	-	-
Kentucky	314	0,67	-	-
Virchow	276	0,59	-	-
Weitere ⁵	1567	3,33	-	-
Nicht aufgeführt ⁶	5038	10,7	-	-
Gesamt⁷	47.122	100	6139	100

¹Für die Informationen über das Serovar verfügbar waren (in der EU für 72,3%, 47.122 von 65.208 Fällen, in Deutschland für 67%, 6139 von 9141 Fällen). ²Laut EU-Zoonose Bericht (2022) (EFSA 2023). ³Laut des Infektionsepidemiologischen Jahrbuchs meldepflichtiger Krankheiten 2022 (RKI 2022). ⁴Nicht gelistet/Keine Angabe über das Vorkommen dieser Serovare (2022). ⁵Stanley (238, 0,51%), Bovismorbificans (226, 0,48%), Braenderup (218, 0,46%), Mbandaka (205, 0,44%), Brandenburg (177, 0,38%), Hadar (1,73, 0,37%), Panama (167, 0,35%), Montevideo (163, 0,35%), andere Serovare (5038, 10,7%), ⁶Keine Angabe über das Serovar aufgeführt seitens des RKIs für das Jahr 2022. ⁷Anzahl der humanen Salmonellose-Fälle für die Informationen über das Serovar verfügbar waren (2022).

Hinsichtlich ihres Resistenzverhaltens gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen unterscheiden sich die Serovare teilweise erheblich. Innerhalb der EU 2022 variierten die *Salmonella* spp.-Isolate aus erkrankten Menschen hinsichtlich ihrer Multiresistenz, sprich einer Resistenz gegenüber mindestens drei antimikrobiellen Wirkstoffklassen. Die Multiresistenzraten gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen reichten von niedrigen Werten bei *S. Enteritidis* (2,4%) bis zu sehr hohen Werten bei *S. Kentucky* (63,7%) und der einphasigen *S. Typhimurium*-Variante mit 68,2 % (EFSA 2024a). Resistenzen gegenüber Cephalosporinen der dritten Generation werden laut der EFSA bei *Salmonella* spp.-Isolaten von erkrankten Personen sowie bei Isolaten von lebensmittelliefernden Tieren als niedrig eingestuft (EFSA 2024a). Insbesondere das Vorkommen von Co-Resistenzen gegenüber Fluorchinolonen und Cephalosporinen der dritten Generation kann bei Salmonellen von Bedeutung sein, da diese Wirkstoffe

bei der Behandlung humaner invasiver Salmonellosen von großer Bedeutung sind, worauf in Kapitel 2.5 eingegangen wird.

2.4.3 *Listeria monocytogenes* als Lebensmittelinfektionserreger und bedeutende Serovare und klonale Linien

Listeria monocytogenes sind grampositive, weltweit verbreitete, ubiquitär in der Umwelt vorkommende Bakterien, die zur Familie der *Listeriaceae* und zur Gattung *Listeria* gehören (RKI 2010). Häufig werden sie im landwirtschaftlichen Bereich in verdorbener Silage, in der Erde und in Abwässern sowie in lebensmittelverarbeitenden Betrieben nachgewiesen (RKI 2010; Townsend et al. 2021). Ursprünglich konnten sieben *Listeria*-Spezies voneinander unterschieden werden, wobei sich seit 2010 die Anzahl der identifizierten *Listeria*-Spezies um 22 (Stand 2024) weitere voneinander abgrenzbare Spezies und somit um mehr als das Dreifache erhöht hat (Orsi et al. 2024). Unter den bekannten *Listeria*-Spezies kommt *Listeria monocytogenes* die bedeutsamste humanpathogene Rolle zu (RKI 2010). Dabei gilt die humane Listeriose als klassische Lebensmittelinfektion mit 2738 (2022) gemeldeten Fällen in der EU und 751 Fällen (2022) in Deutschland und sie steht an fünfter Stelle der am häufigsten vorkommenden Zoonosen innerhalb der EU (RKI 2010; EFSA 2022a; EFSA und ECDC 2023; RKI 2022). Die bei gesunden, immunkompetenten häufig symptomlos verlaufende Infektion ist bei Risikogruppen (immunsupprimierte, ältere oder schwangere Personen sowie Neugeborene) hingegen oftmals mit schweren Krankheitsverläufen assoziiert, welches sich in einer hohen Hospitalisierungs- und Sterberate widerspiegelt, die innerhalb der EU im Jahr 2021 bei 42,28% bzw. 8,98% lag (EFSA 2022a; Shamloo et al. 2019). Innerhalb von Deutschland lag die Letalitätsrate bei 6% (2022) (RKI 2022).

Zu den am häufigsten mit *L. monocytogenes* kontaminierten Lebensmitteln zählen verzehrfertige, nicht wärmebehandelte Lebensmittel (Rohmilch und Rohmilchprodukte, rohe Fleischzubereitungen, Rohwurst sowie kaltgeräucherte Fischprodukte), wobei eine Kontamination der Lebensmittel auf verschiedenen Stufen beginnend von der Rohstoffgewinnung, der Schlachtung bis hin zur Verarbeitung erfolgen kann (BVL 2021; Shamloo et al. 2019). In der Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 sind Grenzwerte für *L. monocytogenes* als Lebensmittelsicherheitskriterium aufgeführt, wobei für verzehrfertige, für Säuglinge oder für besondere medizinische Zwecke bestimmte Lebensmittel sowie solche Lebensmittel, die die Vermehrung von

L. monocytogenes begünstigen können, eine Nulltoleranz (in 25 g nicht nachweisbar) gilt. Ebenso liegen seitens der DGHM für einige Lebensmittelproduktgruppen Warnwerte für den Nachweis von *L. monocytogenes* vor.

Für die phänotypische und genotypische Charakterisierung von *Listeria monocytogenes* stehen verschiedene Methoden zu Verfügung. Dabei stellt die WGS die präziseste Methode der Erregertypisierung dar, die eine Bestimmung der *L. monocytogenes*-Linien und Serovare, der Sequenztypen (ST) sowie der Zuordnung zu klonalen Komplexen (CC) erlaubt. Bei der Untersuchung von lebensmittelassoziierten Listeriose-Ausbrüchen beim Menschen hat sich die WGS zudem als Goldstandard für die Identifizierung epidemiologischer Zusammenhänge etabliert (Painset et al. 2019; EFSA 2022c).

Grundsätzlich ist eine Differenzierung innerhalb der Populationsstruktur von *L. monocytogenes* in vier genetische Linien (I-IV) möglich (Orsi et al. 2011). Die überwiegende Anzahl humaner Listeriose-Fälle steht mit Linie I in Verbindung, wohingegen Isolate der Linie II vorrangig aus Lebensmitteln isoliert werden (Orsi et al. 2011). Zu den vier Linien lassen sich insgesamt 14 Serotypen zuordnen, wobei Stämme der drei Serotypen 1/2a (Linie II), 1/2b (Linie I) und 4b (vorwiegend Linie I, seltener Linie III oder IV) hauptsächlich mit humanen Erkrankungsgeschehen assoziiert sind (Shamloo et al. 2019; RKI 2010; EFSA 2018b; Orsi et al. 2011; Kathariou 2002). In den vergangenen Jahren wiesen insbesondere Stämme des Serotyps 4b (Linie I) die stärkste epidemiologische Assoziation mit humanen Listeriose-Fällen auf (Maury et al. 2016; Gray et al. 2004; Orsi et al. 2011; Rothrock et al. 2019). Dahingegen konnten in Lebensmitteln erhöhte Nachweisraten des Serotyps 1/2a (IIa) festgestellt werden, welcher sporadisch mit Krankheitsausbrüchen in Europa und Nordamerika assoziiert ist (Lomonaco et al. 2015; EURL 2021; Capita et al. 2019). Für eine Clustereinteilung von *L. monocytogenes* eignet sich die Zuordnung zu klonalen Komplexen (CC). Dabei werden die als hypervirulent bezeichneten Komplexe CC1, CC2, CC4 und CC6 (Linie I) vorwiegend in klinischen Isolaten nachgewiesen (Maury et al. 2016). In diesem Zusammenhang ist CC1 der am weitesten verbreitete klonale Komplex, der mit Fällen von Listeriose beim Menschen in Verbindung gebracht wird (Moura et al. 2021; Chenal-Francisque et al. 2011; Cantinelli et al. 2013). Gleichzeitig konnte in einer europäischen Studie eine hohe Prävalenz von *L. monocytogenes* CC1 in Milchprodukten nachgewiesen werden, die das lebensmittelassoziierte Infektionsrisiko mit hypervirulenten CC1-Klonen verdeutlicht

(Maury et al. 2019). Die hypovirulenten Komplexe CC9 und CC121 (Linie II) gelten als lebensmittelassoziiert und zeigen insbesondere in Fleischprodukten eine dominierende Prävalenz ((Félix et al. 2018; Painset et al. 2019; Cabal et al. 2019; Henri et al. 2016; EURL 2021). In der Literatur werden diese primär lebensmittelassoziierten CC9 und CC121 lediglich sporadisch mit Listeriose-Fällen bei immunsupprimierten Personen beschrieben (Maury et al. 2019; EURL 2021; Cabal et al. 2019).

In Europa sind mehrere Sequenztypen mit lebensmittelbedingten Listeriose-Fällen assoziiert, wobei z.B. dem ST6 in den letzten Jahren eine prädominante Rolle in Krankheitsgeschehen zugekommen ist (Halbedel et al. 2020; Althaus et al. 2017; Gillesberg Lassen et al. 2016; ECDC und EFSA 2019). So konnte beispielsweise ein schwerer ST6-assoziiertes Listerioseausbruch in mehreren EU-Mitgliedstaaten in den Jahren 2017 bis 2019 auf verzehrfertige Fleischprodukte zurückgeführt werden (EFSA 2019a). Gleichzeitig verdeutlichen die mit dem Verzehr von kontaminierten Lachsprodukten in Verbindung stehenden ST8 (CC8) (2015-2018) und ST1247 (CC8) (2014-2019) registrierten Listeriose-Ausbrüche in mehreren EU-Mitgliedstaaten das gesundheitliche Risiko, welches auch von weniger häufig nachgewiesenen Sequenztypen bzw. klonalen Linien in Lebensmitteln ausgeht (EFSA 2018a; EFSA 2019b).

Um eine weitere Aussage über die Virulenz einzelner Listerien-Stämme zu treffen, eignet sich der Nachweis von Virulenz-assoziierten Genen. Dabei können bei *L. monocytogenes* vier Pathogenitätsinseln unterschieden werden (LIPI-1-LIPI-4). Die Pathogenitätsinsel LIPI-1 stellt ein Virulenzgencluster, bestehend aus sechs verschiedenen Genen (*prfA*, *plcA*, *hly*, *mpl*, *actA* und *plcB*) dar, welches das intrazelluläre Überleben von *L. monocytogenes* ermöglicht, und grundsätzlich bei allen genetischen Linien (I-IV) vorkommen kann (Møller et al. 2017). Der Nachweis von LIPI-3 und LIPI-4 hingegen ist insbesondere bei klinisch relevanten hypervirulenten Stämmen beschrieben, wodurch deren Nachweis zur Einstufung der Virulenz der Stämme beitragen kann, wobei LIPI-4 streng mit dem hypervirulenten CC4 assoziiert ist (Gray et al. 2021; Guidi et al. 2021). Zudem geht aus vergangenen Studien hervor, dass insbesondere LIPI-3 zusammen mit dem Virulenz-assoziierten Protein Vip dominierend bei klinischen Isolaten nachzuweisen ist (Møller et al. 2017; EFSA 2018b; Cabanes et al. 2005).

Multiresistenzen gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen spielen bei *Listeria monocytogenes* eine eher untergeordnete Rolle und sie gelten grundsätzlich als

empfindlich gegenüber vielen klinisch relevanten antimikrobiellen Wirkstoffklassen, die gegen grampositive Bakterien wirken (Luque-Sastre et al. 2018; Haubert et al. 2016; Noll et al. 2018). Bei der Behandlung der humanen Listeriose gilt der Einsatz eines β -Laktam-Antibiotikums (Penicillin oder Ampicillin) allein oder in Kombination mit einem Aminoglykosid (Gentamicin) als bevorzugte Therapie. Bekannt ist jedoch bei *L. monocytogenes* das Vorhandensein von intrinsischen Resistenzen gegenüber bestimmten antimikrobiellen Wirkstoffen (wie Cephalosporinen der dritten Generation, Monobaktamen, Chinolonen der ersten Generation wie Nalidixinsäure, Fosfomycin und Sulfonamiden) (Luque-Sastre et al. 2018; Troxler et al. 2000). Gleichzeitig ist ein Gentransfer von Resistenzgenen, die auf mobilen genetischen Elementen lokalisiert sind, innerhalb von Listerien-Spezies, sowie zwischen anderen Bakterien wie *Enterococcus* spp. und *Streptococcus* spp. beschrieben, sodass *L. monocytogenes* zur Verbreitung von Resistenzgenen beitragen können und somit Untersuchungen auf das Vorhandensein von Resistenzgenen nicht zu vernachlässigen sind (Luque-Sastre et al. 2018; Lungu et al. 2011).

2.4.3 *Staphylococcus aureus* als Infektions- und Lebensmittelintoxikationserreger und Bedeutung bestimmter klonaler Linien von *S. aureus* einschließlich Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus ist eine weit verbreitete, grampositive, Koagulase-positive Bakterienspezies, welche als Kommensale natürlicherweise auf der Haut und Schleimhaut von Menschen und Tieren vorkommt (RKI 2016). Gleichzeitig kann der fakultativ pathogene Erreger ein breites Spektrum an Erkrankungen von Haut- und Wundinfektionen, über Lungenentzündungen bis hin zu schwerwiegenden, systemischen Infektionen verursachen (Silva et al. 2020; Borg und Camilleri 2021; RKI 2016).

Weltweit spielt der Erreger insbesondere im Kontext von nosokomialen Infektionen eine wichtige Rolle, wobei Methicillin-resistenten *S. aureus* (MRSA) die größte Bedeutung zukommt (RKI 2016; Silva et al. 2020; Grundmann et al. 2010; Faria et al. 2013). In Deutschland sind für 2021 insgesamt 1037 invasive MRSA-Infektionen gemeldet worden, wovon 84 Fälle einen tödlichen Verlauf nahmen (RKI 2022). Ebenso können Methicillin-sensible *S. aureus* (MSSA) schwere Infektionen verursachen (Gagliotti et al. 2021). Laut einer Studie innerhalb der EU-Mitgliedsstaaten einschließlich der EEA-Staaten, durchgeführt seitens des European Antimicrobial

Resistance Surveillance Network (EARS-Net), konnte im Zeitraum von 2005 bis 2018 ein Anstieg um 31% von Blutstrominfektionen, die durch MSSA verursacht wurden, beobachtet werden (Gagliotti et al. 2021).

Staphylococcus aureus spielt zudem eine Rolle als Lebensmittelintoxikationserreger, was vor allem auf der Fähigkeit zur Bildung hitzestabiler Staphylokokken-Enterotoxine (SE) beruht, die insbesondere bei hohen Keimzahlen von *S. aureus* ($> 10^5$ - 10^6 KbE/g) gebildet werden (Hennekinne et al. 2010). Durch diese besteht bei einem Verzehr mit *S. aureus* kontaminierten Lebensmitteln das Risiko einer Intoxikation, die bei Menschen zu Bauchkrämpfen, Vomitus und Nausea führen kann, wobei es sich in den meisten Fällen um eine selbstlimitierende Symptomatik handelt (Kadariya et al. 2014; CDC 2023). Als *S. aureus*-Intoxikationen verursachende Lebensmittel sind insbesondere Fertiggerichte, Feinkostsalate sowie Süßspeisen bekannt (CDC 2023). Häufig kommt es während der Zubereitung der Speisen zu einer Kontamination der Lebensmittel durch Personen mit infizierten Hautwunden und einer anschließenden Vermehrung des Erregers durch unzureichende Kühlung (CDC 2023; Argudín et al. 2010). Da SE neben ihrer Hitzestabilität resistent gegenüber niedrigen pH-Werten und der Zersetzung durch Verdauungsenzyme sind, besteht selbst bei einem Verzehr erhitzter Lebensmittel das Risiko einer Intoxikation (Kadariya et al. 2014; CDC 2023). In der EU wurden laut der EFSA im Jahr 2021 insgesamt 640 Fälle gemeldet, die auf eine Intoxikation mit *S. aureus*-Toxinen zurückzuführen waren, mit einer Hospitalisierungsrate von 8% (EFSA 2022a). Zudem sind Intoxikation mit *S. aureus*-Toxinen in drei EU-Mitgliedsstaaten (Portugal, Rumänien und Nordmazedonien) für das Jahr 2021, als die insgesamt häufigste Ursache für lebensmittelassoziierte Krankheitsausbrüche vermerkt (EFSA 2022a).

Nach der Klassifizierung der Verordnung (EU) Nr. 2073/2005 sind Koagulase-positive Staphylokokken als Prozesshygienekriterium angegeben, wohingegen der Nachweis von *S. aureus*-Enterotoxinen bei Käse, Milch- und Molkepulver als Lebensmittelsicherheitskriterium gelistet ist. Ebenso liegen in den Empfehlungen der DGHM Richt- und Warnwerte für den Nachweis Koagulase-positiver Staphylokokken in bestimmten Lebensmitteln vor.

Um Rückschlüsse über die jeweilige Herkunft sowie die klinische Relevanz von einzelnen klonalen Linien von *S. aureus*, einschließlich MRSA, ziehen zu können, ist eine molekulare Feintypisierung ausschlaggebend. Für die molekulare Charakterisierung bietet die MLST mittels PCR-Verfahren und anschließender

Sequenzierung eine präzise Methode, die eine Zuordnung zu einem Sequenztyp anhand der Allelvariationen von sieben definierten Haushaltsgenen erlaubt (Enright et al. 2000). Aufgrund ihrer Zugehörigkeit zu bestimmten Sequenztypen können die Isolate zu klonalen Komplexen (CC) gruppiert werden. Als eine weitere Differenzierungsmethode eignet sich die *spa*-Typisierung von *S. aureus*-Isolaten, die auf einer Zuordnung der DNA-Sequenz der hypervariablen X-Region des Staphylococcus Protein A-Gens (*spa*) zu einem bestimmten Staphylokokken-Typ beruht (Shopsin et al. 1999). Als Goldstandard zur Bestimmung des MLST/CC sowie des *spa*-Typens hat sich in den letzten Jahren die Ganzgenomsequenzierung (WGS) vermehrt durchgesetzt. Grundsätzlich wird in der Literatur beim Vorkommen von *S. aureus*-Isolaten zwischen HA-MRSA und HA-MSSA („hospital associated“, mit Krankenhausaufenthalten assoziiert), CA-MRSA und CA-MSSA („community associated“, bei der nicht hospitalisierten Bevölkerung vorkommend) und LA-MRSA und LA-MSSA („livestock associated“, bei Nutztieren vorkommend) unterschieden (Fluit 2012; DeLeo und Chambers 2009; Moellering 2012). Als dominierender Nutztier-assoziiertes Klon in Europa gilt der MRSA-CC398, der häufig auf Fleisch nachgewiesen wird (Kinross et al. 2017; Larsen et al. 2017). In Europa ist des Weiteren CC97 als Nutztier-assoziiertes klonaler Komplex weit verbreitet, wobei dieser häufig aus an Mastitis erkrankten Wiederkäuern isoliert wird (Smith et al. 2005; Smyth et al. 2009; Bruce et al. 2022). Gleichzeitig ist CC97 von klinischer Relevanz, da weltweit MRSA-CC97 bei humanen klinischen Isolaten detektiert werden können (Diep et al. 2003; Ruimy et al. 2009; Ellington et al. 2008; Spoor et al. 2013). Besonders häufig in Geflügelfleisch wird ST5 isoliert, wobei Studien zeigen, dass dieser Sequenztyp ebenso bei CA-MRSA sowie HA-MRSA-Isolaten nachzuweisen ist (Miko et al. 2013). In einer zusammenfassenden Auswertung, die 127 europäische Studien berücksichtigt, wurde gezeigt, dass in Europa die *spa*-Typen t032, t008 und t002 am häufigsten bei invasiven *S. aureus*-Infektionen nachzuweisen waren (Asadollahi et al. 2018). Gleichzeitig wird insbesondere t002 häufig auf Fleisch, insbesondere Geflügelfleisch nachgewiesen (Vossenkuhl et al. 2014; Krupa et al. 2014).

Bei *S. aureus* einschließlich MRSA erlaubt die Detektion Virulenz-assoziierten Gene mögliche Rückschlüsse über die Herkunft der Isolate zu ziehen. Unter diesen sind zum einen die Virulenz-assoziierten Gene des „Immune Evasion Clusters (IEC)“ bei *S. aureus*-Isolaten zur jeweiligen Herkunftsbestimmung der Isolate zu nennen. Zu dem IEC gehören zum einen das *sak*-Gen, welches für eine Staphylokinase codiert, sowie

das *scn*-Gen (codierend für einen Komplementinhibitor), das *chp*-Gen (codierend für einen Chemotaxis-Inhibitor) und das Enterotoxin A-Gen (*sea*) (siehe 2.4.3.2) (van Wamel et al. 2006; McCarthy 2013). Diese IEC-assoziierten Gene lassen sich vorrangig bei human-adaptierten Isolaten nachweisen (Benito et al. 2014; Hau et al. 2015). Als eine weitere Möglichkeit zur Herkunftsdetermination ist der Nachweis des Virulenzfaktors Panton-Valentine-Leukozidin (PVL), welches von den Genen *lukS-PV* und *lukF-PV* codiert wird, und mit schweren, tiefgehenden Haut- und Weichteilinfektionen in Verbindung steht (Melles et al. 2006). Dieses porenbildende PVL Exotoxin ist zudem von hoher klinischer Relevanz und wird in erster Linie bei CA-MRSA bzw. CA-MSSA nachgewiesen (Bhatta et al. 2016). In Europa ist die PVL-positive klonale Linie CC80 der am häufigsten nachgewiesene CA-MRSA, wohingegen in den USA der in Europa wenig verbreitete PVL-positive ST8/USA300-MRSA vorherrschend ist (Larsen et al. 2008; Goering et al. 2009; Carrel et al. 2015). Des Weiteren gilt der PVL-positive CA-MRSA-ST22 (EMRSA-15) als besonders klinisch relevant, der weltweit in Krankheitsgeschehen involviert ist (Ullah et al. 2022; Monecke et al. 2011; Silva et al. 2022; Faria et al. 2013).

Staphylococcus aureus sind in der Lage, verschiedene Gene zu exprimieren, die für Enterotoxine codieren, zu denen unter anderem die *sea-see* Gene und die *seg-seq* Gene zählen (Balaban und Rasooly 2000). Dabei ist das Enterotoxin A (codiert von dem *sea*-Gen) am häufigsten im Zusammenhang mit lebensmittelbedingten Erkrankungen beschrieben (Argudín et al. 2010; Balaban und Rasooly 2000; Benkerroum 2018). Gleichzeitig können diese Enterotoxine als Superantigene wirken und lebensbedrohliche Infektionen auslösen (Thomas et al. 2007; Xu und McCormick 2012). Neben diesen Enterotoxinen können *S. aureus* weitere Gene beherbergen, die für andere als Superantigen wirkende Toxine codieren. Beispielsweise kann die Pathopotenzen von *S. aureus* durch das *tsst1*-Gen, das für das als Superantigen wirksame Toxin Schock Syndrom Toxin-1 codiert, erhöht sein (Xu und McCormick 2012).

Multiresistenzen gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen sind bei *S. aureus*, insbesondere bei MRSA, weit verbreitet (Peacock und Paterson 2015). Insbesondere MRSA stellen aufgrund ihrer Resistenz gegen nahezu alle antimikrobiellen β -Laktam-Wirkstoffe, einschließlich der Cephalosporine der dritten und vierten Generation, ein besonderes Problem für die erfolgreiche Behandlung von Infektionen mit diesem Erreger dar (Lade et al. 2022; Stefani und Goglio 2010). Zusätzlich weisen MRSA

häufig ebenso Resistenzen gegenüber anderen antimikrobiellen Wirkstoffen auf (Vestergaard et al. 2019). In einer Auswertung innerhalb der EU/EEA-Mitgliedstaaten aus dem Jahr 2021 wurden insgesamt 60.432 invasive *S. aureus*-Isolate untersucht, von denen sich ein Großteil (50.016 Isolate, 82,8%) als empfindlich gegenüber den getesteten antimikrobiellen Wirkstoffen erwies (ECDC 2023). Gleichzeitig konnte jedoch unter den MRSA-Isolaten die Fluorchinolonresistenz als häufigste Co-Resistenz identifiziert werden. Dabei ließen sich insgesamt 5133 (8,5%) Isolate als MRSA mit einer simultanen Resistenz gegenüber Fluorchinolonen identifizieren und 309 Isolate (0,5%) als MRSA mit einer Co-Resistenz gegenüber Fluorchinolonen und Rifampicin (ECDC 2023).

2.5 Einfluss von Lebensmittelimporten in die EU auf eine mögliche Verbreitung genotypischer Varianten von lebensmittelassoziierten Pathogenen

In der Literatur ist beschrieben, dass legale und illegale Lebensmittelimporte zur Verbreitung neuer oder in der EU für gewöhnlich nicht vorkommender Genotypen beitragen können (Müller et al. 2016; Müller et al. 2018b; Nagy et al. 2015; Rodríguez-Lázaro et al. 2015; Jansen et al. 2019). Zudem ist der Nachweis von Genotypen, die häufig an Krankheitsausbrüchen in der EU beteiligt sind, in importierten Lebensmitteln beschrieben (Rychli et al. 2018; Nagy et al. 2015; Jansen et al. 2019; Müller et al. 2018a).

Derzeit ist über die Verbreitung bestimmter lebensmittelassoziiierter bakterieller Pathogene wie beispielsweise STEC in legal und illegal importierten Lebensmitteln wenig bekannt. Insgesamt deuten molekulare Analysen von STEC-Isolaten, die aus illegal importierten Lebensmitteln tierischen Ursprungs isoliert wurden, auf eine geringe Humanpathogenität hin (Nagy et al. 2015; Jansen et al. 2019). Dennoch ist der Nachweis pathogener Serovaren wie O26, einer der häufigsten Serogruppen für STEC-bedingte Krankheitsausbrüche in der EU, in illegal eingeführten Lebensmitteln tierischen Ursprungs beschrieben (Nagy et al. 2015; EFSA 2022a). Ebenso konnte in einer Studie gezeigt werden, dass bisher nicht beschriebene STEC-Sequenztypen in illegal importierten Lebensmitteln tierischen Ursprungs nachweisbar waren (Nagy et al. 2015).

Des Weiteren ist in der Literatur dokumentiert, dass in illegal importierten Lebensmitteln tierischen Ursprungs zwar ein Großteil der *L. monocytogenes*-Isolate (42%) der Linie II zuzuordnen ist, jedoch fast ein Drittel (26%) der klinisch relevanteren Linie I angehören (Jansen et al. 2019; Maury et al. 2016; Orsi et al. 2011). Unter

diesen Isolaten wurden hauptsächlich die in der EU am häufigsten in Lebensmitteln vorkommenden Sequenztypen ST2, ST9 und ST121 nachgewiesen, wobei einige Isolate den Sequenztypen ST8 und ST87 zugeordnet waren, die bereits mit lebensmittelassoziierten Listerioseausbrüchen in der EU assoziiert wurden/ waren (Rychli et al. 2018; EFSA 2019b; Schoder et al. 2015; Rodríguez-Lázaro et al. 2015). Bei der Charakterisierung von *Salmonella enterica*-Isolaten aus illegal eingeführten Lebensmitteln tierischen Ursprungs wurde zuvor festgestellt, dass insbesondere in Fleisch- und Fleischerzeugnissen die häufig mit humanen Krankheitsfällen assoziierten Serovare wie Enteritidis und Typhimurium nachgewiesen wurden, während in illegal eingeführten Milchprodukten diese Serovare seltener nachgewiesen wurden (Jansen et al. 2019; Schoder et al. 2015; Beutlich et al. 2015; Rodríguez-Lázaro et al. 2015). Neben dem Nachweis von *Salmonella*-Serovaren, die nach der EFSA zu den 20 am häufigsten für humane Salmonellose-Fälle in der EU verantwortlichen Serovaren gehören, wie *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* sowie *S. Infantis*, konnten in legal und illegal importierten Geflügelfleisch auch innerhalb der EU weniger weit verbreitete Serovare wie *S. Heidelberg* nachgewiesen werden (Müller et al. 2018a). *S. Heidelberg* wird häufig auf Geflügelfleisch nachgewiesen und ist in den USA das 12.-häufigste Serovar, welches im Zusammenhang mit humanen Salmonellose-Fällen dokumentiert ist (Etter et al. 2019). Dies ist insofern von Bedeutung, als die Verbreitung klinisch relevanter, aber in der EU bisher kaum am Krankheitsgeschehen beteiligter Serovare durch die Einfuhr von Lebensmitteln tierischen Ursprungs möglich ist.

Gleichzeitig wurde in einer Studie, in der unter anderem ESBL/AmpC-bildende *E. coli*-Isolate aus legal aus Brasilien importiertem Geflügelfleisch untersucht wurden, ein EPEC-Isolat nachgewiesen, welches als atypischer EPEC identifiziert werden konnte (Müller et al. 2018b). Dieser Nachweis ist insofern relevant, da atypische EPEC mit Infektionen mit langanhaltender (> 14 Tage) Diarrhoe assoziiert sind und bei *E. coli*-bedingten Infektionen von Kindern weltweit eine höhere Prävalenz als typische EPEC zeigen (Ochoa und Contreras 2011; Monaghan et al. 2013; Hernandez et al. 2009). Es ist bereits bekannt, dass Tiere als Reservoir für atypische EPEC dienen können, während typische EPEC hauptsächlich beim Menschen vorkommen und eine Übertragung vom Tier bzw. tierischen Produkten auf den Menschen nicht ausgeschlossen werden kann (Comery et al. 2013; Monaghan et al. 2013). Zudem konnte bei der Mehrheit dieser Isolate eine Vielzahl von Virulenzfaktoren-codierender

Genen wie *astA* und *iss* nachgewiesen werden, wobei vor allem Letzteres häufig bei ExPEC nachgewiesen wird (Müller et al. 2018b; Sarowska et al. 2019; Biran et al. 2021).

Molekulare Untersuchungen von *Staphylococcus aureus* aus legal und illegal importierten Lebensmitteln tierischen Ursprungs ergaben eine hohe Heterogenität innerhalb der Isolate sowie den Nachweis bisher nicht beschriebener Sequenztypen (Müller et al. 2016; Rodríguez-Lázaro et al. 2017). Zudem ist der Nachweis von MRSA in illegal importierten Lebensmitteln tierischer Herkunft beschrieben, bei denen Genotypen mit zoonotischer Relevanz wie ST1/t127 isoliert werden konnten (Müller et al. 2016). Bei der Mehrzahl der Isolate konnten Gene des IEC-Clusters nachgewiesen werden. Dabei sind die Gene des IEC-Clusters primär bei humanadaptierten *S. aureus* zu finden, was auf eine Kontamination humanen Ursprungs schließen lässt (Müller et al. 2016; Benito et al. 2014; Hau et al. 2015). Dies kann in Verbindung mit Hygienemängeln während der Verarbeitung, der Verpackung oder des Transportes der illegal importierten Lebensmittel stehen, was in der Literatur bereits als häufig vorkommende Problematik bei illegal eingeführten Lebensmittel beschrieben ist (Falk et al., 2013).

Darüber hinaus konnte in einer Vielzahl der aus illegal importierten Lebensmitteln tierischen Ursprungs isolierten MRSA-Isolate Gene, die für den Virulenzfaktor Panton-Valentine-Leukocidin codieren, nachgewiesen werden (Rodríguez-Lázaro et al. 2017; Müller et al. 2016). Ebenso ließen sich bei der Mehrzahl der Isolate Gene nachweisen, die für hitzestabile Staphylokokken-Enterotoxine codieren, wodurch die Isolate als enterotoxisch eingestuft wurden, was das pathogene Potential der aus importierten Lebensmitteln tierischen Ursprungs gewonnenen Isolate verdeutlicht (Rodríguez-Lázaro et al. 2017; Müller et al. 2016). Da nicht vollständig geklärt ist, wie groß der Einfluss des globalen Handels bzw. des internationalen Reiseverkehrs auf die Verbreitung bisher in der EU nicht verbreiteter jedoch klinisch relevanter Genotypen ist, sind weitere molekulare Charakterisierungen von Bakterienisolaten, gewonnen aus legal und illegal eingeführten Lebensmitteln tierischer Herkunft, von hoher Bedeutung.

2.6 Nachweis von antibiotikaresistenten Bakterien von Lebensmitteln tierischer Herkunft

2.6.1 Monitoring von antibiotikaresistenten Bakterien in Lebensmitteln tierischer Herkunft innerhalb der EU

Weltweit konnten im Jahr 2019 schätzungsweise rund 1,27 Millionen Todesfälle auf Infektionen mit multiresistenten Bakterien zurückgeführt werden (Murray, Christopher J L et al. 2022). In der EU allein lassen sich Schätzungen zu Folge jährlich rund 670.000 Erkrankungsfälle auf Infektionen mit antibiotikaresistenten Bakterien zurückführen und etwa 33.000 Todesfälle stehen in einem direkten Kontext mit diesen (ECDC 2022). Dabei stellen Infektionen mit Bakterien mit Resistenzen gegen Beta-Laktam-Antibiotika, wie Cephalosporinen der dritten oder vierten Generation, so wie bei ESBL-produzierenden Enterobacterales und MRSA aufgrund eines eingeschränkten Therapiespektrums, der höheren Behandlungskosten sowie einer erhöhten Hospitalisierungs- und Sterberate eine große Belastung für das Gesundheitssystem dar (Kraker et al. 2011; Esteve-Palau et al. 2015; Serra-Burriel et al. 2020; CDC 2019a).

Um die Verbreitung von Antibiotikaresistenzen auf EU-Ebene bei Bakterien von lebensmittelliefernden Tieren bzw. in Fleisch von diesen zu evaluieren, ist gemäß des Durchführungsbeschlusses (EU) Nr. 2020/1729 ein verpflichtendes, harmonisiertes Monitoring von 2021-2027 mit einem festgelegten Bakterienspektrum in den EU-Mitgliedsstaaten durchzuführen. Dieses Antibiotikaresistenzmonitoring gilt für die Überwachung und Meldung von Antibiotikaresistenzen von *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, kommensalen *E. coli*, *Salmonella* spp., sowie ESBL-, AmpC-, und Carbapenemasen-produzierenden *Salmonella* spp. und *E. coli*. Dabei dienen antibiotikaresistente kommensale *E. coli* als Indikatorkeime, um Reservoirs von resistenten Bakterien entlang der Lebensmittelkette aufzuspüren und um potenzielle Übertragungswege zwischen Menschen und Nutztieren zu evaluieren (Szmolka und Nagy 2013; EFSA und ECDC 2023). Im Rahmen des Monitorings erfolgen ergänzende Analysen auf das Vorkommen von MRSA in lebensmittelliefernden Tieren sowie auf Fleisch von diesen. Das Spektrum der aufgrund dieses Durchführungsbeschlusses geprüften antimikrobiellen Wirkstoffe umfasst Wirkstoffe, die häufig zur Behandlung von Infektionen bei Nutztieren eingesetzt werden, wie Ampicillin, Sulfamethoxazol und Tetrazyklin, sowie weitere Antibiotika, die für die öffentliche Gesundheit von Bedeutung sind wie Fluorchinolone wie z.B. Ciprofloxacin,

Colistin als Vertreter der Polymyxine, sowie Cephalosporine der dritten und vierten Generation (EFSA und Europäisches Zentrum für die Prävention und die Kontrolle von Krankheiten; engl.: European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) 2023).

Darüber hinaus wurde die Untersuchung von *E. coli*-Isolaten aus frischem Schweine- und Rindfleisch, das in die EU eingeführt wurde, in das Antibiotikaresistenz-Monitoring der EFSA und des ECDC 2021 aufgenommen, um Hinweise auf das Vorkommen resistenter *E. coli*-Isolate in Lebensmitteln tierischen Ursprungs, die in die EU eingeführt wurden, zu erhalten (EFSA und ECDC, 2023).

Die Ergebnisse dieses harmonisierten Antibiotikaresistenzmonitorings werden jährlich in einem Bericht der EFSA und des ECDC veröffentlicht (EFSA und ECDC 2023). Insgesamt zeichnen die Daten des Antibiotikaresistenzmonitorings ein heterogenes Bild an Resistenzmustern bzw. Nachweisraten an resistenten bakteriellen Pathogenen ab. So zeigen die Auswertungen innerhalb der EU für das Jahr 2021 beispielsweise, dass in den letzten Jahren ein statistisch signifikanter Rückgang der Kontaminationsraten von Geflügelfleisch mit ESBL-produzierenden *E. coli* in insgesamt 17 EU-Mitgliedsstaaten zu verzeichnen war, jedoch die Nachweisraten von ESBL-bildenden *E. coli* in Rindfleisch konstant geblieben sind (EFSA und ECDC 2023). Des Weiteren gehen aus den Daten des Antibiotikaresistenzmonitorings aus den Jahren 2020 und 2021 hohe Nachweisraten von *Salmonella* spp.-Isolaten mit Resistenz gegen Ciprofloxacin hervor (EFSA und ECDC 2023). In den Jahren 2013-2021 ließ sich bereits insgesamt ein Anstieg der Resistenzen bei Ciprofloxacin-resistenten humanen *Salmonella* spp.-Isolaten in neun EU-Mitgliedsstaaten beobachten sowie eine hohe Prävalenz an nicht-typhösen multiresistenten humanen *Salmonella* spp.-Isolaten feststellen, wobei unter diesen vorherrschend das monophasische *S. Typhimurium*-Serovar isoliert werden konnte (EFSA und ECDC 2023; EFSA 2022a). Insgesamt ließ sich jedoch nur bei <1,0% der Isolate von lebensmittelliefernden Tieren eine Co-Resistenz gegenüber Fluorchinolonen und Cephalosporinen der dritten Generation nachweisen (EFSA 2024a). Gleichzeitig geht aus dem Bericht der EFSA im Jahr 2022 hervor, dass die Co-Resistenz bei einzelnen Serovaren, insbesondere bei *S. Kentucky* (21,1%) bei aus Masthähnchen isolierten Isolaten hoch lag (EFSA 2024a).

Bezogen auf die Nachweisraten von MRSA-positiven Fleischproben sind innerhalb der EU-Mitgliedsstaaten deutliche Schwankungen zu verzeichnen mit niedrigen

Kontaminationsraten von Rindfleisch (3,8%) bis hin zu deutlich höheren Nachweisraten in Truthahnfleisch (37,5%) (2020). Als besorgniserregend stuft die EFSA insbesondere den Nachweis von Resistenzen gegenüber Wirkstoffen ein, die bei der Behandlung humaner MRSA-Infektionen derzeit bevorzugt eingesetzt werden. Dazu zählen beispielsweise der Nachweis eines Vancomycin-resistenten MRSA-Stammes isoliert aus Schaffleisch in Deutschland sowie von Rifampicin-resistenten Isolaten isoliert aus Rindfleisch in Belgien (EFSA und ECDC 2023).

2.6.2 Antibiotikaresistenzen in legal und illegal importierten Lebensmitteln tierischer Herkunft

In der Literatur ist beschrieben, dass legal sowie illegal importierte Lebensmittel als Vektoren für antibiotikaresistente Bakterien dienen können (Jansen et al. 2019; Müller et al. 2016; Müller et al. 2018b; Nagy et al. 2015; Rodríguez-Lázaro et al. 2017).

Im Rahmen des Antibiotikaresistenzmonitorings auf EU-Ebene wurden insgesamt 110 *E. coli*-Isolate, gewonnen aus importiertem Rindfleisch aus sechs EU-Mitgliedstaaten, untersucht, wobei es sich bei einem Großteil ($n = 79$, 71,8%) um Rindfleisch, welches in die Niederlande importiert wurde, handelte (EFSA und ECDC 2023). Bei den aus Rindfleisch isolierten *E. coli*-Isolaten konnten am häufigsten Resistenzen gegenüber Tetrazyklinen (10,9%), Sulfamethoxazol (5,4%), Ampicillin (4,6%) und Trimethoprim (2,7%) nachgewiesen werden. Zusätzlich wurden insgesamt 13 *E. coli*-Isolate, isoliert aus in vier EU-Mitgliedsstaaten importiertem Schweinefleisch, untersucht. Insgesamt konnten in den importierten Rindfleischproben 3,6% und in den Schweinefleischproben 15,4% der *E. coli*-Isolate als multiresistent, sprich mit einer Resistenz gegenüber drei oder mehr antimikrobiellen Wirkstoffgruppen, klassifiziert werden (EFSA und ECDC 2023). Die Nachweisraten von ESBL-produzierenden *E. coli* in den importierten Schweine- und Rindfleischproben lag hingegen unter 1% (EFSA und ECDC 2023).

Weitere Studien dokumentieren unterschiedlich hohe Nachweisraten ESBL-produzierender *E. coli*. So wurden in zwei Studien, in denen aus Südamerika in die EU importiertes Geflügelfleisch untersucht wurde, in 6,4% bzw. 95% der Proben ESBL-produzierende *E. coli* nachgewiesen (Egervärn et al. 2014; Jansen et al. 2018).

Molekularbiologische Untersuchungen an bakteriellen Isolaten, die aus legal und illegal importierten Lebensmitteln tierischen Ursprungs gewonnen wurden, zeigen hingegen vorrangig den Nachweis von ESBL-produzierenden Enterobacterales mit β -

Laktamase-Subtypen, die in der EU weniger häufig beschrieben sind (Jansen et al. 2019; Müller et al. 2016). Des Weiteren zeigten frühere Studien an MRSA, die aus legal und illegal importierten Lebensmitteln tierischer Herkunft isoliert wurden, eine große Heterogenität an Resistenzdeterminanten sowie atypischen Resistenzmustern (Müller et al. 2016; Rodríguez-Lázaro et al. 2017).

Über die Verbreitung von antibiotikaresistenten *Salmonella* spp. und *L. monocytogenes*-Isolaten aus illegal eingeführten Lebensmitteln tierischen Ursprungs ist bisher nur wenig bekannt. Rodríguez-Lázaro et al. (2015) berichteten, dass 10% der *L. monocytogenes*-Isolate, gewonnen aus illegal importierten Lebensmitteln tierischer Herkunft, als multiresistent klassifiziert wurden, wohingegen keines der untersuchten *Salmonella* spp.-Isolate als multiresistent eingestuft wurde (Rodríguez-Lázaro et al. 2015). In einer anderen Studie von Müller et al. (2018a) wurde ein *Salmonella* Infantis-Isolat, isoliert aus illegal importiertem Geflügelfleisch aus Ägypten, mit einer Resistenz gegenüber fünf Wirkstoffklassen nachgewiesen. Somit ist eine weitere Verbreitung von multiresistenten Bakterien über den internationalen Reiseverkehr nicht auszuschließen (EFSA und ECDC 2023).

3. Zielstellung der Arbeit

Der Import von tierischen Lebensmitteln aus Drittländern spielt für die EU eine große Rolle. Insbesondere Rindfleisch wird jährlich in großen Mengen in die EU eingeführt. Ebenso werden illegal Lebensmittel tierischer Herkunft über den internationalen Reiseverkehr eingeführt. Über den mikrobiologischen Status von Lebensmitteln tierischen Ursprungs, die in die EU importiert werden, sowie über die molekularen Eigenschaften von pathogenen zoonotischen Bakterienisolaten, die aus in die EU importierten tierischen Erzeugnissen gewonnen wurden, ist bisher wenig bekannt.

Ein Ziel der Arbeit war es, eine Aussage über den mikrobiologischen Status von aus Drittländern in die EU importiertem Rindfleisch sowie von illegal eingeführten Lebensmitteln tierischer Herkunft anhand von jeweils $n = 100$ Proben treffen zu können. Die Proben wurden auf Hygieneindikator-Keime (aerobe mesophile Gesamtkeimzahl, *Enterobacteriaceae* und *Escherichia coli*) sowie auf die Anwesenheit relevanter lebensmittelassoziierter Pathogene wie Shigatoxin-produzierende *E. coli* (STEC), *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* und *Staphylococcus aureus* untersucht. Als Auswertungsgrundlage dienten die mikrobiologischen Grenzwerte auf EU-Ebene bzw. die Warnwerte der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM). Zusätzlich erfolgte ein Screening auf das Vorkommen von ESBL/AmpC-produzierenden Enterobacterales. Die illegal importierten Lebensmittel wurde zudem auf die Anwesenheit von Methicillin-resistenten *S. aureus* (MRSA) sowie antibiotikaresistenten kommensalen *E. coli* untersucht. Zudem wurden die Ganzgenomsequenzen von drei STEC-Isolaten, elf *S. aureus*-Isolaten sowie drei *L. monocytogenes*-Isolaten analysiert. Zusätzlich erfolgte eine Serotypisierung der *Salmonella enterica*-Isolate. Um eine Aussage über das Vorkommen von Antibiotikaresistenzen zu treffen, wurden zudem antimikrobielle Empfindlichkeitstestungen durchgeführt und die Isolate auf das Vorkommen von Resistenzgenen untersucht.

Ein besonderer Fokus der Arbeit lag auf der molekularen Charakterisierung der gewonnen bakteriellen Isolate einschließlich des Nachweises Virulenz-assoziiierter Faktoren. Ziel war es, mögliche gesundheitliche Risiken für Verbraucher ausgehend von importierten Lebensmitteln tierischer Herkunft zu identifizieren und einen Beitrag zur Klärung der Frage zu leisten, inwieweit Lebensmittelimporte zur Verbreitung pathogener, virulenter und/oder multiresistenter Genotypen beitragen können, die normalerweise in der EU nicht oder nur selten vorkommen.

4. Publikationen

4.1 Publikation 1

Nicola Rinn, Ann-Sophie Braun, Anja Müller, Katharina Wadepohl, Bettina Gerulat, Franziska Kumm, Min Yue, Corinna Kehrenberg (2024):

Microbiological quality of raw beef imported into the European Union from third countries

Food Control 160. (2024): 110358. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2024.110358>

Autorenbeteiligung:

Idee, Konzeption und Methodik: CK, A.-S. B, AM, FK

Durchführung der Experimente: **NR**, KW

Datenauswertung und Analyse: **NR**, CK, A.-S. B, AM, FK, MY,

Manuskripterstellung oder kritische Durchsicht: **NR**, CK, A.-S. B, AM, FK, KW, BG, MY

Microbiological quality of raw beef imported into the European Union from third countries

Nicola Rinn^a, Ann-Sophie Braun^a, Anja Müller^a, Katharina Wadepohl^b, Bettina Gerulat^b, Franziska Kumm^a, Min Yue^{c,d}, Corinna Kehrenberg^{a,*}

^aInstitute for Veterinary Food Science, Faculty of Veterinary Medicine, Justus Liebig University Giessen, Frankfurter Str. 92, 35392, Giessen, Germany

^bBorder Control Post, Hamburg Harbour, Ministry for Justice and Consumer Protection, Reiherdamm 18, 20457, Hamburg, Germany

^cInstitute of Preventive Veterinary Science and Department of Veterinary Medicine, Zhejiang University College of Animal Sciences, Hangzhou, 310058, China

^dHainan Institute of Zhejiang University, Sanya, 572025, China

Keywords: Bovine meat, Legal import, Third countries, Foodborne pathogens, STEC
European Union

*Corresponding author

E-mail: Corinna.Kehrenberg@vetmed.uni-giessen.de (C. Kehrenberg).

Abstract

Raw beef imported into the European Union (EU) from third countries must fulfill the same legal requirements as products from EU member states. Recently, the microbiological quality of 100 raw beef samples imported from third countries into the EU was investigated. Samples were quantitatively analyzed according to DIN ISO standard methods for aerobic mesophilic colony counts (ACC), counts of *Enterobacteriaceae*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, coagulase-positive staphylococci and qualitatively for *L. monocytogenes* and *Salmonella* spp. Samples were also screened for the presence of extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Enterobacteriaceae* and Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC). Detected STEC isolates were subjected to whole genome sequencing. An *E. coli* prevalence of 3 % was detected, with one sample exceeding the critical value of the German Society for Hygiene and Microbiology (DGHM). Coagulase-positive staphylococci were found in one sample, but at a level below the DGHM guidance value. In three samples, *L. monocytogenes* were detected quantitatively, but none of these surpassed the critical value. *Salmonella* spp. were not detected, but *Enterobacteriaceae* were present in 83 % of the samples, of which 40 % surpassed the critical value. Combined with detected high values of ACC, this may indicate hygiene deficiencies. Additionally, STEC-screening showed a prevalence of 2 % and both STEC isolates harbored *stx1* and *stx2*. Overall, the occurrence of foodborne pathogens in the samples analyzed was low, but DGHM requirements for raw beef were not completely fulfilled. In combination with the detection of STEC, this may represent a potential health hazard for consumers.

1. Introduction

The import of food, especially products of animal origin, is of immense importance for the European Union (EU). The EU is the world's largest importer of food products after the United States and China (EC, 2021a). In 2021, a total of 283,729 tons of beef were imported into the EU from third countries, representing an increase of 26 % compared to the year 2020. The main suppliers of beef were Brazil (28.8 %), Uruguay (28.3 %) and Argentina (26.7 %) (EC, 2021b). Meat imported into the EU must meet the same legal requirements as products from EU member states to ensure food hygiene standards in accordance with Regulation (EC) No 852/2004, Regulation (EC) No 853/2004, and microbiological criteria according to Regulation (EC) No 2073/2005 (EC, 2004a; 2004b, 2005). In addition, Regulation (EU) 2017/625 dictates that imported meat must enter through an approved Border Control Post supervised by an official veterinarian (EC, 2017). Then, according to Regulation (EU) 2019/2130, each consignment containing beef imported into the EU must be subjected to documentary checks, identity checks and physical checks, with the latter being mandatory for 15 % of consignments (EC, 2019). Microbiological analyses of imports are carried out on a risk-oriented basis as part of the multi-annual national control plan (MANCP), or, in cases of suspicion, on the basis of EU protective measures or the rapid alert system for food and feed (RASFF). Consignments that do not comply with the legal requirements are rejected at the EU borders. Due to increasing international trade in products of animal origin, the global spread of foodborne pathogens is a growing concern. It has already been shown that imported meat can serve as a vector for producing *Escherichia (E.) coli* (STEC) and *Listeria (L.) monocytogenes* (Jansen et al., 2016). Beef, in particular, is occasionally consumed raw or not fully heated. Therefore, the risk of ingesting viable pathogens either directly or indirectly through cross-contamination increases. In this context, *Salmonella* spp., *L. monocytogenes*, STEC and *Staphylococcus* spp., most notably *Staphylococcus aureus*, are some of the most important food-associated pathogens and among the major public health hazards in the EU (EFSA, 2022). In particular, STEC is primarily associated with contaminated raw beef in the EU, and it is estimated that over 52 % of STEC outbreaks are associated with bovine products (Castro et al., 2019; Wang & Salazar, 2016). In recent years, the detection of STEC has resulted in recurring border rejections of red meat consignments intended for the European market (EC, 2023; Jansen et al., 2016). Notifications in the RASFF regarding the presence of STEC in meat are predominantly

associated with products originating from Argentina and Brazil; this is not unexpected given the overall large volumes of imports from these two countries (Kononiuk et al., 2017). In addition, imported meat can serve as a vehicle for antimicrobial resistant bacteria such as extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Enterobacteriaceae* (Egervärn et al., 2014; Jansen et al., 2018; Nagy et al., 2015). Infections with these resistant bacteria, especially in the case of multidrug resistance, pose a major human health concern since initial treatment may be ineffective and overall therapy options can be severely limited (Bassetti et al., 2019; Esteve-Palau et al., 2015). While the microbiological quality and safety of imported pork and poultry meat into the EU have been described in a comprehensive study by Jansen et al. (2018), data regarding the microbiological quality of raw beef imported into the EU are very limited. Merely one previous study by Stella et al. (2013) performed a microbiological analysis focused on raw beef imported from Argentina to Italy. The aim of our project was therefore to obtain current data regarding the microbiological quality of raw beef imported into the EU from different third countries by investigating the presence of foodborne pathogens, bacterial quality criteria as well as the occurrence of ESBL-producing *Enterobacteriaceae*.

2. Material and methods

2.1. Sample collection and preparation

Samples of raw beef imported from third countries from November 2021 to May 2022 were collected at the Border Control Post of the Hamburg Harbour, Germany. In total, 100 raw beef samples imported from Brazil (n = 53), Argentina (n = 33), Uruguay (n = 12) and Paraguay (n = 2) were included in this study (Table 1). Only samples from fresh raw beef without sensory irregularities, and no further processing (e.g. seasoned, marinated or with additives), were collected. During the routine physical checks, a minimum of 100 g per individual sample was taken aseptically by authorized personnel at the Border Control Post laboratory. Samples were sealed in individual vacuum-wrapped plastic bags and stored at 2–4 °C. Within 24 h, samples were sent in a cold box with freeze packs to the Institute for Veterinary Food Science, Giessen, Germany. Upon arrival, the samples were checked for their temperature (2–4 °C) and placed in a refrigerator to maintain the cold chain. The sensory analysis of samples included a visual inspection for color or texture irregularities as well as testing for odor deviations.

Within the next 48 h, the pH value of the beef samples was measured according to DIN ISO 2917:1999 and they were subsequently prepared for microbiological analysis according to DIN ISO 6887–1:2017 and DIN ISO 6887–2:2017 (ISO, 1999; 2017a; 2017b).

2.2. Quantitative microbiological analyses

A quantitative analysis was performed for aerobic mesophilic colony count (ACC) according to DIN ISO 4833–2:2013, for *Enterobacteriaceae* according to DIN ISO 10164–1:2019–06, and for β -glucuronidase-positive *E. coli* according to the DIN ISO 16649–2:2001 standards protocols (ISO, 2001; 2013a; 2019a). The detection of coagulase-positive staphylococci was performed according to DIN ISO 6888–1:2019–06 (ISO, 2019b). From samples testing positive for coagulase-positive staphylococci, colonies were subcultured overnight on plate count agar (PC) (Merck, Darmstadt, Germany). Subsequently, DNA was isolated from the overnight cultures using the DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. To identify *S. aureus*, a specific PCR assay targeting the *eap* gene was performed as previously described (Hussain et al., 2008). In order to obtain more data on the listeria load of the samples, quantitative testing of *L. monocytogenes* was added starting with the second half of the samples (n = 50) in accordance with DIN ISO 11290–2:2017 (ISO, 2017c). As Regulation (EC) No 2073/2005 does not provide limits for raw beef at consumer level, the microbiological results were evaluated according to the guidance and critical values defined by the German Society for Hygiene and Microbiology (DGHM) for raw, seasoned or marinated beef (packed or unpacked) at consumer level, as shown in Table 2 (DGHM, 2021; EC, 2005). Samples that were below or equal to the guidance values were assessed as microbiologically satisfactory, those between the guidance and the critical value were categorized as acceptable and those that surpassed the critical value were evaluated as unsatisfactory with regard to the examined microbiological parameters (DGHM, 2018).

2.3. Qualitative microbiological analyses

The presence of *L. monocytogenes* was qualitatively determined for all samples according to DIN ISO 11290–1:2017, while the detection of *Salmonella* spp. was performed according to DIN ISO 6579–1:2017 (ISO, 2017d; 2017e). For the subculture

to detect salmonellae, brilliant-green phenol-red lactose sucrose agar (BPLS) plates (Merck, Darmstadt, Germany) were used as the second selective culture medium, in addition to the obligatory selective culture medium xylose lysine desoxycholate agar (XLD) (Merck, Darmstadt, Germany). Presumptive *Salmonella* spp. colonies were confirmed by agglutination with a *Salmonella*-specific antiserum and by their biochemical properties using API20E™ (bioMérieux, Nürtingen, Germany).

2.3.1. Isolation and whole genome sequencing of Shiga toxin-producing *E. coli*

The detection of Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) was based on DIN ISO 13136:2013–04 with minor modifications: a homogenization of 25 g of each sample with 225 ml modified tryptic soy broth (Oxoid Limited, Basingstoke, UK) without antibiotic additives using a Stomacher® blender (Interscience, Saint Nom La Bret`eche France) and subsequent incubation at 37° C for 24 h (ISO, 2013b; Vimont et al., 2007). After this enrichment step, one 10 µl loop was streaked onto CHROMagar STEC™ (Mast Diagnostica GmbH, Reinfeld, Germany) and the plates were incubated at 37 °C for 24 h (Hirvonen et al., 2012). A second 10 µl loop was streaked onto trypton bile x-glucuronide agar (TBX) (Oxoid Limited), which was incubated at 44° C for 24 h. Based on colony morphology and color formation (CHROMagar STEC™ = mauve, TBX = blue-green or colorless), five individual colonies of presumptive STEC (if present) were picked from each agar plate, subcultured onto plate count agar (PC) (Merck) and incubated at 37° C for 24 h. In order to confirm presumptive STEC, DNA was extracted from these colonies using the DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN) and the DNA was subjected to PCR analysis to investigate the presence of Shiga toxin genes (*stx1* and *stx2*) and the *eae* gene (Karch & Meyer, 1989; Schmidt et al., 1994). Only a single *stx1*-and/or *stx2*-positive colony from each sample was included in further investigations. The isolates were then confirmed as *E. coli* by species-specific PCR targeting the *gadA* gene as previously described (Doumith et al., 2012; Müller et al., 2021). Subsequently, confirmed STEC were subjected to whole genome sequencing (WGS) using the sequencing service and automated annotation service provided by MicrobesNG (MicrobesNG, Birmingham, UK). In order to determine the multilocus sequence type (MLST) and predicted serotype of the isolates, the genome sequences were uploaded to the Enterobase *Escherichia/Shigella* database (<https://enterobase.warwick.ac.uk>, last accessed on 18 August 2022) where they are available under accession numbers traces-0boqadF (Isolate Ha28) and traces-0rPxUql

(Isolate Ha91). Further, the genome sequences obtained have been deposited in the GenBank database under accession numbers JAUALE000000000 (Ha28) and JAUALD000000000 (Ha91). For detection of virulence-associated factors and resistance genes, Virulence Finder 2.0 (<https://cge.food.dtu.dk/services/VirulenceFinder/>, last accessed on 18 August 2022) and ResFinder 4.1 (<https://cge.food.dtu.dk/services/ResFinder/>, last accessed on 18 August 2022) were used, respectively (Bortolaia et al., 2020; Joensen et al., 2014).

2.3.2. ESBL-screening

To obtain information on the presence of ESBL producers in the samples, ESBL-screening was implemented for the remaining 50 raw beef samples. Samples were tested for the presence of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* according to the protocol of the National Food Institute of Denmark for fresh meat with minor modifications (Hasman et al., 2015). Pre-enrichment was performed by incubating 25 g of each sample in buffered peptone water (Merck) in sterile Stomacher® blender bags (Interscience) at 37 °C for 24 h. One loopful broth was then streaked onto MacConkey agar plates containing 1 mg/l of cefotaxime (Cayman Chemical Company, Michigan, USA), which were again incubated for 24 h at 37 °C. Presumptive ESBL-producing *Enterobacteriaceae* were subjected to an ESBL-confirmatory test by disk diffusion following CLSI standards (CLSI, 2020). The panel of antibiotics for the confirmatory test included ceftazidime (CAZ, 30 µg) (Oxoid Limited), ceftazidime-clavulanate (CAZ/CA, 30/10 µg) (Becton Dickinson, New Jersey, USA) cefotaxime (CTX, 30 µg) (Oxoid Limited), and cefotaxime-clavulanate (CTX/CA, 30/10 µg) (Becton Dickinson). The isolates were regarded as confirmed ESBL-producers if the growth inhibition zone around the CTX or CAZ disks in combination with CA was ≥5 mm larger in diameter compared to CTX or CAZ alone. As positive and negative control, *Klebsiella pneumoniae* ATCC® 700603 and *E. coli* ATCC® 25922 were used, respectively.

2.4. Statistical analysis

Statistical analyses were performed using the SAS® 9.4 statistical software (Statistical Analysis System Institute Inc., Cary, NC, USA). The results of the quantitative microbiological analyses were transformed into log₁₀ scale base before evaluation. The normality of the values was tested by Shapiro-Wilk test. The non-parametric Kruskal-

Wallis test was used to investigate the association between the origin of the isolates and the detected counts of ACC and *Enterobacteriaceae*. To test a correlation between high levels of contamination with ACC and *Enterobacteriaceae* in the same sample, the Spearman's rank correlation test was used ($p < 0.05$). Isolates originating from Paraguay were excluded from the statistical analysis because of the small sample size ($n = 2$). According to DIN ISO 7218:2014–09 the detection limits for *E. coli*, *L. monocytogenes* and coagulase-positive staphylococci are 1 log₁₀ colony-forming units (cfu)/g while the detection limit for *Enterobacteriaceae* is 2 log₁₀ cfu/g according to DIN ISO 10164–1:2019–06 (ISO, 2014; 2019a). As specified in both DIN ISO norms for results lower than the limit of detection, half the values of the detection limit were used for calculation (ISO, 2014; 2019a).

3. Results

3.1. Analyses of pH values

The pH values of the majority of the samples ($n = 90$), were in the expected range for raw beef of pH 5.4–6.2 with a median pH value of 5.59 (Ferguson et al., 2001; Vidal Junior et al., 2020). In the remaining 10 % of the samples, pH values were below 5.4 (5.11–5.36).

3.2. Quantitative analyses of the microbiological quality

The values of ACC of all raw beef samples ($n = 100$) examined in this study ranged from 4.18 log₁₀ cfu/g to 10.04 log₁₀ cfu/g, with a median value of 8.06 log₁₀ cfu/g. Taking into account the origin of the samples, the ACC values of the samples from Brazil ($n = 53$) ranged from 4.18 to 10.04 log₁₀ cfu/g (median: 8.04 log₁₀ cfu/g), while those from Argentina ($n = 33$) ranged from 5.15 to 9.63 log₁₀ cfu/g (median: 7.95 log₁₀ cfu/g) and those from Uruguay ranged from 6.89 to 8.99 log₁₀ cfu/ g (median: 8.06 log₁₀ cfu/g). There was no statistically significant difference in the ACC counts ($p = 0.394$) when considering the different origins of the isolates. The ACC values of the two samples originating from Paraguay were 8.36 and 8.66 log₁₀ cfu/g, respectively. *Enterobacteriaceae* were detected with a frequency of 83 % in the samples, with values for individual samples ranging from 2.32 log₁₀ cfu/ g to 8.69 log₁₀ cfu/g, with a median value of 4.76 log₁₀ cfu/g (Table 2). In total, 40 % of the samples surpassed the critical value for *Enterobacteriaceae* defined by the DGHM, 24 % were in the range between the guidance value and the critical value, and 19 % were below the guidance value

(Table 2). In the remaining 17 samples, no *Enterobacteriaceae* were detected. Considering the origin of the samples, the *Enterobacteriaceae* colony counts for samples from Brazil were between 2.32 and 8.69 log₁₀ cfu/g (median: 4.34 log₁₀ cfu/g), for samples from Argentina between 2.83 and 7.11 log₁₀ cfu/g (median: 4.97 log₁₀ cfu/g) and for samples from Uruguay between 2.83 and 6.81 log₁₀ cfu/g (median: 4.81 log₁₀ cfu/g). In one of the two samples originating from Paraguay, *Enterobacteriaceae* were detected with a value of 4.71 log₁₀ cfu/g. Again, no statistically significant differences in the values were observed in relation to the origin of the samples. Correlation analysis revealed only a weak association between high levels of ACC counts and high counts of *Enterobacteriaceae* (Spearman's correlation, $r_s = 0.27$, $p = 0.007$). *Escherichia coli* were detected quantitatively in three samples ($n = 2$ from Brazil, $n = 1$ from Argentina). Of these, one sample from Brazil surpassed the critical value defined by DGHM with 5.94 log₁₀ cfu/g (Table 2). Also, coagulase-positive staphylococci were detected in only a single sample from Argentina. The detected colony count of 2.54 log₁₀ cfu/g was below the guidance value defined by DGHM (Table 2). The isolate was confirmed as *S. aureus* by PCR. In 5 % of all samples ($n = 3$ from Argentina, $n = 1$ from Uruguay and $n = 1$ from Paraguay), *L. monocytogenes* was detected. Of these, two Argentinian samples and the sample originating from Uruguay, were tested quantitatively for *L. monocytogenes* with none of the samples surpassing the critical value defined by DGHM (Table 2).

3.3. Qualitative microbiological analyses and whole genome sequencing results

In two samples originating from Argentina, STEC was detected. Visible growth of the bacteria was obtained from both positive samples on TBX agar (Oxoid), with the colonies from sample H91 showing a blue-green color, while those from sample H28 formed colorless colonies. In contrast, merely sample H28 showed visible growth on CHROMagar STEC™ (Mast Diagnostica GmbH). From sample H28, all colonies tested by PCR were positive for the *stx1* and *stx2* genes, whereas only two of the five colonies tested for sample H91, showed a positive PCR result for the *stx1* and *stx2* genes. From both beef samples, one *stx1* and *stx2*-positive colony was included in further investigations. Both STEC isolates were then tested for the presence of the *eae* gene, resulting negative. In order to further investigate the characteristics of the isolates, they were subjected to whole genome sequencing. Analysis of the sequences revealed that isolate Ha28 belonged to serotype O178:H7, sequence type ST278 and harbored

stx1a and *stx2c* (Table 3). In contrast, isolate Ha91 belonged to ST6661, was determined as serotype B17:H19 and harbored *stx1a* and *stx2a*. Both isolates belonged to phylogenetic group B1. No resistance genes were detected in either of the isolates via the ResFinder software, but other fitness and virulence-associated factors were present, such as the adhesion encoding *iha* gene in isolate Ha28 (Table 3). From five samples, visible growth on ESBL-screening plates was detected, showing a pink color formation and exhibiting very small colonies (<0.5 mm diameter). From each agar plate one colony was picked and subjected to the ESBL-confirmatory test. All isolates showed large zone diameters of ≥ 27 mm and ≥ 22 mm for cefotaxime and ceftazidime, respectively. The diameters did not increase 5 mm or more in the presence of clavulanic acid. Thus, none of these isolates was confirmed as ESBL-producer. Furthermore, no *Salmonella* spp. was detected in any sample of this study.

4. Discussion

In this study, we assessed the microbiological quality of a total of 100 raw beef samples imported into the EU from third countries. Samples originated from Brazil (53 %), Argentina (33 %), Uruguay (12 %) and a small percentage from Paraguay (2 %). This is an approximation to the distribution of the predominant beef importers into the EU (EC, 2021). Results indicate that the majority of the samples were within the expected pH range for raw beef, in which the typical characteristics, nutrition properties and texture of beef, are maintained (Ferguson et al., 2001; Vidal Junior et al., 2020). Low pH values (<5.4) are typically related to the growth of lactic acid bacteria and are linked with a higher water loss in the further course (Crichton et al., 2017). However, samples in our study with pH values below 5.4 showed no apparent sensory irregularities and no increased ACC values compared to the samples within the expected pH range. In general, microbiological analysis indicated that the occurrence of the major relevant foodborne pathogens in the samples is low and the critical values for those defined by the DGHM were not surpassed. However, criteria by DGHM for hygienic indicator bacteria were not completely fulfilled and a considerable number of samples exceeded the critical value. The ACC is used as an indicator of appropriate processing conditions, for maintaining the cold chain, and for predicting the shelf life of raw meat (Gonzalez-Gutierrez et al., 2020). No values for ACC are defined by the DGHM for raw beef, while for other types of meat, such as raw lamb, poultry and pork meat, a guidance value of $6.7 \log_{10}$ cfu/g is specified by the DGHM (DGHM, 2021), which is well below the median

value of 8.06 log₁₀ cfu/g we observed in our samples. In general, for raw meat, it is reported that high detection frequencies of ACC between 7 log₁₀ cfu/g and 8 log₁₀ cfu/g are associated with poorer quality, an earlier onset of changes in texture and smell, and a generally reduced shelf life (González-Gutiérrez et al., 2020; McCain et al., 2015). However, as mentioned, none of the samples in the present study showed deviations in sensory parameters even when ACC values exceeded 7 log₁₀ cfu/g. Overall, high values of ACC in raw meat, as found in our study, combined with high detection frequencies of other hygienic indicator bacteria such as *Enterobacteriaceae*, indicate unhygienic conditions in the production chain or inadequate temperature during transport and storage (Jaja et al., 2018). Indeed, our results demonstrated a high prevalence of *Enterobacteriaceae* within our samples and merely 36 % of all samples were below the guidance values defined by the DGHM. In almost half of the samples, the DGHM critical value for *Enterobacteriaceae* was surpassed and they were consequently evaluated as microbiologically unsatisfactory (DGHM, 2018). There was a weak correlation between high ACC values and high values of *Enterobacteriaceae* within the same sample. Notably, despite the high *Enterobacteriaceae* counts, *Escherichia coli* was not prominent in our samples. To date, there are no comparable studies available focusing on the detection frequencies of *Enterobacteriaceae* in raw beef imported into the EU. Only one study has examined the microbiological metrics of frozen poultry and pork meat imported into the EU from regions of similar origin as our samples, also following ISO standard methods (Jansen et al., 2018). This research detected *Enterobacteriaceae* in almost all samples, but in contrast to our results, the majority of the samples was below the guidance value by DGHM and less than 1 % of poultry meat samples surpassed the critical value for *Enterobacteriaceae* (Jansen et al., 2018). In a previous study examining raw beef imported into the USA from Uruguay, the same country of origin as some of our samples, their results were different from ours. The authors observed a lower frequency of contamination (31.3 %) and also a much lower mean *Enterobacteriaceae* count of 2.0 log₁₀ cfu/g than we obtained (4.76 log₁₀ cfu/g). One other study by Stella et al. (2013) examined raw beef imported from Argentina to Italy. However, as the authors used swab sampling and determined cfu/cm², quantitative results from that study are not directly comparable to our results. The authors reported a low level of bacterial contamination in their 24 samples, and *E. coli* was not detected in any sample (Stella et al., 2013). Overall, the comparability of these previous studies with our results

is somewhat limited, as frozen meat was examined in those studies, which may have resulted in lower numbers of culturable bacteria. In addition, methodological differences compared to the standard methods used in our study may have also affected detection rates and numbers. Apart from their role as hygiene indicators, certain *Enterobacteriaceae*, such as strains of *E. coli*, can also be pathogenic to humans (Kotloff et al., 2013; Woodward et al., 2019). Shiga toxin-producing *E. coli* in particular are of significance to public health because they can cause conditions like severe gastroenteritis, hemolytic uremic syndrome (HUS), thrombocytopenic purpura and hemorrhagic colitis (Gyles, 2007). Unlike in the EU, HUS is endemic in Argentina, with an incidence of 0.65 per 100,000 inhabitants and in 2019, a total of 290 HUS cases were reported (MSAL, 2020). The two STEC isolates in this study did not belong to the major serogroups (O26, O103, O111, O121, O145, and O157) that are primarily involved in human disease outbreaks in the EU (EFSA, 2022). Isolate Ha28 belongs to serotype O178:H7, which is a common serotype on beef in Argentina, whereas relatively few cases of human illness were associated with O178 infections and O178:H7 STEC in particular were only isolated from patients with uncomplicated disease (Masana et al., 2011; Miko et al., 2014). For isolate Ha91, WGS analysis predicted antigen sequence type B17, which was first described in *Shigella boydii* and some B17 STEC have been detected in food since then (Lacher et al., 2014, 2016). However, there are no reports on the detection of B17 STEC in raw beef to date and the detection of this serotype underlines the fact that raw meat products imported into the EU can be a source of unusual genotypes of *E. coli*, as previously reported by Müller et al. (2018). Both STEC isolates were negative for the *eae* gene, which encodes intimin, a relevant binding protein of pathogenic STEC (Minh et al., 2015). Nevertheless, it is known that *eae*-negative strains can also be involved in causing severe human diseases, such as HUS (EFSA, 2022; Newton et al., 2009). Both isolates carried more than one other adherence factor (*iha*, *lpfA*, *ompT*, *fimH*) and isolate Ha91 further harbored the enterohemolysin-encoding gene, *ehxA*, which is considered a critical factor in STEC pathogenesis (Hua et al., 2021). In this work, the detection frequency of STEC with 2 % is comparable to the official data of the EU One Health Zoonoses Report with a prevalence of STEC in bovine meat in the EU of 1.7 % in 2021 (EFSA, 2022). Comparable data on the overall prevalence of STEC in Argentina and Brazil in raw beef is limited. Recent studies in Brazil reported detection frequencies of 0 %, 2.8 % and 10 % in beef samples, respectively, and STEC isolates

in these studies do not belong to the major serogroups (O157, O45, O103, O111, O121, O145), either (Peresi et al., 2016; Ristori et al., 2017; Santos et al., 2018). In Argentina, previous studies with a focus on the detection of non-O157 STEC demonstrated a prevalence of up to 25 % in retail beef cuts from nine beef exporting abattoirs and 9 % in beef carcasses, respectively (Etcheverría et al., 2010; Masana et al., 2011). In contrast, a lower prevalence of 5.8 % in raw beef cuts produced for export and local markets was detected in 2014 by Brusa et al. (2017). These lower detection frequencies may be due to the improvement of intervention measures to reduce STEC on carcasses by The National Service of Agrifood Health and Quality of Argentina in 2014 (Brusa et al., 2019; SENASA, 2014). Data regarding the prevalence of *Salmonella* spp. in imported raw beef into the EU is rare. In the previously mentioned study by Bosilevac et al. (2007), a very low *Salmonella* spp. prevalence of 0.4 % in raw beef imported into the USA from Uruguay was reported. Also taking into account that none of the samples in the present studies tested positive for *Salmonella* spp., imported beef does not appear to be a significant source of exposure for consumers. As imported raw beef is stored refrigerated for extended periods during transportation, the growth of psychotropic bacteria such as *L. monocytogenes* may be an additional concern (Jones & D’Orazio, 2013). However, in our study the prevalence of *L. monocytogenes* was low and none of the samples examined quantitatively surpassed the critical value defined by DGHM. Previous studies investigating the prevalence of *L. monocytogenes* in meat intended for import into the EU reported variable results. Stella et al. (2013) reported the absence of *L. monocytogenes* in Argentinian frozen raw beef, while Teixeira et al. (2019) observed a *L. monocytogenes* prevalence of 12 % in raw beef from export-authorized processing plants in Mato Grosso, the state with the highest beef-export activity in Brazil.

5. Conclusion

Overall, the presence of foodborne pathogens, also including *S. aureus* and ESBL-producing *Enterobacteriaceae*, was low and no increased consumer exposure is expected from raw beef imported from third countries compared to raw beef produced in the EU (EFSA, 2022). Nevertheless, an uncommon STEC serotype was detected indicating that imported raw beef constitutes a potential source for the dissemination of STEC serotypes that differ from those commonly reported in the EU. Most notably, high ACC values and the DGHM critical value exceedances for *Enterobacteriaceae* in

a considerable number of samples are of concern, indicating potential hygiene deficiencies. This was observed independently of the countries of origin. Due to the limited sample size of the samples examined in this study, the findings need to be confirmed by further studies, preferably with larger sample sizes. Nevertheless, our findings highlight the importance of adhering to hygienic conditions throughout the meat production and transport chain in order to ensure a hygienically sound product even after long transportation and storage times.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data availability Data will be made available on request.

Acknowledgments

We sincerely thank Cornelia Dürschmidt, Jan Hendrik Paulus and Claudia Walter for their expert technical support.

Tables

Table 1. Origin of the raw beef samples examined in this study.

Country of Origin	Number of samples
Brazil	53
Argentina	33
Uruguay	12
Paraguay	2
Total	100

4. Publikationen

Table 2. Evaluation of microbiological criteria for raw beef imported into the EU according to guidance and critical values specified by the German Society for Hygiene and Microbiology (DGHM).

Evaluation criteria	Number of positive samples / total samples	Colony counts (log ₁₀ cfu/g)		DGHM values ^a (log ₁₀ cfu/g)		Samples per category		
		Min. - Max.	Median	Guidance value	Critical value	> detection limit ^b ≤ guidance value	> guidance value ≤ critical value	> critical value
ACC ^c	100/100	4.18 - 10.04	8.06	na ^d	na	-	-	-
<i>Enterobacteriaceae</i>	83/100	2.32 - 8.69	4.76	4.0	5.0	19	24	40
<i>L. monocytogenes</i>	3/50 ^e	1.30 - 1.48	1.30	na	2.0	3	0	0
<i>E. coli</i>	3/100	1.90 - 5.94	2.00	2.7	3.7	2	0	1
Coagulase-positive staphylococci	1/100	2.54	-	2.7	3.7	1	0	0
<i>Salmonella</i> spp.	0/100	-	-	na	Absence in 25g	-	-	-

^a Microbial guidance and critical values for raw beef by DGHM applying to raw, seasoned or marinated beef (loose or packaged) valid at consumer level (2021). ^b According to DIN EN ISO 7218:2014-09, the detection limits for *E. coli*, *L. monocytogenes* and coagulase-positive staphylococci are 1 log₁₀ cfu/g and for *Enterobacteriaceae* 2 log₁₀ cfu/g in accordance with DIN ISO 10164-1:2019-06. ^c ACC = aerobic mesophilic colony count ^d No values available. ^e The quantitative microbiological analysis for *L. monocytogenes* was only performed with n = 50 samples.

4. Publikationen

Table 3. Results of whole genome sequencing of STEC isolates from raw beef imported in the EU from third countries.

Isolate	Origin	Predicted serotype	Phylogenetic group	MLST	<i>stx</i> -subtypes	<i>eae</i> gene	Additional Virulence-associated factors
Ha28	Argentina	O178:H7	B1	ST278	<i>stx1a</i> , <i>stx2c</i>	-	<i>astA</i> , <i>fimH</i> , <i>gad</i> , <i>iha</i> , <i>iss</i> , <i>lpfA</i> , <i>ompT</i> , <i>terC</i>
Ha91	Argentina	B17:H19	B1	ST6661	<i>stx1a</i> , <i>stx2a</i>	-	<i>celb</i> , <i>cia</i> , <i>fimH</i> , <i>ehxA</i> , <i>espP</i> , <i>gad</i> , <i>ompT</i> , <i>terC</i>

References

Bassetti, M., Peghin, M., Vena, A., & Giacobbe, D. R. (2019). Treatment of Infections Due to MDR Gram-Negative Bacteria. *Frontiers in medicine*, 6, 74. <https://doi.org/10.3389/fmed.2019.00074>.

Bortolaia, V., Kaas, R. S., Ruppe, E., Roberts, M. C., Schwarz, S., Cattoir, V., Philippon A., Allesoe, R.L., Rebelo, A.R., Alfred, F. F., Fagelhauer, L., Chakraborty, T., Neumann, B., Werner, G., Bender, J. K., Stingl, K., Nguyen, M., Coppens, J., Xavier, B. B., Surbhi, M.K., Henrik, W., Pinholt, M., Anjum, M. F., Duggett, N. A., Kempf, I., Nykäsenoja, S., Olkkola, S., Wieczorek, K., Amaro, A., Clemente, L., Mossong, J., Losch, S., Ragimbeau, C., Lund, O., & Aarestrup, F. M. (2020). ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 75, 3491-3500. <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa345>.

Bosilevac, J. M., Guerini, M. N., Brichta-Harhay, D. M., Arthur, T. M., & Koohmaraie, M. (2007). Microbiological characterization of imported and domestic boneless beef trim used for ground beef. *Journal of Food Protection*, 70, 440-449. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-70.2.440>.

Brusa, V., Restovich, V., Galli, L., Teitelbaum, D., Signorini, M., Brasesco, H., Londero, A., Garcia, D., Padola, N. L., Superno, V., Sanz, M., Sandra, P., Costa, M., Bruzzone, M., Sucari, A., Ferreghini, M., Linares, L., Suberbie, G., Rodriguez, R., & Leotta, G. A. (2017). Isolation and characterization of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from beef carcasses, cuts and trimmings of abattoirs in Argentina. *PLOS ONE*, 12, Article e0183248. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183248>.

Brusa, V., Restovich, V., Signorini, M., Pugin, D., Galli, L., Ruíz Díaz, V, Arias, R., & Leotta, G. A. (2019). Evaluation of intervention measures at different stages of the production chain in Argentinian exporting abattoirs. *Food Science and Technology International*, 25, 491-496. <https://doi.org/10.1177/1082013219836326>.

Castro, V. S., Teixeira, L. A. C., Rodrigues, D. D. P., Dos Santos, L. F., Conte-Junior, C. A., & de Souza Figueiredo, E. E. (2019). Occurrence and antimicrobial resistance of *E. coli* non-O157 isolated from beef in Mato Grosso, Brazil. *Tropical animal health and production*, 51, 1117-1123. <https://doi.org/10.1007/s11250-018-01792-z>.

CLSI. (2020). Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests. M100, 30th edition. Wayne, PA. Clinical and Laboratory Standards Institute.

Crichton, S. O. J., Kirchner, S. M., Porley, V., Retz, S., von Gersdorff, G., Hensel, O., & Sturm, B. (2017). High pH thresholding of beef with VNIR hyperspectral imaging. *Meat Science* 134, 14-17. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2017.07.012>.

DGHM. (2018). German Society of Hygiene and Microbiology. Preamble. Recommendations on target and critical values for microbiological criteria for food. Retrieved from <https://www.dghm-richt-warnwerte.de/de/praeambel>. Accessed March 7, 2022.

DGHM. (2021). Germany Society of Hygiene and Microbiology. Recommendations on guidance and critical values of microbiological values (raw meat). Retrieved from <https://www.dghm-richt-warnwerte.de/de/dokumente/fleisch-roh>. Accessed March 6, 2022.

Doumith, M., Day, M. J., Hope, R., Wain, J., & Woodford, N. (2012). Improved multiplex PCR strategy for rapid assignment of the four major *Escherichia coli* phylogenetic groups. *Journal of clinical microbiology*, 50, 3108-3110. <https://doi.org/10.1128/JCM.01468-12>

EC. (2019). Commission Implementing Regulation (EU) 2019/2130 of 25 November 2019 establishing detailed rules on the operations to be carried out during and after documentary checks, identity checks and physical checks on animals and goods subject to official controls at border control posts. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A32019R2130>.

EC. (2005). Commission Regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=CELEX%3A32005R2073>.

EC. (2021b). EU Bovine Trade. Retrieved from https://ec.europa.eu/info/sites/default/files/food-farming-fisheries/farming/documents/eu-bovine-trade_en.pdf. Accessed February 17, 2022.

EC. (2021a). EU reinforces its leading position in global agri-food trade. Retrieved from https://ec.europa.eu/commission/presscorner/detail/en/IP_21_4584. Accessed April 10, 2023.

EC. (2023). Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF). Retrieved from <https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/screen/search>. Accessed April 5, 2023.

EC. (2004a). Regulation (EC) No 852/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 on the hygiene of foodstuffs. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=celex%3A32004R0852>.

EC. (2004b). Regulation (EC) No 853/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 laying down specific hygiene rules for on the hygiene of foodstuffs. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/en/ALL/?uri=CELEX%3A32004R0853>.

EC. (2017). Regulation (EU) 2017/625 of the European Parliament and of the Council of 15 March 2017 on official controls and other official activities performed to ensure the application of food and feed law, rules on animal health and welfare, plant health and plant protection products. <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2017/625/oj>.

EFSA. (2022). The European Union One Health 2021 Zoonoses Report. EFSA Journal, 20(12), 7666, Article e07666. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2022.7666>.

Egervärn, M., Börjesson, S., Byfors, S., Finn, M., Kaipe, C., Englund, S., & Lindblad, M. (2014). Escherichia coli with extended-spectrum beta-lactamases or transferable AmpC beta-lactamases and Salmonella on meat imported into Sweden. International Journal of Food Microbiology, 171, 8-14. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.11.005>.

Esteve-Palau, E., Solande, G., Sánchez, F., Sorlí, L., Montero, M., Güerri, R., Villar, J., Grau, S., & Horcajada, J. P. (2015). Clinical and economic impact of urinary tract infections caused by ESBL-producing Escherichia coli requiring hospitalization: A matched cohort study. The Journal of infection, 71, 667-674. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2015.08.012>.

Etcheverría, A. I., Padola, N. L., Sanz, M. E., Polifroni, R., Krüger, A., Passucci, J. Rodríguez, E. M., Taraborelli, A. L., Ballerio, M., & Parma, A. E. (2010). Occurrence of Shiga toxin-producing E. coli (STEC) on carcasses and retail beef cuts in the marketing chain of beef in Argentina. Meat Science, 86, 418-421. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.05.027>.

Ferguson, D. M., Bruce, H. L., Thompson, J. M., Egan, A. F., Perry, D., & Shorthose, W. R. (2001). Factors affecting beef palatability – farmgate to chilled carcass. Australian Journal of Experimental Agriculture, 41, 879. <https://doi.org/10.1071/ea00022>.

González-Gutiérrez, M., García-Fernández, C., Alonso-Calleja, C., & Capita, R. (2020). Microbial load and antibiotic resistance in raw beef preparations from northwest Spain. *Food Science & Nutrition*, 8, 777-785. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1319>.

Gyles, C. L. (2007). Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. *Journal of Animal Science*, 85, 45-62. <https://doi.org/10.2527/jas.2006-508>.

Hasman, H., Agersø, Y., Hendriksen, R., Cavaco, L. M. & Guerra-Roman, B. (2015). Laboratory protocol: Isolation of ESBL-, AmpC- and carbapenemase-producing *E. coli* from fresh meat. National Food Institute, Lyngby, Denmark. Retrieved from https://www.eurl-ar.eu/CustomData/Files/Folders/21-protocols/529_esbl-ampc-cpeprotocol-version-meat-v7-09-12-19.pdf.

Hirvonen, J., Siitonen, A., & Kaukoranta, S. S. (2012). Usability and performance of CHROMagar STEC medium in detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains. *Journal of clinical microbiology*, 50, 3586-3590. <https://doi.org/10.1128/JCM.01754-12>.

Hua, Y., Zhang, J., Jernberg, C., Chromek, M., Hansson, S., Frykman, A., Xiong, Y., Wan, C., Matussek, A., & Bai, X. (2021). Molecular Characterization of the Enterohemolysin Gene (ehxA) in Clinical Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolates. *Toxins*, 13, 71. <https://doi.org/10.3390/toxins13010071>.

Hussain, M., von Eiff, C. Sinha, B., Joost, I., Herrmann, M., Peters, G., & Becker, K. (2008). eap Gene as novel target for specific identification of *Staphylococcus aureus*. *Journal of clinical microbiology*, 46, 470-476. <https://doi.org/10.1128/JCM.01425-07>.

ISO. (1999). Meat and meat products – Measurement of pH – Reference method. (Vol. 2917), 1999.

ISO. (2019a). Microbiological examination of meat and meat products – Determination of Enterobacteriaceae – Part 1: Spatula method (reference method). (Vol. 10164), 1:2019-06.

ISO. (2013b). Microbiology of food and animal feed – Real-time polymerase chain reaction (PCR)-based method for the detection of food-borne pathogens – Horizontal method for the detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and the determination of O157, O111, O26, O103 and O145 serogroups. (Vol. 13136), 2013-04.

ISO. (2014). Microbiology of food and animal feeding stuffs – General requirements and guidance for microbiological examinations. (Vol. 7218), 2014-09.

ISO. (2001). Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of β -glucuronidase-positive *Escherichia coli* – Part 2: Colony-count technique at 44 °C using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-glucuronide. (Vol. 16649), 2:2001.

ISO. (2019b). Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species) – Part 1: Technique using Baird-Parker agar medium. (Vol. 6888-1), 2019-06.

ISO. (2017d). Microbiology of the food chain – Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and of *Listeria* spp. – Part 1: Detection method. (Vol. 11290), 1:2017

ISO. (2017c). Microbiology of the food chain – Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and of *Listeria* spp. – Part 2: Enumeration method. (Vol. 11290), 2:2017.

ISO. (2017e). Microbiology of the food chain – Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella* – Part 1: Detection of *Salmonella* spp. (Vol.6579), 1:2017.

ISO. (2013a). Microbiology of the food chain – Horizontal method for the enumeration of microorganisms – Part 2: Colony count at 30 °C by the surface plating technique. (Vol. 4833), 2:2013.

ISO. (2017a). Microbiology of the food chain – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination – Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions. (Vol. 6887), 1:2017.

ISO. (2017b). Microbiology of the food chain – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination – Part 2: Specific rules for the preparation of meat and meat products. (Vol. 6887), 2:2017.

Jaja, I. F., Green, E., & Muchenje, V. (2018). Aerobic Mesophilic, Coliform, *Escherichia coli*, and *Staphylococcus aureus* Counts of Raw Meat from the Formal and Informal

Meat Sectors in South Africa. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 15. <https://doi.org/10.3390/ijerph15040819>.

Jansen, W., Grabowski, N., Gerulat, B., & Klein, G. (2016). Food Safety Hazards and Microbiological Zoonoses in European Meat Imports Detected in Border Inspection in the Period 2008-2013. *Zoonoses and public health*, 63, 53-61. <https://doi.org/10.1111/zph.12204>.

Jansen, W., Woudstra, S., Müller, A., Grabowski, N., Schoo, G., Gerulat, B., Klein, G., & Kehrenberg, C. (2018). The safety and quality of pork and poultry meat imports for the common European market received at border inspection post Hamburg Harbour between 2014 and 2015. *PLoS ONE*, 13, Article e0192550. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192550>.

Joensen, K.G., Scheutz, F., Lund, O., Hasman, H., Kaas, R. S., Nielsen, E. M., & Aarestrup, F. M. (2014). Real-time whole-genome sequencing for routine typing, surveillance, and outbreak detection of verotoxigenic *Escherichia coli*. *Journal of clinical microbiology*, 52, 1501-1510. <https://doi.org/10.1128/JCM.03617-13>.

Jones, G.S., & D'Orazio, S. E. F. (2013). *Listeria monocytogenes*: cultivation and laboratory maintenance. *Current protocols in microbiology*, 31, 9B.2.1-9B.2.7. <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc09b02s31>.

Karch, H., & Meyer, T. (1989). Single primer pair for amplifying segments of distinct Shiga-like-toxin genes by polymerase chain reaction. *Journal of clinical microbiology*, 27, 2751-2757. <https://doi.org/10.1128/jcm.27.12.2751-2757.1989>.

Kononiuk, A.D., & Karwowska, M. (2017). Meat and meat products – analysis of the most common threats in the years 2011-2015 in Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF). *Roczniki Panstwowego Zakladu Higieny*, 68, 289-296. PMID: 28895672

Kotloff, K. L., Nataro, J. P., Blackwelder, W. C., Nasrin, D., Farag, T. H., Panchalingam, S., Wu, Y., Sow, S. O., Sur, D., Breiman, R. F., Faruque, A. S. G, Zaidi, A. K. M., Saha, D., Alonso, P. L., Tamboura, B., Sanogo, D., Onwuchekwa, U., Manna, B., Ramamurthy, T., Kanungo, S., Ochieng, J. B., Omere, R., Oundo, J. O., Hossain, A., Das, S. K., Ahmed, S., Qureshi, S., Quadri, F., Adegbola, R. A., Antonio, M., Hossain, M. J., Akinsola, A., Mandomando, I., Nhampossa, T., Acácio, S., Biswas, K., O'Reilly, C. E., Mintz, E. D., Berkeley, L. Y., Muhsen, K., Sommerfelt, H., Robins-Browne, R. M., & Levine, M. M. (2013). Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and

young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. *Lancet*, 382, 209-222. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60844-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60844-2).

Lacher, D. W., Gangiredla, J., Jackson, S. A., Elkins, C. A., & Feng, P. C. H. (2014). Novel microarray design for molecular serotyping of shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from fresh produce. *Applied and Environmental Microbiology*, 80, 4677-4682. <https://doi.org/10.1128/AEM.01049-14>.

Lacher, D. W., Gangiredla, J., Patel, I., Elkins, C. A., & Feng, P. C. H. (2016). Use of the *Escherichia coli* Identification Microarray for Characterizing the Health Risks of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolated from Foods. *Journal of Food Protection*, 79, 1656-1662. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-16-176>.

Masana, M. O., D' Astek, B. A., Palladino, P. M., Galli, L., Del Castillo, L. L., Carbonari, C., Leotta, G. A., Vilacoba, E., Irino, K. & Rivas, M. (2011). Genotypic characterization of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef abattoirs of Argentina. *Journal of Food Protection*, 74, 2008–2017. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-11-189>.

McCain, A. K., Vu, P. T. T. V., Mai, N.T., Le, V. V., & Dhu, T. T. N. (2015). Influence of market setting and time of purchase on counts of aerobic bacteria, *Escherichia coli*, and coliform and prevalence of salmonella and listeria in beef in Vietnam. *Agriculture, Food and Analytical Bacteriology Journal*, 5, 135-152.

Miko, A., Rivas, M., Bentancor, A., Delannoy, S., Fach, P., & Beutin, L. (2014). Emerging types of Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) O178 present in cattle, deer, and humans from Argentina and Germany. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 4, 78. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00078>.

Minh, H. S., Kimura, E., Minh, H. D., Honjoh, K., & Miyamoto, T. (2015). Virulence characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from raw meats and clinical samples. *Microbiology and Immunology*, 59, 114-122. <https://doi.org/10.1111/1348-0421.12235>.

MSAL. (2020). Ministerio de Salud Argentina. Boletín Integrado de Vigilancia. Semana Epidemiológica 02/2020.481. Retrieved from <https://bancos.salud.gob.ar/recurso/boletin-integrado-de-vigilancia-n481-se02-2020>. Accessed April 10, 2022.

- Müller, A., Jansen, W., Grabowski, N.T., Monecke, S., Ehricht, R., & Kehrenberg, C. (2018). ESBL- and AmpC-producing *Escherichia coli* from legally and illegally imported meat: Characterization of isolates brought into the EU from third countries. *International Journal of Food Microbiology*, 283, 52-58. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.06.009>.
- Müller, A., Seinige, D., Grabowski, N. T., Ahlfeld, B., Yue, M., & Kehrenberg, C. (2021). Characterization of *Escherichia coli* from Edible Insect Species: Detection of Shiga Toxin-Producing Isolate. *Foods*, 10, 2552. <https://doi.org/10.3390/foods10112552>
- Nagy, B., Szmolka, A., Smole Možina, S., Kovač, J., Strauss, A., Schlager, S., Beutlich, J., Appel, Lušicky, M., Aprikiang, P., Pászti, J., Tótha, I., Kugler, R., & Wagner, M. (2015). Virulence and antimicrobial resistance determinants of verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) and of multidrug-resistant *E. coli* from foods of animal origin illegally imported to the EU by flight passengers. *International Journal of Food Microbiology*, 209, 52-59. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.06.026>.
- Newton, H. J., Sloan, J., Bulach, D. M., Seemann, T., Allison, C. C, Tauschek, M., Robins-Browne, R. M, Paton, J. C., Whittam, T. S., Paton, A. W., & Hartland, E. L. (2009). Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* Strains Negative for Locus of Enterocyte Effacement. *Emerging Infectious Diseases*, 15, 372-380. <https://doi.org/10.3201/eid1502.080631>.
- Peresi, J. T. M., Almeida, I. A. Z. C., Vaz, T.M.I., Hernandez, R.T., de Carvalho Teixeira, I., de Lima Silva, S.I., Graciano, R. A. G., Pinheiro, S. R., & dos Santos, L. F. (2016). Search for diarrheagenic *Escherichia coli* in raw kibbe samples reveals the presence of Shiga toxin-producing strains. *Food Control*, 63, 165-170. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.11.018>.
- Ristori, C.A., Rowlands, R. E. G., Martins, C. G., Barbosa, M.L., dos Santos, L. F., Jakabi, M., Melo, F., & Gombossy de Melo Franco, B. D. (2017). Assessment of Consumer Exposure to *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., and Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in Meat Products at Retail in the City of Sao Paulo, Brazil. *Foodborne pathogens and disease*, 14, 447-453. <http://10.1089/fpd.2016.2270>.
- Santos, E. C. C. D., Castro, V. S., Cunha-Neto, A., dos Santos, L. F., Vallim, D. C, Lisbôa de Castro, R., Carvalho, R. C. T., Junior, C. A.C., & de Souza Figueiredo, E. E. (2018). *Escherichia coli* O26 and O113:H21 on Carcasses and Beef from a

Slaughterhouse Located in Mato Grosso, Brazil. *Foodborne pathogens and disease*, 15, 653-659. <https://doi.org/10.1089/fpd.2018.2431>.

Schmidt, H., Rüssmanni, H., Schwarzkopf, A., Aleksic, S., Heesemann, J., & Karch, H. (1994). Prevalence of attaching and effacing *Escherichia coli* in stool samples from patients and controls. *International journal of medical microbiology*, 281, 201-213. [https://doi.org/10.1016/s0934-8840\(11\)80571-2](https://doi.org/10.1016/s0934-8840(11)80571-2).

SENASA. (2014). Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria. Resolución-205-2014-SENASA. Retrieved from <http://www.senasa.gob.ar/normativas/resolucion-205-2014-senasa-servicio-nacional-de-sanidad-y-calidad-agroalimentaria>. Accessed April 4, 2023.

Stella, S., Ripamonti, B., Vandoni, S., Bernardi, C., & Sgoifo Rossi, C. A. (2013). Microbiological and Physicochemical Quality Evaluation of Vacuum-Packed Argentine Beef Imported into Italy. *Journal of Food Quality*, 36, 253-262. <https://doi.org/10.1111/jfq.12038>.

Teixeira, L. A. C., Carvalho, F. T., Vallim, D. C., Pereira, R. C. L., Cunha Neto, A., Vieira, B. S., Carvalho, R. C. T., & Figueiredo, E. E. S. (2019). *Listeria monocytogenes* in Export-approved Beef from Mato Grosso, Brazil: Prevalence, Molecular Characterization and Resistance to Antibiotics and Disinfectants. *Microorganisms*, 8, 18. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8010018>

Vidal Junior, P. O., Menezes, A. C. R., Pereira de Souza, L. M., Guimarães, A. G., & de Cassia Vieira Cardoso, R. (2020). Trade and safety issues of raw beef from the countryside of Bahia state, Brazil. *Journal of public health research*, 9, 1752. <https://doi.org/10.4081/jphr.2020.1752>.

Vimont, A., Delignette-Muller, M. L., & Vernozy-Rozand, C. (2007). Supplementation of enrichment broths by novobiocin for detecting Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from food: a controversial use. *Letters in Applied Microbiology*, 44, 326-331. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.02059.x>.

Wang, Y., & Salazar, J. K. (2016). Culture-Independent Rapid Detection Methods for Bacterial Pathogens and Toxins in Food Matrices. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15, 183-205. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12175>.

Woodward, S. E., Krekhno, Z., & Finlay, B. B. (2019). Here, there, and everywhere: How pathogenic *Escherichia coli* sense and respond to gastrointestinal biogeography. *Cellular Microbiology*, 21, Article e13107. <https://doi.org/10.1111/cmi.13107>

4.2 Publikation 2

Nicola Rinn, Anja Müller, Ann-Sophie Braun, Gabriel Greif, Dagmar Stiefel, Corinna Kehrenberg (2025).

Food products confiscated from air passengers travelling from third countries into the European Union: Microbiological analyses and genomic characterization of zoonotic and multiresistant bacteria

Food microbiology. 131 (2025). 104783. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2025>.

Autorenbeteiligung:

Idee, Konzeption und Methodik: CK, A.-S. B, AM

Durchführung der Experimente: **NR**, A.-S. B, GG, DS

Datenauswertung und Analyse: **NR**, CK, AM, A.-S. B

Manuskripterstellung oder kritische Durchsicht: **NR**, CK, A.-S. B, AM, GG, DS

Food products confiscated from air passengers travelling from third countries into the European Union: Microbiological analyses and genomic characterization of zoonotic and multiresistant bacteria

Nicola Rinn¹, Anja Müller¹, Ann-Sophie Braun¹, Gabriel Greif², Dagmar Stiefel², Corinna Kehrenberg^{1*}

¹Institute for Veterinary Food Science, Faculty of Veterinary Medicine, Justus Liebig University Giessen, Frankfurter Str. 92, 35392 Giessen, Germany

²Hessian State Laboratory, Border Control Post Frankfurt Airport, Perishable Center Building 454, 60549 Frankfurt am Main

*Corresponding author

E-Mail: corinna.kehrenberg@vetmed.uni-giessen.de

Keywords: Foodborne pathogens, illegal import, microbial contamination, antimicrobial resistance, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, international travel

Abstract

Illegal imports of food of animal origin from third countries into the EU are a potential transmission route for zoonotic and multiresistant bacterial pathogens. Here, we collected illegally imported food products that were confiscated from passengers arriving from non-EU countries at Frankfurt International Airport (FRA), Germany. A total of 100 food samples were microbiologically tested for the presence of foodborne and multiresistant pathogens and hygiene parameters were determined. For this, samples were qualitatively examined for *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC), methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA), and extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-/AmpC-producing Enterobacterales. Quantitative microbiological analyses included aerobic mesophilic colony counts, *L. monocytogenes*, coagulase-positive staphylococci, Enterobacterales and *E. coli* counts. Overall, Enterobacterales and *E. coli* were detected in 36% and 23% of the samples, respectively, indicating hygiene deficiencies, while foodborne pathogens were observed in 17% of the samples. Selected isolates were subjected to a comprehensive genotypic analysis, for which they were whole genome sequenced. It was demonstrated that the *S. aureus* isolates ($n = 11$) revealed a wide variety of genotypic profiles, with one isolate belonging to a newly assigned sequence type ST8323. Three *S. aureus* isolates were classified as multiresistant, including one MRSA. The *Salmonella enterica* isolates ($n = 3$) belonged to three serovars (Uganda, Altona, Rauform) and were susceptible to all antimicrobial agents tested. Further, no resistance was detected in the obtained *L. monocytogenes* isolates ($n = 3$; ST8, ST121, ST425). In three of the 23 presumed commensal *E. coli* isolates multiresistance was observed, whereas the single STEC isolate (O43:H2) was susceptible. In addition, we obtained five ESBL-producing Enterobacterales isolates, of which one isolate carried a rarely described *bla*_{SHV-168} subtype. Overall, the data show that illegal imports in the baggage of airline passengers can facilitate the spread of zoonotic and multiresistant bacterial isolates, including those resistant to third-generation cephalosporins and quinolones. This contributes to the transmission of newly described or uncommon lineages.

1. Introduction

All products of animal origin (POAO) legally introduced into the European Union (EU) must comply with the same high standards of food hygiene and microbiological criteria as products from EU member states and only imports from countries listed on a positive list can enter into the EU according to Regulation (EU) No. 2020/692. However, international airports often serve as bottlenecks for the illegal import of POAO. These products can be contaminated with zoonotic, epizootic and multiresistant bacterial pathogens (Beutlich et al., 2015; Nagy et al., 2015; Rodríguez-Lázaro et al., 2015; Müller et al., 2018b). Nevertheless, a considerable amount of POAO is entering the EU every year via private air passenger baggage for personal consumption, although Regulation (EU) No. 2019/2122 prohibits the entry via this route. Considering that only a small number of arriving passengers is subjected to custom controls, the precise number of POAO entering via this pathway is unknown. A study by Jansen et al. (2016) found that between 0.1 to 1.3% of passengers checked at two German airports had illegal POAO in their luggage. This is of concern, as many third countries do not meet the EU high standards for disease surveillance and control, food hygiene, and food processing, and therefore illegal food imports from these countries may pose a potential risk to human and animal health.

Moreover, the majority of illegally imported food products are homemade and inadequately packaged, and there is no information about the production and processing conditions (Schoder et al., 2015). In addition, illegally conveyed food products are usually not refrigerated during transportation, which means that foodborne pathogens may have a greater chance of multiplying over this time (Spies, 2008).

In the previous European research project “PROMISE” (<https://cordis.europa.eu/project/id/265877>) conducted from 2012 through 2014, POAO illegally imported into the EU were screened for the presence of some common food-associated zoonotic bacteria, such as *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC). Results indicated that *L. monocytogenes* was the most common bacterial pathogen found in illegally imported meat products, while *S. aureus* was most frequently detected in dairy products (Beutlich et al., 2015; Rodríguez-Lázaro et al., 2015; Schoder et al., 2015; Ciolacu et al., 2016). In particular, previous studies have also shown that illegally conveyed POAO can serve as vehicles for foodborne pathogens with genotypes that

are rare or newly described in the EU, such as for STEC and *S. aureus* (Nagy et al., 2015; Müller et al., 2016). Previous research indicates that illegally imported POAO can harbor multiresistant *S. aureus*, including methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA), and extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing Enterobacterales, with genotypes and resistance patterns that differ from those commonly found in livestock- and food-associated strains in the EU (Rodríguez-Lázaro et al., 2015; Müller et al., 2018b; Müller et al., 2016; Nagy et al., 2015). Infections with such multiresistant bacteria pose a public health threat as they are associated with an increased morbidity, mortality, healthcare costs, and antibiotic use (Esteve-Palau et al., 2015; Bassetti et al., 2019; van Duin and Paterson, 2016). In addition, previous studies have documented that illegally imported POAO, in particular meat products, harbored highly pathogenic serotypes of *Salmonella* spp. such as highly pathogenic *S. Enteritidis* and *S. Typhimurium* that are frequently involved in foodborne outbreaks in the EU, highlighting the potential risk of a new transmission route of such strains via these products (Jansen et al., 2019; Rodríguez-Lázaro et al., 2015; Beutlich et al., 2015). Given the large amount of international traffic, private passenger luggage may have the potential to contribute to the global spread of specific genotypes of foodborne pathogens. This warrants ongoing research that includes the molecular characteristics of bacterial isolates to better understand the spreading and transmission routes of pathogenic or multidrug-resistant isolates. The relevance of transmission of multidrug-resistant bacteria from animals and food (POAO) to humans handling them and how frequently this contributes to human infections or colonization cannot be determined with certainty; however, bacterial transmission or gene transfer can be assumed as the same resistance genes were detected in bacterial isolates from farm animals, food and humans (Lazarus et al., 2015, Muloi et al., 2018).

Therefore, the aim of this work was to obtain current data on genotypes and antimicrobial resistance patterns of bacteria entering the EU illegally by travelers in order to identify unusual and/or highly pathogenic genotypes that are introduced via this route. These data will help to assess potential health risks from illegally imported food.

2. Material and methods

2.1 Confiscated food samples

From October 2021 through December 2022, food samples were collected at Frankfurt International Airport (FRA), Germany. The samples were taken risk-based by the veterinary border control post of the Hessian State Laboratory during routine customs inspections of private air passenger baggage arriving in the EU from third countries, primarily from South-Eastern third countries. Only the arriving and departing airports were known, and no information was available on whether the flight was an arrival or transit flight. Samples were transported refrigerated (2 - 4 °C) on the day of seizure and microbiological analyses were performed at the Institute of Veterinary Food Science, Giessen, Germany, within 48 h after confiscation except for industrially packaged samples, but investigations were carried out within the declared shelf life of the product. A total of 100 food items originating from 15 different non-EU countries were collected for the study and investigated. The countries of origin (Table 1) were divided into five subregions [Southwest Asia (n = 47), Southeast Asia (n = 17), Eastern Europe (n = 15), Central Asia (n = 14) and Africa (n = 7)]. However, it must be mentioned that some regions were incompletely represented or underrepresented and due to the small sample size of food originating from Africa, no further subdivision of these samples was made. Food items were also divided into meat products (n = 60) and dairy products (n = 40), and subdivided by their type of packaging [individually packaged (n = 72) and industrially packaged (n = 28), respectively] and processing status [ready-to-eat (n = 79) and raw (n = 21), respectively] (Table 1). Additional information on the samples can be found in Supplementary file 2.

2.2 Microbiological analyses

Microbiological analyses were performed following the International Organisation for Standardisation (ISO) methods for microbiology in the food chain. Sample preparation was performed according to DIN ISO 6887-1:2017 and DIN ISO 6887-2:2017 (ISO, 2017a, 2017b), followed by a quantitative analysis for aerobic mesophilic colony counts (ACC), Enterobacterales, β -glucuronidase positive *E. coli*, *L. monocytogenes* and for coagulase-positive staphylococci (including *S. aureus*). Analyses were performed according to the following international reference methods: DIN ISO 4833-2:2013, DIN ISO 10164-1:2019-06, DIN ISO 16649-2:2001, DIN ISO 11290-2:2017 and DIN ISO 6888-1:2019, respectively (ISO, 2001, 2013a, 2017c, 2019a, 2019b). In addition, the

detection of *L. monocytogenes* and *Salmonella* spp. was performed qualitatively according to DIN ISO 6579:2017 and DIN ISO 11290-1:2017 (ISO, 2017d, 2017e). Species confirmation of colonies suspected of being *S. aureus*, *E. coli*, and *Salmonella* spp. was performed using species-specific PCR assays targeting the *eap*, *gadA* and the *invA* genes, respectively (Hussain et al., 2008; Doumith et al., 2012; Rahn et al., 1992). *Salmonella* spp. isolates were also sent to the German Federal Institute for Risk Assessment, Berlin, (BfR; National Reference Laboratory for *Salmonella* spp. in Germany) for official species confirmation and serotyping according to the White-Kauffmann-Le Minor scheme (ISO, 2017e)

Regulation (EC) No. 2073/2005 defines microbiological criteria for products produced within the EU market as well as for those legally imported into the EU. Even though the samples tested in this study were from illegally imported products that were not within the scope of the regulation, the limit values contained in the regulation were used for the assessment. For some of the POAO tested in this study, no EU limits are defined, so the recommendations of guidance and critical values of the German Society for Hygiene and Microbiology (DGHM) for microbiological criteria valid at consumer level were used as a reference (DGHM, 2018, 2019, 2021).

2.3 Detection of Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC)

The presence of STEC was investigated according to DIN ISO 13136:2013-04 with modifications according to Vimont et al. (2007) (ISO, 2013b). To 25 g of each food sample, 225 ml of modified tryptic soy broth (Oxoid Limited, Basingstoke, UK) without antibiotic additives was added and the sample was homogenized in a Stomacher® blender bag (Interscience, Saint Nom La Bretèche France), with a subsequent incubation in ambient air at 37 ± 1 °C for 24 ± 1 h. For subcultivation, one 10 µl loop each was streaked onto trypton bile x-glucuronide agar (TBX) (Oxoid Limited) and on CHROMagar STEC™ (Mast Diagnostica GmbH, Reinfeld, Germany) and plates were incubated for 24 ± 1 h. at 44 ± 1 °C and 37 ± 1 °C, respectively. According to the colony morphology and color formation (TBX = blue-green and colorless, CHROMagar STEC™ = mauve), five colonies from each agar were subcultured onto plate count (PC) agar (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) with a subsequent incubation at a temperature of 37 ± 1 °C for 24 ± 1 h. These colonies were tested for the presence of Shiga toxin genes (*stx1* and *stx2*) and the *eae* gene (encoding for intimin) by PCR as previously described (Karch and Meyer, 1989; Schmidt et al., 1994). For further

molecular characterization, one isolate per food sample that was positive for *stx1* and/or *stx2* was included and confirmed as *E. coli* by the PCR method as described above (Doumith et al., 2012).

2.4 Detection of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA)

For isolation of MRSA, the protocol of the National Food Institute of Denmark was used with minor adaptations (Larsen et al., 2017). From each food sample, 25 g were homogenized in a Stomacher[®] blender bag (Interscience) in 225 ml Mueller-Hinton broth (Merck) containing 6.5% sodium-chloride and incubated in ambient air at 37 ±1 °C for 24 ±1 h. One loopful was then streaked onto CHROMagar[™] MRSA (Mast Diagnostica GmbH), followed by an incubation at 37 ±1 °C for 24 ±1 h. Presumptive MRSA colonies were subcultured on blood agar plates (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Germany). One isolate from each sample was used for further investigations. Methicillin resistance was determined on the basis of ceftiofur resistance according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) disk diffusion method with ceftiofur (30 µg) (Oxoid Limited) (CLSI, 2023).

2.5 Screening for ESBL-/ AmpC-producing

Food samples were tested for the presence of ESBL-/AmpC-producing Enterobacterales following the protocol of the National Food Institute of Denmark with minor modifications (Hasman et al., 2015). Of each sample, 25 g were homogenized in a Stomacher[®] blender bag (Interscience) with 225 ml buffered peptone water (Merck) and the sample was then incubated at 37 ±1 °C for 24 ±1 h. After incubation, one loop of the suspension was plated onto MacConkey agar plates (Merck) containing 1 mg/l of cefotaxime (Cayman Chemical Company, Michigan, USA) and plates were incubated at 37 ±1 °C for 24 ±1 h. in ambient air. For subcultivation of presumptive ESBL-/AmpC-producing Enterobacterales, PC agar plates (Merck) were used and one isolate from each sample was included in further analyses. An ESBL confirmatory test was performed and evaluated according to CLSI standards by using Micronaut-S β-lactamase microtiter plates (Merlin Diagnostika, Bornheim-Hersel, Germany). Isolates were regarded as confirmed ESBL-producers if a reduction of the minimal inhibitory concentration (MIC) value of ≥ 3 dilution steps occurred for at least one cephalosporin tested in combination with clavulanic acid, compared to testing without (CLSI, 2023). Therefore, the microtiter plate layout included cefepime, ceftazidime, cefotaxime, and

meropenem, as single substances and cefepime, ceftazidime, and cefotaxime in combination with clavulanic acid. Further, the panel included ceftazidime and cefotaxime in combination with 3-amino-phenyl-borat (APB) to identify AmpC-producing Enterobacterales, and meropenem in combination with APB for the detection of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. The layout additionally contains temocillin, and ertapenem as mono compounds as well as meropenem in combination with the divalent cation chelator ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) for detection of metallo- β -lactamases. As positive and negative controls, *Klebsiella pneumoniae* ATCC[®] 700603 and *E. coli* ATCC[®] 25922 were used, respectively. Species confirmation of the detected presumptive ESBL-producers was performed by the commercially available API20E[®] test (bioMérieux, Nürtingen, Germany) and by a 16S rDNA PCR-based method (Koukos et al., 2014). Purified amplicons of 16S rDNA PCR products were sequenced at Eurofins Genomics (Eurofins Genomics, Ebersberg, Germany) and sequence analysis and evaluation were performed by using the DNAMAN software version 8 (Lynnon Biosoft, San Ramon, CA, USA) and the BLAST algorithm (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

2.6 Statistical analyses

Statistical analysis was performed with SAS[®] 9.4 statistical software (Statistical Analysis System Institute Inc., Cary, NC, USA) transforming the microbiological metrics into log₁₀ scale base before calculation. Detection limits for *E. coli*, *L. monocytogenes* and coagulase-positive staphylococci are defined in DIN ISO 7218:2014-09 with 1 log₁₀ colony-forming units (cfu)/g and for Enterobacterales with 2 log₁₀ cfu/g according to DIN ISO 10164-1:2019-06 (ISO, 2014, 2019a). As specified in both DIN ISO norms, for results below the detection limit, half of the detection limit was used for calculation. Normal distribution of the values was tested by Shapiro-Wilk test. All detected values did not show a normal distribution, so non-parametric tests were used. The Chi-square test was conducted to determine the relationship between the detection frequencies of hygiene indicator bacteria (*E. coli* and Enterobacterales) and the detection of foodborne pathogens (*Salmonella* spp., *L. monocytogenes* and *S. aureus*), as well as correlations between the detection of hygiene indicator parameters and the detection of pathogens in relation to the respective origin and type of packaging of the samples. When the Chi-square test was not valid because more than 20% of expected frequencies were lower than 5, the Fisher's exact test was used. This applied

to the determination of a correlation between the detection frequency of *E. coli* and foodborne pathogens and the origin of the samples, respectively. A difference was considered statistically significant at a p-value of <0.05.

2.7 Phenotypic antimicrobial susceptibility testing

Tested antimicrobial agents, testing methods and interpretive criteria of phenotypic antimicrobial susceptibility testing of (presumptive) commensal *E. coli* isolates, the single STEC isolate, confirmed ESBL-producing Enterobacterales, *S. aureus* isolates, *L. monocytogenes* isolates as well as the *Salmonella* spp. isolates are listed in Supplementary file 1.

The antimicrobial susceptibility of (presumptive) commensal *E. coli* isolates, which are considered as indicator bacteria for antimicrobial resistance in food according to the European Food Safety Authority (EFSA), the single STEC isolate, and confirmed ESBL-producing Enterobacterales were tested against 16 antimicrobials (Supplementary file 1).

For *S. aureus* isolates, antimicrobial susceptibility testing was done with 14 antimicrobials (Supplementary file 1), while testing of *L. monocytogenes* isolates was conducted against 11 agents (Supplementary file 1).

Antimicrobial susceptibility testing of *Salmonella* spp. was performed at the BfR, Berlin, Germany by using the broth microdilution method with 14 antimicrobials (Supplementary file 1).

2.8 Genomic characterization of bacterial isolates and detection of resistance genes

All *L. monocytogenes*, *S. aureus*, and STEC isolates were subjected to whole-genome sequencing (WGS) (MicrobesNG, University of Birmingham, UK). Sequences were uploaded to Genbank and are accessible via BioProject PRJNA1075500 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/1075500>).

To determine the multilocus sequence type (MLST), clonal complexes (CC), and serovars of *L. monocytogenes* isolates, the Institute Pasteur *L. monocytogenes* database was used (<https://bigsd.bpasteur.fr/listeria/>, last accessed 5 March 2023) (Moura et al., 2016). To identify the MLST and CC of *S. aureus* isolates, the PubMLST *Staphylococcus aureus* typing database was used (<https://pubmlst.org/organisms/staphylococcus-aureus>, last accessed 28 February

2023) (Jolley et al., 2018). For *spa*-typing and SCCmec determination spaTyper 1.0 (<https://cge.food.dtu.dk/services/spaTyper>, last accessed 28 February 2023) and SCCmecFinder 1.2 (<https://cge.food.dtu.dk/services/SCCmecFinder/>, last accessed 24 February 2023) were used.

For MLST and serotype prediction of the STEC isolate, the genome sequence was uploaded to the Enterobase *Escherichia/Shigella* database (<http://enterobase.warwick.ac.uk/>, last accessed on 2 February 2023, where isolate Fs24 is listed under accession number traces-0CsjWHn).

Virulence Finder 2.0 (<https://cge.food.dtu.dk/services/VirulenceFinder/>, last accessed on 21 March 2023) and ResFinder 4.1 (<https://cge.food.dtu.dk/services/ResFinder/>, last accessed on 24 March 2023) were used to determine the presence of antimicrobial resistance genes, mutations in resistance genes, and virulence-associated factors, respectively, in *L. monocytogenes*, *S. aureus* and STEC isolates subjected to genome sequencing (Joensen et al., 2014; Florensa et al., 2022).

Based on the results of the antimicrobial susceptibility testing by disk diffusion, all confirmed ESBL-producing *Enterobacteriaceae* and *E. coli* isolates showing phenotypic resistance to at least one of the antibiotics tested, were screened for the presence of corresponding resistance genes. For this, previously described PCR primers and protocols were used. The PCR assays included genes encoding for β -lactamases (*bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{BOR-1}, *bla*_{OXA-1}, *bla*_{OXA-2}, and *bla*_{ROB}) (Dallenne et al., 2010; Randall et al., 2014), tetracycline resistance mediating genes *tet*(A), *tet*(B), *tet*(C), *tet*(D), *tet*(E), *tet*(G), *tet*(H), *tet*(L), *tet*(M), and *tet*(O), as well as trimethoprim resistance genes *dfrA1/15/16*, *dfrA5/14*, *dfrA7/17*, *dfrA12*, and *dfrB1/2/3* (Müller et al., 2018a; Grape et al., 2007). In addition, isolates were screened for the presence of the sulfonamide resistance genes *sul1*, *sul2*, and *sul3*, and streptomycin resistance genes *strA*, *strB*, *aadA1* and *aadA2* (Müller et al., 2018a; Prüller et al., 2015). Furthermore, we investigated the occurrence of phenicol resistance genes *cmlA*, *catA1*, *catA2*, *catA3*, *catB2*, *catB3*, as well as of plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) genes *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS*, and *aac(6')-Ib-cr* (Müller et al., 2018a). Isolates phenotypically resistant to quinolones were additionally screened for the presence of mutations in the quinolone resistance determining regions (QRDRs) of *gyrA*, *gyrB*, *parC*, and *parE* genes by sequence analysis. For this, previously described PCR primers were used and the wild-type *E. coli* K-12 sequence (GenBank accession No. U00096) was used as a reference (Müller et al., 2018b). Amplicons from *gyrA*, *gyrB*,

parC, *parE*, *dfrA5/14*, *dfrA7/17*, *bla_{CTX-M}*, *bla_{SHV}* and, *bla_{TEM}* genes were subjected to sequencing at Eurofins Genomics. Sequence analysis was performed by using the DNAMAN software version 8 (Lynnon Biosoft) and the BLAST program (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

2.9 Macrorestriction analysis

Genetic relationships among *S. aureus* isolates were examined by macrorestriction analysis after *Sma*I digestion of genomic DNA, followed by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) according to the HARMONY protocol (Murchan et al., 2003). Band patterns were analyzed with BioNumerics software version 7.6 (Applied Maths, Sint-Martens Latem, Belgium) and the Dice coefficient was applied with a setting of 0.5% optimization and 1% position tolerance.

2.10 Phylogenetic grouping

All obtained *E. coli* isolates were assigned to the four major phylogenetic groups (A, B1, B2, and D), with groups A and B1 being presumed commensal *E. coli* and groups B2 and D being presumed pathogenic (Clermont et al., 2000; Doumith et al., 2012). For this, a previously described multiplex PCR method targeting internal fragments of *chuA*, *yjaA*, and TSPE4.C2 were used (Clermont et al., 2000; Doumith et al., 2012; Müller et al., 2018b).

3. Results

3.1 Microbiological analyses

Foodborne pathogens (*Salmonella* spp., *L. monocytogenes*, *S. aureus*, and STEC) were detected in 17 of the 100 samples collected for this study (Table 2). Three meat samples (fat with raw meat, dried meat and raw sausage) were positive for *Salmonella* spp. (Table 2). For one of these meat samples limits were set in European Regulation No. 2073/2005 and detection of *Salmonella* spp. is regarded as not acceptable for this product (raw sausage) produced for the European market. In three samples including one cheese and two raw beef samples, *L. monocytogenes* was detected (Table 2). The one cheese sample that was tested positive for *L. monocytogenes* would be considered satisfactory according to European Regulation No. 2073/2005 in a sample legally produced for the EU market as the detected value was below 2.0 cfu/g (Table 2). For raw beef, however, there are no European quantitative limit values defined, but

both samples would not be regarded as acceptable according to the DGHM critical values (Table 2). Microbiological analysis also revealed the presence of *S. aureus* in 11% (11/100) of the samples, with two individually packaged Turkish brine matured cheese samples failing to comply with the critical values for coagulase-positive staphylococci, including *S. aureus* defined by DGHM (Table 2). The highest quantitative *S. aureus* counts were found in a sample from Syria (fat with raw meat) with 5.23 log₁₀ cfu/g and in a sample imported from Turkey (dried meat) with 6.23 log₁₀ cfu/g, but no European limit values or DGHM values have been set for these food categories. The *S. aureus* detection values of the other samples are listed in Table 2. As a result of the microbiological analysis of one of the samples, visible colony growth was detected on CHROMagar™ MRSA (Mast Diagnostica GmbH) and one of the colonies was tested for resistance to ceftaxime. The isolate (Fa12) indeed showed phenotypic resistance to ceftaxime and was considered as MRSA (Fig. 1).

One sample (F24) of sheep fat with a small proportion of meat originating from Syria tested positive for STEC. This sample yielded colonies on CHROMagar STEC™ and on TBX agar plates, which showed a blue green color formation (Table 2). The same sample was also positive for *S. aureus*.

From nine samples, visible colony growth was obtained on ESBL-screening plates, with all colonies showing a pink color formation. While the growth of larger colonies (>1-1.5 mm) was observed in seven samples, two samples showed the growth of small colonies (<0.5 mm) despite the same incubation time and temperature. From each agar plate, one colony was picked and subjected to ESBL-confirmatory testing by the broth microdilution method. Four isolates, including both isolates forming smaller colonies, did not show resistance against the tested cephalosporins. They had minimal inhibitory concentration (MIC) values of ≤2 µg/ml for cefepime, ≤4 µg/ml for ceftazidime, and ≤1 µg/ml for cefotaxime, and were thus classified as susceptible. The remaining five isolates showed a phenotype indicative for ESBL-production. There was a reduction of the MICs by ≥3 dilution steps for at least one of the cephalosporins tested when comparing MICs with and without the addition of clavulanic acid. However, carbapenem resistance was not seen in any of the isolates tested in this study. The species identification of the detected ESBL-producers showed that four isolates were *E. coli* and one was *Klebsiella pneumoniae* (Table 3).

Microbiological analyses of the hygienic status of the 100 food samples showed that the ACC ranged between 1.26 log₁₀ cfu/g and 9.76 log₁₀ cfu/g in meat products, with a

median value of 7.19 log₁₀ cfu/g (Table 4). In dairy products, the ACC ranged from 1.48 log₁₀ cfu/g to 9.08 log₁₀ cfu/g, with a median value of 6.32 log₁₀ cfu/g. The highest ACC values were detected in a cooked poultry sample (9.76 log₁₀ cfu/g) and in a brine matured cheese (9.08 log₁₀ cfu/g), both originating from Turkey (Table 4). DGHM guidance values were available for 29 of the 60 meat and meat products tested and 21 of the samples surpassed these values (Table 4).

The detection frequency of Enterobacterales was 36% (Table 4). The detection levels of Enterobacterales in dairy products ranged from 2.50 log₁₀ cfu/g to the highest value of 7.20 log₁₀ cfu/g in a Turkish individually packaged brine matured cheese. Considering the critical values of the DGHM, which were defined for 12 out of 40 confiscated dairy products, five samples did not comply with these (Table 4). In meat products, the detection levels of Enterobacterales ranged from 2.77 log₁₀ cfu/g to the highest value of 7.46 log₁₀ cfu/g in a Turkish individually packaged cooked beef sample. Taking into account the recommendations of the DGHM, which were specified for 56 of the 60 meat samples, a total of 23.2% (13/56) exceeded the critical value (Table 4). All but one sample (92.3%, 12/13) were individually packaged and more than a third of these (38.5%, 5/13) were imported from Moldova.

Escherichia coli were detected in 23% of the samples (Table 4). In dairy products, *E. coli* counts ranged between 1.73 log₁₀ cfu/g and 5.23 log₁₀ cfu/g, with the highest value found in a Turkish brine matured cheese. Considering the limits set for *E. coli* for products on the EU-market, for 36 of the 40 dairy products limits were set and a total of seven (7/36) samples failed to fulfill these limits (Table 4). Of these, six out of seven samples were imported from Turkey and all but one of these six samples were individually wrapped. The only exception was one sample of a Moldavan brine matured cheese. However, it should be noted that the majority of the 40 dairy product samples included in this study were from Turkey (n=29). In meat products, detection levels of *E. coli* ranged from 2.77 log₁₀ cfu/g to 4.97 log₁₀ cfu/g. Considering the DGHM critical values, recommendations were specified for 49 of the 60 samples, and two samples of raw sausages and two samples of raw meat would not comply with the criteria (Table 4). An overview over all samples and the microbiological results of these samples can be found in Supplementary file 2.

3.2 Statistical analyses

Statistical analyses revealed a positive correlation between the detection of Enterobacteriales or *E. coli* and the detection of pathogens (*L. monocytogenes*, *Salmonella* spp. and *S. aureus*) in the tested samples (Chi-square test $p=0.0001$ and Fisher's exact test $p=0.0223$, respectively). In addition, individually wrapped samples were more frequently contaminated with Enterobacteriales and *E. coli* than samples in an original commercial packaging (Chi-square test $p=0.002$, $p=0.004$). Furthermore, samples originating from Southwest Asia (which represented the largest proportion of the samples) were more frequently contaminated with Enterobacteriales and *E. coli*, compared to seizures from Southeast Asia, Central Asia, Africa or Eastern Europe (Chi-square test $p=0.0187$, Fisher's exact test $p=0.0017$).

No correlation was observed between the detection frequencies of Enterobacteriales and *E. coli* and the type of food (meat and meat products or dairy products). Overall, statistical analysis showed no statistically significant correlation between individually packaged samples and the detection of pathogens, or between the detection of pathogens and the origin of the sample or the food type.

3.3 Genomic characterization of detected pathogens

The single MRSA isolate carried the *mecA* gene (Fig. 1). Analysis of WGS data of this isolate and the remaining methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA) isolates ($n = 10$) allowed to classify them into ten different MLS-types and ten different *spa*-types as shown in Figure 1. Two MSSA isolates were assigned to ST15 and one isolate to a new MLS-type (ST8323), harboring a new allele of one of the housekeeping genes (*ygiL*) (Fig. 1). Derived from results of MLST, *S. aureus* isolates belonged to five clonal complexes: CC1 ($n = 2$), CC5 ($n = 1$), CC8 ($n = 2$), CC15 ($n = 2$), CC97 ($n = 3$), while one isolate was classified as a singleton (Fig. 1). Further characterization of the single MRSA isolate (ST1/CC1/t127) indicated the presence of staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) IV. *S. aureus* carrying Panton-Valentin Leukocidin (PVL) genes were not detected in the course of this study.

The WGS results revealed that all *S. aureus* isolates included were positive for at least one staphylococcal enterotoxin (SE) gene, and all carried *sea*. Further enterotoxin genes detected include *sed* ($n = 4$), *seh* ($n = 1$), *sec* ($n = 1$), *seg* ($n = 1$) and *see* ($n = 1$) (Fig. 1). The toxic shock syndrome toxin gene (*tsst1*) was detected in one isolate. Additionally, all *S. aureus* harbored the *hly* gene (encoding for β -hemolysin) and the

LukDv, and *LukEv* genes (encoding for leucotoxin). Moreover, all isolates carried at least one gene belonging to the immune evasion cluster (IEC) (*scn*, *sak* and *chp*), of which the *scn* gene (encoding for staphylococcal complement inhibitor) was detected in all *S. aureus* tested. The *sak* gene (encoding for staphylokinase) and *chp* gene (encoding for chemotaxis inhibiting protein) were identified in five and three isolates, respectively (Fig. 1). Macrorestriction profiles indicated that two isolates, both belonging to CC97/t521, were closely related (95% similarity) (Fig. 1). In total, results of genomic characterization were very heterogeneous leading to different PFGE patterns (Fig. 1)

Analysis of *L. monocytogenes* WGS data revealed that all isolates belonged to lineage II/serotype 1/2a, but to three different CC and ST. One isolate (isolate Fm42, Table 2) from a cheese sample was assigned to ST425 (CC90), whereas one *L. monocytogenes* isolate (Fm41, Table 2) from raw meat was assigned to ST8 (CC8). Both samples originated from Armenia. The third *L. monocytogenes* isolate (Fm69, Table 2) recovered from raw meat from Kazakhstan was assigned to ST 121 (CC121). *Listeria* Pathogenicity Island 1 (LIPI-1), essential for cell invasion and intracellular growth, was detected in all three isolates.

Phylogenetic grouping results of presumed commensal *E. coli* isolates (n = 23) assigned 16 to group A, six isolates to group B1 and one isolate, recovered from sheep fat originating from Lebanon, to group D. Three out of four of the ESBL-producing *E. coli* belonged to group A, while one isolate belonged to group B1 (Table 3). The single STEC isolate detected in this study belonged to phylogenetic group B1 (Table 3). Further examinations of the STEC isolate revealed the presence of the *stx1c* and *stx2b* genes but the absence of the *eae* gene. Based on WGS data, the isolate belonged to serotype O43:H2 and ST937. The fitness and virulence-associated factors *ehxA*, *iss* and *ipfA* were also detected.

All *Salmonella* spp. isolates were confirmed as *Salmonella enterica* subsp. *enterica* and serotyping revealed that isolates belonged to three different serovars. One isolate (Fsal 6, Table 2) recovered from fat with raw meat originated from Lebanon was identified as *S. Uganda*. The second isolate (Fsal 10, Table 2), recovered from dried meat introduced from Sudan belonged to the serovar *Altona*. The third isolate (Fsal 38, Table 2) obtained from a raw sausage, originating from Moldova, belonged to serovar *Rauform*.

3.4 Resistance phenotypes and genotypes

Resistance phenotypes and genotypes of *S. aureus* isolates are shown in Fig 1. The MRSA isolate and two MSSA isolates were classified as multiresistant by exhibiting resistance to three or more antimicrobial agents. The most frequent resistance was to penicillin (n = 6), which was mediated by the gene *blaZ* in all cases. There were two isolates each resistant to tetracycline, gentamicin and erythromycin, while resistances to other antimicrobials were only detected in single isolates. Resistance to macrolides and streptogramins, mediated by the *msr(A/B)*, gene were observed in one isolate. This isolate was also phenotypically resistant to clindamycin, but no corresponding resistance genes could be detected. Analysis of WGS data with ResFinder 4.1 revealed mutations in *gyrA* and *grlA* genes in comparison to the respective wild type sequence, resulting in a Ser84Leu and Ser80Phe amino acid substitution in one isolate, which is in accordance with its phenotypic resistance to ciprofloxacin (Wang et al., 1998; Gootz et al., 1999; Florensa et al., 2022). This isolate also carried the *sat4* gene, which confers resistance to streptothricin, while phenotypic resistance to this agent was not tested.

Five of the 23 presumed commensal *E. coli* isolates were phenotypically resistant to at least one of the antimicrobial agents tested and three isolates were classified as multiresistant (Table 3). The most common resistance was to tetracycline (n = 5), and *tet(B)* was detected in all five isolates, of which one isolate also carried the *tet(A)* gene. Resistance to ampicillin was detected in one of the presumptive commensal *E. coli* isolates, but this isolate did not exhibit resistance to third-generation cephalosporins such as cefpodoxime. Resistance to sulfonamides was exhibited by three of the *E. coli* isolates, and all of these carried *sul2*. One of these isolates was also resistant to trimethoprim and sulfamethoxazole/trimethoprim when tested in combination and carried the *dfrA14* gene. Resistance to other classes of antimicrobials among presumptive commensal *E. coli* isolates included quinolones and aminoglycosides, as listed in Table 3. The single STEC isolate detected in this study was phenotypically resistant to nalidixic acid, but did not carry a gene associated with plasmid-mediated quinolone resistance. It did not exhibit phenotypic resistance to any of the other agents tested.

As expected, all ESBL-producing Enterobacterales isolates (n = 5) were phenotypically resistant to ampicillin, cefazolin, and cefpodoxime, and all isolates harbored at least one *bla_{CTX-M}* gene (Table 3). In addition to the *bla_{CTX-M}* genes, three *E. coli* isolates

(Fe22, Fe53 and Fe72) also carried *bla*_{TEM-1} and the single *Klebsiella pneumoniae* isolate (Fe60) also carried *bla*_{SHV-168}. One ESBL-producing *E. coli* isolate (Fe45) only carried *bla*_{CTX-M-1}, without harboring any other β -lactamase genes. The most frequent resistance among the ESBL isolates besides β -lactams was to sulfonamides (n = 4) and streptomycin (n = 4), mediated by *strA* and *strB* in three isolates, which was also detected in two presumed commensal *E. coli* isolates (Fc48 and Fc53). One ESBL-producing *E. coli* isolate (Fe72) only harbored *strA*. As was the case for the presumptive commensal *E. coli*, *sul2* was present in all four isolates resistant to sulfonamides, in one case in addition to *sul1*. Trimethoprim-resistance was observed in three of these ESBL-producing Enterobacterales isolates (Table 3). Resistance to tetracycline was exhibited by three ESBL-producing Enterobacterales isolates, with one isolate carrying only *tet(B)*, one isolate harboring only *tet(A)*, while in one isolate both, *tet(A)* and *tet(B)*, could be detected. Resistance to other classes of antibiotics, such as phenicoles and quinolones, was detected in single isolates as shown in Table 3. The MIC of colistin was of ≤ 1 $\mu\text{g/ml}$ for all *E. coli* isolates tested in this study (data not shown). In total, one presumed commensal *E. coli* isolate (Fc48) and one ESBL-producing *E. coli* isolate (Fe22) showed resistance to quinolones, and a Ser83Leu substitution in *gyrA* could be observed in both isolates. Of these two isolates, the ESBL-producing *E. coli* isolate (Fe22) was phenotypically resistant to ciprofloxacin in addition to nalidixic acid and carried an additional Asp87Asn substitution in *gyrA* as well as Ser80Ile and Ala56Thr substitutions in *parC*.

The *Salmonella enterica* isolates were susceptible to all antimicrobial agents tested. No reduced susceptibility or resistance to the agents tested was observed in the *L. monocytogenes* isolates in this study either, and WGS analyses of *L. monocytogenes* did not reveal the presence of resistance determinants.

4. Discussion

Although the number of annual passengers worldwide has decreased from 4.5 billion in 2019 to 2.3 billion in 2021 due to the Covid-19 pandemic, an increase is expected in the coming years and, thus, the amount of illegally imported food may increase simultaneously (ICAO, 2021). As these imports can constitute a source of zoonotic and multiresistant bacteria with uncommon genotypes, genomic characterization of the isolates is of concern, to assess the risk of a global spread of such strains. In this work, most of the food seizures originated from Southwest Asia (47%), particularly from

Turkey (39%). In total, the hygienic status of all samples was poor. The bacterial isolates obtained showed a wide diversity of genotypes and antimicrobial resistance patterns.

The most commonly detected pathogen was *S. aureus* (11% and a single MRSA). While none of the isolates belonged to the predominant livestock-associated CC398 in Western Europe, three isolates were assigned to CC97, which is widely distributed in Europe in pigs and cattle (Leijon et al., 2021; Bruce et al., 2022; Smyth et al., 2009; Matuszewska et al., 2022). These findings may be relevant to consumer health, as CC97-associated human infections have been reported worldwide, suggesting occasional zoonotic transfer, in particular between food-producing animals and humans in close contact to them (Schmidt et al., 2017; Udo et al., 2011). This assumption is supported by the fact that a livestock-origin of human pandemic CC97 MRSA strains was documented, which resulted in two occurring human epidemic CC97 CA-MRSA clones (Spoor et al., 2013; Feltrin et al., 2016).

Most interestingly, the newly described ST8323 obtained in one MSSA isolate belonged to CC97. This finding indicates a potential reservoir of novel genotypes of potentially pathogenic clonal complexes in this source, which may pose a risk of dissemination via these products. The remaining isolates were assigned to CC1, CC5, CC8, and CC15, which are common clonal complexes, found in humans and animals worldwide (Dabul and Camargo, 2014; Monecke et al., 2011; Wu et al., 2018). All isolates carried at least one gene of the IEC cluster, and these genes are not commonly associated with animal-adapted lineages, which indicates human contamination of our samples and could be a result of improper handling in terms of hygiene measures (Benito et al., 2014; Nepal et al., 2021). The obtained CC1-IV-t127-MRSA is described as epidemic in Europe and studies reported the detection of this clone in isolates of livestock origin with characteristics similar to the human clade, including the presence of *scn* and *sak* (Alba et al., 2015; Benito et al., 2014). Most notably, MRSA-CC1-t127 strains have been reported to cause infections in humans in contact with livestock animals, emphasizing the zoonotic capacity of this lineage (Ceballos et al., 2022). Overall, different staphylococcal enterotoxin (SE) genes were detected among the isolates. This is of concern, as the encoded SE toxins are heatstable and can cause staphylococcal food-poisoning (Kadariya et al., 2014; Argudín et al., 2010). Besides this, SEs and the toxic shock syndrome toxin, encoded by *tsst1*, detected in one isolate, are also superantigens, which can lead to potentially fatal systemic disease

(Xu and McCormick, 2012; Thomas et al., 2007). Most notably, the *sea* gene, detected in all isolates, encodes the most common enterotoxin involved in global staphylococcal food-poisoning and is associated with exerting a strong superantigen activity even at extremely low doses (Fisher et al., 2018; Shimamura et al., 2021; Kadariya et al., 2014). Thus, the risk of infection of persons handling the food, cross-contamination, and dissemination of SE-producing *S. aureus* via these imports should not be excluded. In addition, three *S. aureus* isolates were classified as multiresistant and only four isolates were fully susceptible to antibiotics tested (Fig 1). In contrast, half of all *S. aureus* isolates recovered from different POAO illegally imported from third countries into Spain did not show any antimicrobial resistance (Rodríguez-Lázaro et al., 2017). Higher antimicrobial resistance rates than in this study were found by Müller et al. (2016), with multiresistance in 14 out of 23 *S. aureus* isolates, including 8 out of 9 MRSA isolates, recovered from illegally and legally imported meats. These different findings may be related to the fact that most of the food samples in the study by Müller et al., (2016) consisted of poultry meat originating from Egypt, where high MRSA counts in poultry meat have been documented (Sallam et al., 2015). Additionally, we examined various food products imported from different countries, which also may contribute to the differences in our findings, as well as the relatively small number of samples in the studies.

Overall, our results show the risk of foodborne transmission of new lineages such as ST8323, and multiresistant strains of *S. aureus*, including MRSA, due to illegal imports, which may contribute to their spread in the EU.

Regarding antimicrobial resistance, we identified five ESBL-producing Enterobacterales isolates. Four of these isolates carried *bla*_{CTX-M-15} or *bla*_{CTX-M-1}, which are the predominant β -lactamase subtypes found in clinical isolates in Europe (Pietsch et al., 2017; Falgenhauer et al., 2016). Besides this finding of commonly described ESBL genes, we also identified a rarely documented *bla*_{SHV-168} gene in the single *K. pneumoniae* isolate (Chelaghma et al., 2022; Denisuik et al., 2013). Consequently, illegally introduced food products can serve as a vehicle of locally uncommon ESBL-producing Enterobacterales strains with rarely occurring ESBL genes, and may thereby facilitate their dissemination. Furthermore, their ESBL genes can be transferred to other Enterobacterales via horizontal gene transfer. In addition, a variety of other antimicrobial resistances could be detected among the ESBL-producing Enterobacterales. This was also true for the presumptive commensal *E. coli* isolates

with a genotype conferring multiresistance observed in three isolates (3/23, 13%), which is similar to the findings by Nagy et al. (2015) with a presence of 12.4% of multiresistant commensal *E. coli* recovered from illegally introduced food. Overall, the most frequently detected resistances among ESBL-producing Enterobacterales and suspected commensal *E. coli* isolates belong to the most commonly used antibiotics in livestock, such as tetracycline and sulfonamides (OIE, 2023; EMA, 2021). In addition, we identified mutations in the *gyrA* gene in three *E. coli* isolates, which are linked to a decreased susceptibility to quinolones (Hopkins et al., 2005). One ESBL-producing *E. coli* isolate was resistant to nalidixic acid and ciprofloxacin, presumably as a result of a double mutation in the *gyrA* gene and amino acid substitutions Ser80Ile and Ala56Thr in the *parC* gene, as previously described (Marcusson et al., 2009; Guillard et al., 2016; Aworh et al., 2023). This co-resistance to quinolones and third-generation cephalosporins is of concern, as these agents are categorized by the Access, Watch, Reserve (AWaRe) classification defined by the World Health Organization as highest critically important antimicrobials and reserve group antibiotics, respectively (Zanichelli et al., 2023). Moreover, this combined resistance is rarely documented in livestock and food in the EU, and our results highlight that illegal imports can serve as a source of strains with such worrisome resistance patterns (EFSA, 2023). However, the role of this transmission pathway in the spread of both, resistant bacteria and their resistance determinants via horizontal gene transfer, is not completely elucidated.

In total, all but one of the *E. coli* isolates belonged to phylogenetic groups A and B1, which mostly comprise commensals (Dobrindt, 2005; Clermont et al., 2000). In fact, the STEC isolate also belonged to group B1, but the pathogenic potential of this strain cannot be excluded, as *stx1c/stx2b/eae*-negative STEC have been associated with 234 human cases in the EU over a five-year period, with a hospitalization rate of 9% (EFSA, 2020). The obtained serotype O43:H2 is described as livestock-associated, but has also been isolated from humans with mild disease and, most notably, from a hemorrhagic colitis patient in Europe (EFSA, 2022; Eklund et al., 2002; Mag et al., 2010; Johura et al., 2016; Malahlela et al., 2022). Moreover, this isolate carried the virulence-associated genes *ehxA* and *iss*, which are linked to an enhanced pathogenicity in STEC (Naseer et al., 2017). The three obtained *Salmonella enterica* isolates do not belong to the commonly reported salmonellosis serovars in the EU (EFSA, 2022). Notably, one isolate belonged to the rarely documented serovar

Rauform in the EU, which was previously observed in two isolates recovered from illegally conveyed food, which may emphasize the risk of the spread of locally uncommon serovars via these products (Rodríguez-Lázaro et al., 2015).

Regarding further zoonotic pathogens, one of the three obtained *L. monocytogenes* isolates was assigned to ST8, already identified in illegally imported food (Rodríguez-Lázaro et al., 2015; Ciolacu et al., 2016). The risk posed by the cross-border spread of ST8 strains is exemplified as ST8 caused a foodborne outbreak, ongoing from 2015 to 2018, in three EU countries linked to the consumption of contaminated salmon distributed to different EU countries (EFSA, 2022). A total of 12 listeriosis cases have been reported during this outbreak, with four of those resulting in fatalities (EFSA, 2022). Again, our findings illustrate that illegal imports may represent transmission routes of potentially pathogenic strains, and the risk of a global dissemination might occur.

Overall, the high detection frequency of Enterobacterales (36%) and *E. coli* (23%) indicates hygienic deficiencies and fecal contamination in the food samples and 12.9% of the *E. coli*-positive samples for which EU-limit or DGHM critical values were defined ($n = 85$), exceeded those (Buchanan, 2000; Ghafir et al., 2008). Similar results have previously been reported in illegally imported food in another study, with 11.2% of samples exceeding *E. coli* EU limit values (Nagy et al., 2015). These results can be explained as most of the illegally imported foods were homemade, poorly packaged, unrefrigerated during transport, and thus suspected of not complying with the strict hygienic requirements applied to commercially produced foods.

5. Conclusion

In summary, although illegally imported food is primarily intended for personal consumption and therefore affects a small group of consumers, there is nevertheless a risk of cross-contamination, colonization and infection of people handling the food. In addition, even though we did not detect *Salmonella* spp. serovars or STEC serotypes commonly regarded as highly pathogenic, and the MRSA prevalence was low, our results suggest that these imports constitute a reservoir for *Salmonella* spp. and STEC and potentially pathogenic bacterial isolates, such as *L. monocytogenes* ST8 and newly described genotypes, such as *S. aureus* ST8323, as well as for multidrug-resistant *S. aureus*, and ESBL-producing Enterobacterales. Consequently, there is a potential risk of transmission of resistance genes and a global spread of

pathogenic and/or multiresistant clones with partly uncommon genotypes via these products.

However, it should be noted that other routes of spreading multidrug-resistant bacterial pathogens were not considered in this study and transmission through illegally imported food only accounts for a small proportion. Furthermore, we focused on common foodborne bacterial pathogens and other frequently multidrug-resistant bacterial species such as *Acinetobacter* spp. were not considered in this work. Further studies with a broader spectrum of bacteria would therefore be interesting to assess the presence of multidrug-resistant bacteria in illegally imported food.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

We sincerely thank Cornelia Dürschmidt, Jan Hendrik Paulus, Karin Simon and Claudia Walter for their expert technical support. Further, we would like to thank the German Federal Institute for Risk Assessment (BfR) in Berlin for their confirmation and serotyping of *Salmonella enterica* isolates within this study. We declare no conflicts of interest.

Appendix A. Supplementary data

The following is the supplementary data to this article.

4. Publikationen

Tables

Table 1. Detailed information on the seized food products illegally imported into the EU

Country of origin	Number of samples	Number of samples classified by category of food products, packaging, and processing status.					
		Category of food products		Packaging		Processing status	
		Meat / meat products	Dairy products	Industrial ^a	Individual ^b	Ready-to-eat	Raw ^c
Southwest Asia							
Turkey	39	10	29	9	30	36	3
Lebanon	3	2	1	1	2	2	1
Syria	2	2			2		2
Armenia	2	1	1		2	1	1
Iran	1		1		1		1
Total	47	15	32	10	37	39	8
Southeast Asia							
Thailand	7	7		3	4	7	
Vietnam	7	7		7		7	
India	1		1	1		1	
Korea	1	1			1	1	
Taiwan	1	1			1	1	
Total	17	16	1	11	6	17	
Eastern Europe							
Moldova	15	11	4	5	10	11	4
Total	15	11	4	5	10	11	4
Central Asia							
Kazakhstan	14	13	1	1	13	6	8
Total	14	13	1	1	13	6	8
Africa							
Ethiopia	1	1			1		1
Marocco	2	2		1	1	2	
Uganda	2	1	1		2	2	
Sudan	2	1	1		2	2	
Total	7	5	2	1	6	6	1
Samples in total	100	60	40	28	72	79	21

^aFood prepared as for sale in a retail market and labelled with a product description and further information such as the animal species, the weight, the list of ingredients and the minimum shelf life date. ^bFood produced at home without product description or further information. ^cRaw or a further processing step is intended.

4. Publikationen

Table 2. Detection of *Salmonella enterica*, STEC, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* isolates in food products illegally imported into the EU.

Sample	Isolate	Bacterial pathogen	Food source / animal	Country of origin	Packacking	Detection in samples (log ₁₀ cfu/g ^a)	Limit values by DGHM ^b / critical values in Regulation (EU) No. 2073/2005 ^c (log ₁₀ cfu/g ^a)
F6	Fsal6	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i>	Fat with raw meet / Sheep	Lebanon	Individual ^d	Qualitative detection in 25 g	ND ^e
F10	Fsal10	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i>	Dried meat / Bovine	Sudan	Individual	Qualitative detection in 25 g	
F38	Fsal38	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i>	Raw sausage / Pork	Moldova	Individual	Qualitative detection in 25 g	
F24	Fs24	STEC	Fat with raw meet / Sheep	Syria	Individual	Qualitative detection in 25 g	ND
F42	Fm42	<i>L. monocytogenes</i>	Cheese ^f / Bovine	Armenia	Industrial ^g	1.79	2.0 ^c
F41	Fm41	<i>L. monocytogenes</i>	Raw meat / Bovine	Armenia	Individual	2.11	2.0 ^b
F69	Fm69	<i>L. monocytogenes</i>	Raw meat / Bovine	Kazakhstan	Individual	2.61	
F24	Fs24	<i>S. aureus</i>	Fat with raw meat / Sheep	Syria	Individual	5.23 ^k	ND
F61	Fs61	<i>S. aureus</i>	Raw meat / Poultry	Moldova	Individual	2.32 ^k	3.7 ^{b,h}
F12	Fs12 ^l	<i>S. aureus</i>	Fat / Sheep	Turkey	Individual	4.46 ^k	ND
F29	Fs29	<i>S. aureus</i>	Brine matured cheese / NT ⁱ	Turkey	Industrial	2.69 ^k	3.0 ^{b,h}
F8	Fs8	<i>S. aureus</i>	Brine matured chesse / NT	Turkey	Individual	3.60 ^k	
F32	Fs32	<i>S. aureus</i>	Cheese / NT	Moldova	Individual	2.30 ^k	ND
F52	Fs52	<i>S. aureus</i>	Cheese / NT	Turkey	Individual	2.30 ^k	
F30	Fs30	<i>S. aureus</i>	Raw sausage / Beef	Turkey	Individual	2.43 ^k	4.0 ^{b,h}
F14	Fs14	<i>S. aureus</i>	Dried meat / Beef	Turkey	Industrial ^f	6.23 ^k	ND
F63	Fs63	<i>S. aureus</i>	Raw meat / Poultry	Kazakhstan	Individual	3.60 ^k	3.7 ^{b,h}
F77	Fs77	<i>S. aureus</i>	Brine matured cheese / NT	Turkey	Individual	5.04 ^k	3.0 ^{b,h}

4. Publikationen

^aValues in colony forming units/gram (cfu/g) transformed into log₁₀. ^bAccording to critical values defined by DGHM. ^cAccording to limits set in Regulation (EU) No. 2073/2005. ^dIndividual packaging (homemade) without product description or any further information. ^eND = for this type of food no limits or critical values are defined in Regulation (EU) No. 2073/2005 or by DGHM. ^fOther than brine matured cheese or cream cheese. ^gFood prepared as for sale in a retail market and labelled with a product description, list of ingredients and the minimum shelf life date. ^hCritical values defined by DGHM were set for coagulase-positive staphylococci, including *S. aureus*. ⁱNot typeable. ^kThe detection rate refers to all coagulase-positive staphylococci, including *S. aureus*. ^lMethicillin-resistant *S. aureus*

4. Publikationen

Table 3. Genotypic and phenotypic characterization of presumed commensal *E. coli*, STEC, and ESBL-producing Enterobacterales isolates.

Isolate number	Species	Food origin	Animal species	Country	Phylogenetic group	Resistance phenotype ^a	Resistance genotypes	
							β -lactamase type	Other resistance genes
Fc10	<i>E. coli</i> ^d	Dried meat	Bovine	Sudan	B1	AMP, TET, SUL, SXT, TRI	TEM-1	<i>tet(A), tet(B), sul2, drfA14</i>
Fc48	<i>E. coli</i> ^d	Raw meat	Poultry	Turkey	B1	TET, SUL, STR, NAL	-	<i>tet(B), sul2, strA, strB</i>
Fc53	<i>E. coli</i> ^d	Brine matured cheese	NT ^b	Turkey	A	TET, SUL, STR	-	<i>tet(B), sul2, strA, strB</i>
Fc77	<i>E. coli</i> ^d	Brine matured cheese	NT	Turkey	A	TET	-	<i>tet(B)</i>
Fc78	<i>E. coli</i> ^d	Brine matured cheese	NT	Turkey	A	TET	-	<i>tet(B)</i>
Fs24	<i>E. coli</i> (STEC)	Fat with raw meat	Sheep	Syria	B1	NAL	-	-
Fe22	<i>E. coli</i> ^c	Cream cheese	NT	Turkey	A	BLA, TET, SUL, SXT, TRI, STR, NAL, CIP, CHL	CTX-M-1, TEM-1	<i>tet(A), tet(B), sul2, drfA17, strA, strB, catA1</i>
Fe45	<i>E. coli</i> ^c	Dried meat	Pork	Kazakhstan	B1	BLA, TET	CTX-M-1	<i>tet(B)</i>
Fe53	<i>E. coli</i> ^c	Brine matured cheese	NT	Turkey	A	BLA, TET, SUL, SXT, TRI, STR, CHL	CTX-M-3, TEM-1	<i>tet(A), sul1, sul2, strA, strB, catA1</i>
Fe60	<i>K. pneumoniae</i> ^c	Raw meat	Poultry	Moldova	-	BLA, SUL, STR	CTX-M-15, SHV-168	<i>sul2, strA, strB</i>
Fe72	<i>E. coli</i> ^c	Brine matured cheese	NT	Turkey	A	BLA, SUL, SXT, TRI, STR	CTX-M-15, TEM-1	<i>sul2, strA</i>

^aAMP = ampicillin, BLA = β -lactams, CHL = chloramphenicol, CIP = ciprofloxacin, NAL = nalidixic acid, STR = streptomycin, SUL = compound sulfonamides, SXT = trimethoprim/sulfamethoxazole, TRI = trimethoprim, TET = tetracycline. ^bNT = not typeable. ^cIsolates were confirmed as ESBL-producing Enterobacterales. ^dThe table includes the five presumably commensal *E. coli* with antimicrobial resistance.

4. Publikationen

Table 4. Aerobic mesophilic colony counts (ACC), Enterobacterales, and *E. coli* detected in the confiscated food products.

Hygienec indicator microorganisms	Category of food products	Number of positive samples	Range (log ₁₀ cfu/g) (Min. - Max.)	Limit values (log ₁₀ cfu/g)	Samples that surpass limits
ACC	Dairy products				
	Brine matured cheese	11/11	5.00 - 9.08	ND ^a	-
	Other cheese	16/16	1.48 - 8.99		-
	Butter	9/9	2.08 - 6.84		-
	Sour cream	1/1	7.38		-
	Milk powder	1/1	1.95		-
	Cream cheese	2/2	4.30, 5.20		-
	sum	40/40			-
	Meat and Meat products				
	Fat	4/4	5.85 - 8.94	ND	-
	Dried meat	7/7	2.93 - 7.41	ND	-
	Cooked meat	7/7	3.80 - 9.76	6.0 ^b	5/7
	Raw meat	16/16	4.43 - 9.00	6.7 ^b	10/12 ^e
	Raw sausage	16/16	1.26 - 8.97	ND	-
	Other sausage	10/10	2.46 - 8.79	6.7 ^b	6/10
	sum	60/60			21/29
	in total	100/100^f			21/29
Enterobacterales	Dairy products				
	Brine matured cheese	8/11	2.94 - 7.20	4.0 ^c	5/11
	Other cheese	6/16	2.50 - 4.81	ND	-
	Butter	1/9	6.20	ND	-
	Sour cream	0/1	-	ND	-
	Milk powder	0/1	-	1.0 ^c	0/1
	Cream cheese	1/2	2.90	ND	-
	sum	16/40			5/12
Meat and Meat products					
Fat	3/4	5.18 - 6.26	ND	-	

4. Publikationen

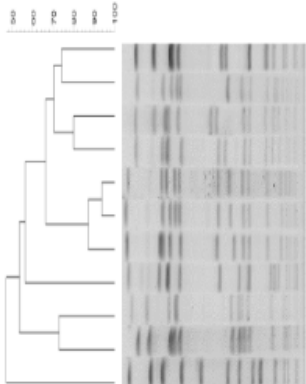
	Dried meat	3/7	5.57 - 7.15	3.7 ^c	3/7
	Cooked meat	2/7	6.15, 7.46	3.7 ^c	2/7
	Raw meat	8/16	2.77 - 6.18	5.0 ^c	4/16
	Raw sausage	3/16	3.84 - 7.08	3.0 ^c	3/16
	Other sausage	1/10	5.34	4.0 ^c	1/10
	sum	20/60			13/56
	in total	36/100			18/68
<i>E. coli</i>	Dairy products				
	Brine matured cheese	8/11	2.36 - 5.23	3.0 ^d	6/11
	Other cheese	4/16	1.85 - 3.04		1/16
	Butter	1/9	1.73	2.0 ^d	0/9
	Sour cream	0/1	-	ND	-
	Milk powder	0/1	-	ND	-
	Cream cheese	0/2	-	ND	-
	sum	13/40			7/36
	Meat and Meat products				
	Fat	2/4	3.48, 3.57	ND	-
	Dried meat	2/7	4.80, 4.97	ND	-
	Cooked meat	0/7	-	2.0 ^c	0/7
	Raw meat	4/16	3.41 - 4.18	3.7 ^c	2/16
	Raw sausage	2/16	2.77, 2.83	2.0 ^c	2/16
	Other sausage	0/10	-	2.0 ^c	0/10
	sum	10/60			4/49
	in total	23/100			11/85

^aNo limits defined according to Regulation (EU) No. 2073/2005 and no critical values available according to DGHM. ^bFor ACC, there are no EU limits or DGHM critical values defined for the food products tested in this study, so the guidance values by DGHM were used for evaluation. ^cCritical values defined by DGHM. ^dLimits set by Regulation (EU) No. 2073/2005. ^eOnly for raw poultry, raw pork and raw lamb meat guidance values for ACC by DGHM were defined, while for raw beef meat no guidance values for ACC are available. ^fPositive samples are expected for the ACC parameter and the focus is on quantitative interpretation.

Figure Legend

Fig 1. Molecular typing results, antimicrobial resistance phenotypes and genotypes and the occurrence of major virulence-associated genes of the obtained eleven *S. aureus* isolates.

^aCIP = ciprofloxacin, CLI = clindamycin, ERY = erythromycin, FOX = ceftiofur, GEN = gentamicin, LIN = linezolid, PEN = penicillin, QDN = quinupristin/dalfopristin, TET = tetracycline, TRI = trimethoprim. ^bAssigned as a new MLS-type. ^cSingelton.

% Similarity	PFGE	Isolate Origin	MLS-type	Clonal complex type	spa-type	Enterotoxin genes	IEC genes	Virulence genes	Resistance phenotype ^a	Resistance genotype	
		Fa24	Syria	ST8	CC8	t8	<i>sea, sed, seg</i>	<i>sak, scn</i>	<i>hly, lukDv/Ev</i>	PEN	<i>blaZ</i>
		Fa61	Moldova	ST789	CC8	t91	<i>sea, see</i>	<i>sak, scn</i>	<i>hly, lukDv/Ev</i>	PEN, GEN, TET, ERY, CIP, TRI	<i>blaZ, aphA3, tet(K), ermC, dfrG, sat4</i>
		Fa12	Turkey	ST1	CC1	t127	<i>sea, seh</i>	<i>sak, scn</i>	<i>hly, lukDv/Ev</i>	PEN, GEN, TET, FOX	<i>blaZ, aphA3, ant(6)-Ia, tet(K), mecA</i>
		Fa29	Turkey	ST188	CC1	t189	<i>sea</i>	<i>sak, chp, scn</i>	<i>hly, lukDv/Ev</i>	-	-
		Fa8	Turkey	ST2826	CC97	t521	<i>sea, sed</i>	<i>scn</i>	<i>hly, lukDv/Ev</i>	ERY, CLI, LIN, QDN	<i>msr(A/B)</i>
		Fa32	Moldova	ST97	CC97	t521	<i>sea, sed</i>	<i>scn</i>	<i>hly, lukDv/Ev</i>	PEN	<i>blaZ</i>
		Fa52	Turkey	ST8323 ^b	CC97	t267	<i>sea, sed</i>	<i>scn</i>	<i>hly, lukDv/Ev</i>	-	-
		Fa30	Turkey	ST6	CC5	t3878	<i>sea</i>	<i>sak, scn</i>	<i>hly, lukDv/Ev</i>	PEN	<i>blaZ</i>
		Fa14	Turkey	ST15	CC15	t346	<i>sea</i>	<i>scn, chp</i>	-	-	-
		Fa63	Kazakhstan	ST15	CC15	t84	<i>sea</i>	<i>scn, chp</i>	<i>hly, lukDv/Ev</i>	PEN	<i>blaZ</i>
		Fa77	Turkey	ST522	- ^c	t1534	<i>sea, sec</i>	<i>scn</i>	<i>tsst1, hly, lukDv/Ev</i>	-	-

References

- Alba, P., Feltrin, F., Cordaro, G., Porrero, M.C., Kraushaar, B., Argudín, M.A., et al. 2015. Livestock-associated methicillin resistant and methicillin susceptible *Staphylococcus aureus* sequence type (CC)1 in European farmed animals: high genetic relatedness of isolates from Italian cattle herds and humans. *PloS one*. 10 (8), e0137143. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137143>.
- Argudín, M.A., Mendoza, M.C., Rodicio, M.R., 2010. Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. *Toxins*. 2, (7), 1751–1773. <https://doi.org/10.3390/toxins2071751>.
- Aworh, M.K., Kwaga, J.K.P., Hendriksen, R.S., Okolocha, E.C., Harrell, E., Thakur, S., 2023. Quinolone-resistant *Escherichia coli* at the interface between humans, poultry and their shared environment - a potential public health risk. *One health outlook*. 5 (1), 2. <https://doi.org/10.1186/s42522-023-00079-0>.
- Bassetti, M., Peghin, M., Vena, A., Giacobbe, D.R., 2019. Treatment of infections due to MDR gram-negative bacteria. *Front. Med.* 6, 74. <https://doi.org/10.3389/fmed.2019.00074>.
- Benito, D., Gómez, P., Lozano, C., Estepa, V., Gómez-Sanz, E., Zarazaga, M., Torres, C., 2014. Genetic lineages, antimicrobial resistance, and virulence in *Staphylococcus aureus* of meat samples in Spain: analysis of immune evasion cluster (IEC) genes. *Foodborne Pathog Dis.* 11 (5), 354–356. <https://doi.org/10.1089/fpd.2013.1689>.
- Beutlich, J., Hammerl, J.A., Appel, B., Nöckler, K., Helmuth, R., Jöst, K. et al., 2015. Characterization of illegal food items and identification of foodborne pathogens brought into the European Union via two major German airports. *Int. J. Food Microbiol.* 209, 13–19. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.10.017>.
- Bruce, S.A., Smith, J. T., Mydosh, J. L., Ball, J., Needle, D. B., Gibson, R., Andam, C.P., 2022. Shared antibiotic resistance and virulence genes in *Staphylococcus aureus* from diverse animal hosts. *Sci. Rep.* 12 (1), 4413. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-08230-z>.
- Buchanan, R. L., 2000. Acquisition of microbiological data to enhance food safety. *J. Food Prot.* 63 (6), 832–838. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-63.6.832>.
- Ceballos, S., Lozano, C., Aspiroz, C., Ruiz-Ripa, L., Eguizábal, P., Campaña-Burguet, A. et al., 2022. Beyond CC398: characterisation of other tetracycline and methicillin-

resistant *Staphylococcus aureus* genetic lineages circulating in Spanish hospitals. *J. Pathog.* 11 (3), 307. <https://doi.org/10.3390/pathogens11030307>.

Chelaghma, W., Loucif, L., Bendjama, E., Cherak, Z., Bendahou, M., Rolain, J.M., 2022. Occurrence of extended spectrum cephalosporin-, carbapenem- and colistin-resistant gram-negative bacteria in fresh vegetables, an increasing human health concern in Algeria. *J. Antibiot.* 11 (8), 988. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11080988>.

Ciolacu, L., Stessl, B., Bolocan, A.S., Oniciuc, E.A., Wagner, M., Rychli, K., Nicolau, A.I., 2016. Tracking foodborne pathogenic bacteria in raw and ready-to-eat food illegally sold at the eastern EU border. *Foodborne Pathog Dis.* 13 (3), 148–155. <https://doi.org/10.1089/fpd.2015.2057>.

Clermont, O., Bonacorsi, S., Bingen, E., 2000. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (10), 4555–4558. <https://doi.org/10.1128/aem.66.10.4555-4558.2000>.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2023. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, M100. 33rd Edition. <https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m100/>. (accessed 10 March 2023).

Dabul, A.N.G., Camargo, I.L.B.C., 2014. Clonal complexes of *Staphylococcus aureus*: all mixed and together. *FEMS Microbiol. Lett.* 351 (1), 7–8. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12358>.

Dallenne, C., Da Costa, A., Decré, D., Favier, C., Arlet, G., 2010. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important beta-lactamases in *Enterobacteriaceae*. *J. Antimicrob. Chemother.* 65 (3), 490–495. <https://doi.org/10.1093/jac/dkp498>.

Denisuik, A.J., Lagacé-Wiens, P.R.S., Pitout, J.D., Mulvey, M.R., Simner, P.J., Taylor, F., et al., 2013. Molecular epidemiology of extended-spectrum β -lactamase-, AmpC β -lactamase- and carbapenemase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from Canadian hospitals over a 5 year period: CANWARD 2007-11. *J. Antimicrob. Chemother.* 68 (1), 57-65. <https://doi.org/10.1093/jac/dkt027>.

DGHM, 2018. German society of hygiene and microbiology. Preamble. Recommendations on target and critical values for microbiological criteria for food. <https://www.dghm-richt-warnwerte.de/de/praeambel>. (accessed 7 March 2023)

DGHM, 2021. Germany society of hygiene and microbiology. Recommendations on guidance and critical values of microbiological values (raw meat). <https://www.dghm-richt-warnwerte.de/de/dokumente/fleisch-roh>. (Accessed 6 March 2023)

DGHM, 2019. Germany society of hygiene and microbiology. Recommendations on guidance and critical values of microbiological values (brine matured cheese). <https://www.dghm-richt-warnwerte.de/de/richt-und-warnwert/dghm-1-3-salzlakekaese/320641195>. (Accessed 5 May 2023)

ISO, 2001. Microbiology of food and animal feeding stuffs – horizontal method for the enumeration of β -glucuronidase-positive *Escherichia coli* – part 2: colony-count technique at 44 °C using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-glucuronide. Vol. 16649, 2:2001.

ISO, 2013a. Microbiology of the food chain – horizontal method for the enumeration of microorganisms – part 2: colony count at 30°C by the surface plating technique. Vol. 4833, 2, 2013.

ISO, 2013b. Microbiology of food and animal feed – real-time polymerase chain reaction (PCR)-based method for the detection of food-borne pathogens – horizontal method for the detection of shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and the determination of O157, O111, O26, O103 and O145 serogroups. Vol. 13136, 2013-04.

ISO, 2014. Microbiology of food and animal feeding stuffs – general requirements and guidance for microbiological examinations. Vol. 7218, 201409.

ISO, 2017a. Microbiology of the food chain – preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination – part 1: general rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions Vol. 6887, 1, 2017.

ISO, 2017b. Microbiology of the food chain – preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination – part 2: specific rules for the preparation of meat and meat products. Vol. 6887, 2, 2017.

ISO, 2017c. Microbiology of the food chain – horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and of *Listeria* spp. – part 2: enumeration method. Vol. 11290, 2, 2017.

ISO, 2017d. Microbiology of the food chain – horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and of *Listeria* spp. – part 1: detection method. Vol. 11290, 1, 2017.

ISO, 2017e. Microbiology of the food chain – horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella* – part 1: detection of *Salmonella* spp. (Vol. 6579, 1, 2017.

ISO, 2019a. Microbiological examination of meat and meat products – determination of Enterobacteriaceae – part 1: spatula method, 10164, 1:2019-06.

ISO, 2019b. Microbiology of food and animal feeding stuffs – horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species) – part 1: technique using baird-parker agar medium. Vol. 6888–1, 2019-06.

Dobrindt, U., 2005. (Patho-)genomics of *Escherichia coli*. *Int J Med Microbiol.* 295 (6-7) 357–371. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2005.07.009>.

Doumith, M., Day, M. J., Hope, R., Wain, J., Woodford, N., 2012. Improved multiplex PCR strategy for rapid assignment of the four major *Escherichia coli* phylogenetic groups. *J. Clin. Microbiol.* 50 (9), 3108–3110. <https://doi.org/10.1128/JCM.01468-12>.

European Food Safety Authority (EFSA), 2022. The European Union one health 2021 zoonoses report. *EFSA J.* 20 (12), e07666. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2022.7666>.

European Food Safety Authority (EFSA), 2020. Pathogenicity assessment of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and the public health risk posed by contamination of food with STEC. <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/5967> (accessed 17 October 2023)

European Food Safety Authority (EFSA), 2023. The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2020/2021. *EFSA J.* 21 (3), e07867. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2023.7867>.

Eklund, M., Leino, K., Siitonen, A., 2002. Clinical *Escherichia coli* strains carrying stx genes: stx variants and stx-positive virulence profiles. *J. Clin. Microbiol.* 40 (12), 4585–4593. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.12.4585-4593.2002>.

EMA, 2021. Sales of veterinary antimicrobial agents in 31 European countries in 2019 and 2020; trends from 2010 to 2020 eleventh ESVAC report. https://health.ec.europa.eu/publications/sales-veterinary-antimicrobial-agents-31-european-countries-2019-and-2020_en (accessed 10 October 2023).

Esteve-Palau, E., Solande, G., Sánchez, F., Sorlí, L., Montero, M., Güerri, R. et al., 2015. Clinical and economic impact of urinary tract infections caused by ESBL-producing *Escherichia coli* requiring hospitalization: a matched cohort study. *J. Infect.* 71 (6), 667–674. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2015.08.012>.

EUCAST, 2023. The European committee on antimicrobial susceptibility testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 13.0, 2023. <http://www.eucast.org>. (accessed 15 June 2023).

Falgenhauer, L., Waezsada, S.-E., Gwozdziński, K., Ghosh, H., Doijad, S., Bunk, B. et al., 2016. Chromosomal locations of *mcr-1* and *bla_{CTX-M-15}* in fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* ST410. *Emerg. Infect. Dis.* 22 (9), 1689–1691. <https://doi.org/10.3201/eid2209.160692>.

Feltrin, F., Alba, P., Kraushaar, B., Ianzano, A., Argudín, M.A., Di Matteo, P. et al., 2016. A livestock-associated, multidrug-resistant, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clonal complex 97 lineage spreading in dairy cattle and pigs in Italy. *Appl. Environ. Microbiol.* 82 (3), 816–821. <https://doi.org/10.1128/AEM.02854-15>.

Fisher, E.L., Otto, M., Cheung, G.Y. C., 2018. Basis of virulence in enterotoxin-mediated staphylococcal food poisoning. *Front. Microbiol.* 9, 436. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00436>.

Florensa, A.F., Kaas, R., Clausen, P.T.L.C., Aytan-Aktug, D., Aarestrup, F. M., 2022. ResFinder - an open online resource for identification of antimicrobial resistance genes in next-generation sequencing data and prediction of phenotypes from genotypes. *Microb. Genom.* 8 (1). <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000748>.

Franco, A., Hasman, H., Iurescia, M., Lorenzetti, R., Stegger, M., Pantosti, A. et al., 2011. Molecular characterization of spa type t127, sequence type 1 methicillin-

resistant *Staphylococcus aureus* from pigs. *J. Antimicrob. Chemother.* 66 (6), 1231–1235. <https://doi.org/10.1093/jac/dkr115>.

Ghafir, Y., China, B., Dierick, K., de Zutter, L., Daube, G., 2008. Hygiene indicator microorganisms for selected pathogens on beef, pork, and poultry meats in Belgium. *J. Food Prot.* 71, 1, 2008, 35–45. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-71.1.35>

Gootz, T.D., Zaniewski, R.P., Haskell, S.L., Kaczmarek, F.S., Maurice, A.E., 1999. Activities of trovafloxacin compared with those of other fluoroquinolones against purified topoisomerases and *gyrA* and *grlA* mutants of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 43 (8), 1845–1855. <https://doi.org/10.1128/aac.43.8.1845>

Grape, M., Motakefi, A., Pavuluri, S., Kahlmeter, G., 2007. Standard and real-time multiplex PCR methods for detection of trimethoprim resistance *df*r genes in large collections of bacteria. *Clin. Microbiol. Infect.* 13 (11), 1112–1118. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01807.x>.

Guillard, T., de Jong, A., Limelette, A., Lebreil, A. L., Madoux, J., de Champs, C., 2016. Characterization of quinolone resistance mechanisms in Enterobacteriaceae recovered from diseased companion animals in Europe. *Vet. Microbiol.* 194, 23–29. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.11.033>.

Hasman et. al., 2015. Laboratory protocol: isolation of ESBL-, *ampC*- and carbapenemase-producing *E. coli* from fresh meat. National Food Institute, Lyngby, Denmark. https://www.eurl-ar.eu/CustomData/Files/Folders/21-protocols/529_esbl-ampc-cpeprotocol-version-meat-v7-09-12-19.pdf. (accessed 19 October 2023).

Hopkins, K.L., Davies, R.H., Threlfall, E.J., 2005. Mechanisms of quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella*: recent developments. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 25 (5), 358–373. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2005.02.006>.

Hussain, M. von Eiff, C., Sinha, B., Joost, I., Herrmann, M., Peters, G., Becker, K., 2008. *eap* gene as novel target for specific identification of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 46 (2), 470–476. <https://doi.org/10.1128/JCM.01425-07>.

International Civil Aviation Organization (ICAO), 2019. The World of Air Transport in 2019. <https://www.icao.int/annual-report-2019/Pages/the-world-of-air-transport-in-2019.aspx>. (accessed 10 June 2023).

Jansen, W., Merkle, M., Daun, A., Flor, M., Grabowski, N. T., Klein, G., 2016. The quantity and quality of illegally imported products of animal origin in personal consignments into the European Union seized at two German airports between 2010 and 2014. *PloS one*. 11 (2), e0150023. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150023>.

Jansen, W., Müller, A., Grabowski, N. T., Kehrenberg, C., Muylkens, B., Al Dahouk, S. 2019. Foodborne diseases do not respect borders: zoonotic pathogens and antimicrobial resistant bacteria in food products of animal origin illegally imported into the European Union. *Vet. J.* 244, 75–82. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2018.12.009>.

Joensen, K.G., Scheutz, F., Lund, O., Hasman, H., Kaas, R.S., Nielsen, E.M., Aarestrup, F.M., 2014. Real-time whole-genome sequencing for routine typing, surveillance, and outbreak detection of verotoxigenic *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 52 (5), 1501–1510. <https://doi.org/10.1128/JCM.03617-13>.

Johura, F.-T., Parveen, R., Islam, A., Sadique, A., Rahim, M.N., Monira, S. et al., 2016. Occurrence of hybrid *Escherichia coli* strains carrying Shiga toxin and heat-stable toxin in livestock of Bangladesh. *Front. Public Health.* 4, 287. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2016.00287>.

Jolley, K.A., Bray, J.E., Maiden, M.C.J., 2018. Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. *Wellcome Open Res.* 3, 24. <https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.14826.1>.

Kadariya, J., Smith, T.C., Thapaliya, D., 2014. *Staphylococcus aureus* and staphylococcal food-borne disease: an ongoing challenge in public health. *BioMed Res. Int.* 2014, 827965. <https://doi.org/10.1155/2014/827965>.

Karch, H. and Meyer, T., 1989. Single primer pair for amplifying segments of distinct Shiga-like-toxin genes by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 27 (12), 2751–2757. <https://doi.org/10.1128/jcm.27.12.2751-2757.1989>.

Koukos, G., Papadopoulos, C., Tsalikis, L., Sakellari, D., Arsenakis, M., Konstantinidis, A., 2014. Prevalence of antibiotic resistance genes in subjects with successful and failing dental implants. A pilot study. *Open Dent. J.* 8, 57–263. <https://doi.org/10.2174/1874210601408010257>.

Larsen, J., Sunde, M., Islam, M.Z., Urdahl, A.M., Barstad, A., Larsen, A.R. et al., 2017. Evaluation of a widely used culture-based method for detection of livestock-associated

meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), Denmark and Norway, 2014 to 2016. *Euro Surveill.* 22 (28). <https://doi.org/0.2807/1560-7917.ES.2017.22.28.30573>.

Lazarus B., Paterson DL, et al., 2015. Do human extraintestinal *Escherichia coli* infections resistant to expanded-spectrum cephalosporins originate from food-producing animals? A systematic review. *Clin Infect Dis.* 60, 39–452. <https://doi:10.1093/cid/ciu785>

Leijon, M., Atkins, E., Persson Waller, K., Artursson, K., 2021. Longitudinal study of *Staphylococcus aureus* genotypes isolated from bovine clinical mastitis. *J. Dairy Sci.* 104 (11), 11945–11954. <https://doi.org/10.3168/jds.2021-20562>.

Mag, T., Nógrády, N., Herpay, M., Tóth, I., Rozgonyi, F., 2010. Characterisation of verotoxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from human patients in Hungary over a 7-year period. *Clin Microbiol Infect.* 29 (2), 249–252. <https://doi.org/10.1007/s10096-009-0836-z>.

Malahlela, M.N., Cenci-Goga, B.T., Marufu, M.C., Fonkui, T.Y., Grispoldi, L., Etter, E. et al. 2022. Occurrence, serotypes and virulence characteristics of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* isolates from goats on communal rangeland in South Africa. *Toxins.* 14 (5), 353. <https://doi.org/10.3390/toxins14050353>.

Marcusson, L.L., Frimodt-Møller, N., Hughes, D., 2009. Interplay in the selection of fluoroquinolone resistance and bacterial fitness. *PLoS Pathog.* 5. (8), e1000541. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000541>.

Matuszewska, M., Murray, G.G., Ba, X., Wood, R., Holmes, M.A., Weinert, L.A., 2022. Stable antibiotic resistance and rapid human adaptation in livestock-associated MRSA. *eLife.* 28, 11, e74819. <https://doi.org/10.7554/eLife.74819>

Monecke, S., Coombs, G., Shore, A.C., Coleman, D.C., Akpaka, P., Borg, M. et al., 2011. A field guide to pandemic, epidemic and sporadic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *PloS one* 6 (4), e17936. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017936>.

Moura, A., Criscuolo, A., Pouseele, H., Maury, M.M., Leclercq, A., Tarr, C. et al., 2016. Whole genome-based population biology and epidemiological surveillance of *Listeria monocytogenes*. *Nat. Microbiol.* 2, 16185. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.185>.

Müller, A., Seinige, D., Jansen, W., Klein, G., Ehricht, R., Monecke, S., Kehrenberg, C., 2016. Variety of antimicrobial resistances and virulence factors in *Staphylococcus aureus* isolates from meat products legally and illegally introduced to Germany. *PLoS one*. 11 (12), e0167864. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167864>.

Müller, A., Jansen, W., Grabowski, N.T., Kehrenberg, C., 2018a. Characterization of *Salmonella enterica* serovars recovered from meat products legally and illegally imported into the EU reveals the presence of multiresistant and AmpC-producing isolates. *Gut Pathog.* 10, 40. <https://doi.org/10.1186/s13099-018-0268-3>.

Müller, A., Jansen, W., Grabowski, N.T., Monecke, S., Ehricht, R., Kehrenberg, C., 2018b. ESBL- and AmpC-producing *Escherichia coli* from legally and illegally imported meat: characterization of isolates brought into the EU from third countries. *Int. J. Food Microbiol.* 283, 52–58. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.06.009>.

Müller, A., Seinige, D., Jansen, W., Klein, G., Ehricht, R., Monecke, S., Kehrenberg, C., 2016. Variety of antimicrobial resistances and virulence factors in *Staphylococcus aureus* isolates from meat products legally and illegally introduced to Germany. *PLoS one*. 11 (12), e0167864. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167864>.

Muloi D., Ward M.J., Pedersen A.B., Fèvre E.M., Woolhouse M.E.J., van Bunnik B.A.D., 2018. Are Food Animals Responsible for Transfer of Antimicrobial-Resistant *Escherichia coli* or Their Resistance Determinants to Human Populations? A Systematic Review. *Foodborne Pathog Dis.* 15 (8), 467-474. <http://doi:10.1089/fpd.2017.2411>.

Murchan, S., Kaufmann, M.E., Deplano, A., de Ryck, R., Struelens, M., Zinn, C., Elsberg et al., 2003. Harmonization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for epidemiological typing of strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a single approach developed by consensus in 10 European laboratories and its application for tracing the spread of related strains. *J. Clin. Microbiol.* 41 (4), 1574–1585. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.4.1574-1585.2003>.

Nagy, B., Szmolka, A., Smole Možina, S., Kovač, J., Strauss, A., Schlager, S. et al. , 2015. Virulence and antimicrobial resistance determinants of verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) and of multidrug-resistant *E. coli* from foods of animal origin illegally imported to the EU by flight passengers. *Int. J. Food Microbiol.* 209, 52–59. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.06.026>.

Naseer, U., Løbersli, I., Hindrum, M., Bruvik, T., Brandal, L. T., 2017. Virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and the risk of developing haemolytic uraemic syndrome in Norway, 1992-2013. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 36 (9), 1613–1620. <https://doi.org/10.1007/s10096-017-2974-z>.

Nepal, R., Houtak, G. Shaghayegh, G., Bouras, G., Shearwin, K., Psaltis, A.J. et al. , 2021. Prophages encoding human immune evasion cluster genes are enriched in *Staphylococcus aureus* isolated from chronic rhinosinusitis patients with nasal polyps. *Microb. Genom.* 7 (12). <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000726>.

OIE, 2023. World organisation for animal health. Annual report on antimicrobial agents intended for use in animals. 8th report, <https://www.woah.org/app/uploads/2024/05/woah-amu-report-2024-final.pdf> (accessed 20 October 2023)

Pietsch, M. Eller, C., Wendt, C., Holfelder, M., Falgenhauer, L., Fruth, A. et al., 2017. Molecular characterisation of extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* isolates from hospital and ambulatory patients in Germany. *Vet. Microbiol.* 200, 130–137. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.11.028>.

Prüller, S., Rensch, U., Meemken, D., Kaspar, H., Kopp, P.A., Klein, G., Kehrenberg, C. 2015. Antimicrobial susceptibility of *Bordetella bronchiseptica* isolates from swine and companion animals and detection of resistance genes. *PLoS one.* 10 (8), e0135703. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135703>.

Rahn, K., de Grandis, S. A., Clarke, R. C., McEwen, S. A., Galán, J. E., Ginocchio, C. et al. 1992. Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. *Mol Cell Probes.* 6 (4), 271–279. [https://doi.org/10.1016/0890-8508\(92\)90002-f](https://doi.org/10.1016/0890-8508(92)90002-f).

Randall, L., Heinrich, K., Horton, R., Brunton, L., Sharman, M., Bailey-Horne, V., et al. 2014. Detection of antibiotic residues and association of cefquinome residues with the occurrence of extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing bacteria in waste milk samples from dairy farms in England and Wales in 2011. *Res. J. Vet. Sci.* 96 (1), 5–24. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2013.10.009>.

Rodríguez-Lázaro, D., Ariza-Miguel, J., Díez-Valcarce, M., Stessl, B., Beutlich, J. Fernández-Natal, I. et al., 2015. Identification and molecular characterization of pathogenic bacteria in foods confiscated from non-EU flights passengers at one

Spanish airport. *Int. J. Food Microbiol.* 209, 20–25.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.10.016>.

Rodríguez-Lázaro, D., Oniciuc, E.-A., García, P.G., Gallego, D., Fernández-Natal, I., Dominguez-Gil, M. et al., 2017. Detection and characterization of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* in foods confiscated in EU borders. *Front. Microbiol.* 8, 1344. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01344>.

Ruimy, R., Armand-Lefevre, L., Barbier, F., Ruppé, E., Coccojaru, R., Mesli, Y., et al., 2009. Comparisons between geographically diverse samples of carried *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 191 (18), 5577–5583.
<https://doi.org/10.1128/JB.00493-09>.

Sallam, K.I., Abd-Elghany, S.M., Elhadidy, M., Tamura, T., 2015. Molecular characterization and antimicrobial resistance profile of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in retail chicken. *J Food Prot.* 78 (10), 879–1884.
<https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-15-150>.

Schmidt, H., Rüssmanni, H., Schwarzkopf, A., Aleksic, S., Heesemann, J., Karch, H., 1994. Prevalence of attaching and effacing *Escherichia coli* in stool samples from patients and controls. *Int J Med Microbiol.* 281 (2), 201–213.
[https://doi.org/10.1016/s0934-8840\(11\)80571-2](https://doi.org/10.1016/s0934-8840(11)80571-2).

Schmidt, T., Kock, M.M., Ehlers, M.M., 2017. Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis and close human contacts in South African dairy herds: genetic diversity and inter-species host transmission. *Front. Microbiol.* 8, 511. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00511>.

Schoder, D., Strauß, A., Szakmary-Brändle, K., Stessl, B., Schlager, S., Wagner, M., 2015. Prevalence of major foodborne pathogens in food confiscated from air passenger luggage. *Int. J. Food Microbiol.* 209, 3–12.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.08.010>.

Shimamura, Y., Noaki, R., Kurokawa, A., Utsumi, M., Hirai, C., Kan, T., Masuda, S., 2021. Effect of (-)-epigallocatechin gallate on activation of JAK/STAT signaling pathway by staphylococcal enterotoxin A. *Toxins.* 13 (9).
<https://doi.org/10.3390/toxins13090609>.

Smyth, D.S., Feil, E.J., Meaney, W.J., Hartigan, P.J., Tollersrud, T., Fitzgerald, J.R. et al., 2009. Molecular genetic typing reveals further insights into the diversity of animal-

associated *Staphylococcus aureus*. *J. Med. Microbiol.* 58 (10), 1343–1353. <https://doi.org/0.1099/jmm.0.009837-0>.

Spies, L.A., 2008. Traveler's diarrhea: an update on prevention and treatment. *J Midwifery Womens Health.* 53 (3), 251–254. <https://doi.org/10.1016/j.jmwh.2008.02.009>.

Spoor, L.E., McAdam, P.R., Weinert, L.A., Rambaut, A., Hasman, H., Aarestrup, F.M. et al., 2013. Livestock origin for a human pandemic clone of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *mBio.* 4 (4). <https://doi.org/0.1128/mBio.00356-13>.

Thomas, D., Chou, S., Dauwalder, O., Lina, G., 2007. Diversity in *Staphylococcus aureus* enterotoxins. *Chem Immunol Allergy.* 93, 24–41. <https://doi.org/10.1159/000100856>.

Udo, E.E., Aly, N.Y.A., Sarkhoo, Eiman, Al-Sawan, R., Al-Asar, A.M., 2011. Detection and characterization of an ST97-SCCmec-V community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone in a neonatal intensive care unit and special care baby unit. *J. Med. Microbiol.* 60 (5), 600–604. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.028381-0>.

van Duin, D., Paterson, D.L., 2016. Multidrug-resistant bacteria in the community: trends and lessons learned. *Infect Dis Clin North Am.* 30 (2), 377–390. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2016.02.004>.

Vimont, A., Vernozy-Rozand, C., Montet, M. P., Bavai, C., Fremaux, B., Delignette-Muller, M.-L., 2007. Growth of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* (STEC) and bovine feces background microflora in various enrichment protocols. *Vet Microbiol.* 123 (1-3), 274–281. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.02.003>.

Wang, T., Tanaka, M., Sato, K., 1998. Detection of *grlA* and *gyrA* mutations in 344 *Staphylococcus aureus* strains. *Antimicrobial Agents Chemother.* 42 (2), 236–240. <https://doi.org/0.1128/aac.42.2.236>.

Wu, S. Huang, J., Wu, Q., Zhang, J., Zhang, F., Yang, X. et al., 2018. *Staphylococcus aureus* isolated from retail meat and meat products in China: incidence, antibiotic resistance and genetic diversity. *Front. Microbiol.* 9, 2767. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02767>.

Xu, S.X., McCormick, J.K., 2012. Staphylococcal superantigens in colonization and disease. *Front Cell Infect Microbiol.* 2, 52. [https://doi.org/ 10.3389/fcimb.2012.00052](https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00052).

Zanichelli, V., Sharland, M., Cappello, B., Moja, L., Getahun, H. et al., 2023. The WHO AWaRe (access, watch, reserve) antibiotic book and prevention of antimicrobial resistance. *Bull World Health Organ.* 101 (4), 290-296. <http://dx.doi.org/10.2471/BLT.22.288614>

5. Zusammenfassung der Ergebnisse und übergreifende Diskussion

5.1 Herkunft der untersuchten legal und illegal importierten Lebensmittel tierischer Herkunft

5.1.1 Herkunft der legal importierten Rindfleischproben

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 100 rohe Rindfleischproben untersucht, die legal über die Grenzkontrollstelle des Hafens Hamburgs aus Drittländern in die EU eingeführt wurden (Publikation 1). Nach EU-Recht dürfen lediglich Lebensmittel tierischer Herkunft aus Drittstaaten aus zugelassenen, auf einer Positivliste geführten Betrieben in die EU eingeführt werden. Von denen in dieser Arbeit untersuchten Rindfleischproben stammten 53 aus Brasilien, 33 aus Argentinien, 12 aus Uruguay und zwei Proben aus Paraguay (Tabelle 2, sowie Anhang Tabelle 9). Insgesamt konnten im Jahr 2022 fast die Hälfte (48,6%) der insgesamt 385.119 Tonnen des importierten Rindfleisches auf Importe aus Argentinien (22,5%), Brasilien (16,3%) und Uruguay (9,8%) zurückgeführt werden (EC 2021). Die Verteilung der Herkunftsländer der in dieser Arbeit untersuchten Proben zeichnet somit ein charakteristisches Bild, da dies die Hauptexportländer für die EU für Rindfleisch darstellen. In diesem Kontext muss jedoch berücksichtigt werden, dass in dieser Studie kein aus Großbritannien importiertes Rindfleisch untersucht wurde, da dies zuvor nicht als Drittland galt. Seit 2021 wird Großbritannien als solches kategorisiert und in den vergangenen Jahren ließ sich ein großer Anteil (37%, 2022) auf Rindfleischimporte aus Großbritannien zurückführen (EC 2023d). Unter Berücksichtigung der jeweiligen Herkunft der Proben konnten bei den durchgeführten mikrobiologischen Untersuchungen in der eigenen Studie keine statistisch signifikanten Korrelationen in Bezug auf die mikrobiologische Qualität der untersuchten Rindfleischproben hergestellt werden. In vergleichbare Studien, in welchen die mikrobielle Kontamination von importiertem Rindfleisch untersucht wurden, wurden keine Untersuchungen bezüglich statistischer Zusammenhänge der mikrobiellen Kontamination unter Berücksichtigung des Herkunftslands durchgeführt (Stella et al. 2013; Bosilevac et al. 2007). Dennoch konnten in den Jahren 2011 bis 2015 von den 184 RASFF-Meldungen im Kontext mit STEC-Kontaminationen in Fleisch- und Fleischprodukten ein Großteil auf aus Argentinien (46 Meldungen, 24%) und aus Brasilien (40, 21%) importierte Fleisch- und Fleischprodukte zurückgeführt werden (Kononiuk et. al. 2017). Obschon dies vor dem Hintergrund betrachtet werden sollte, dass diese Länder prozentual gesehen den Hauptanteil der Exportländer darstellen und somit auch die zu untersuchende

Probenanzahl aus diesen Ländern vermutlich größer ist im Vergleich zu anderen Ländern, sind Eingangsuntersuchungen von importiertem Fleisch aufgrund des potenziellen Nachweises von pathogenen Mikroorganismen zu empfehlen.

Tabelle 2. Herkunft der untersuchten legal importierten Rindfleischproben

Herkunftsland	Probenanzahl
Brasilien	53
Argentinien	33
Uruguay	12
Paraguay	2
Gesamt	100

5.1.2 Herkunft und Probenspektrum der illegal importierten Lebensmittel tierischer Herkunft

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden außerdem 100 illegal eingeführte Lebensmittel tierischen Ursprungs untersucht, die bei der Zollkontrolle am Flughafen Frankfurt am Main von aus Drittländern in die EU einreisenden Passagieren entnommen wurden (Publikation 2). Bei der Betrachtung der Herkunft der Proben ist zu berücksichtigen, dass nur das Herkunftsland des Abflughafens eindeutig identifiziert werden konnte und eine vorherige Durchreise durch ein anderes Land nicht ausgeschlossen werden kann. In Summe wurden die Proben (n = 100) aus 15 verschiedenen nicht-EU Ländern importiert, wobei eine Einteilung in fünf geografische Gebiete vorgenommen wurde (Publikation 2, Tabelle 1). Insgesamt wurden mit 47% fast die Hälfte der Proben aus Südwestasien importiert, wovon allein 39% aus der Türkei stammen. Am zweithäufigsten stammten die Proben aus Südostasien (17%), gefolgt von Osteuropa (Moldawien) (15%), Zentralasien (Kasachstan) (14%) und Afrika (7%) (siehe Anhang, Tabelle 10). Unter den 100 Proben wurde eine Einteilung in 60 Fleisch- und Fleischprodukte und 40 Milchprodukte vorgenommen, wobei ein Großteil der Milchprodukte (n = 28) aus der Türkei eingeführt wurde (Tabelle 1, Publikation 2). Zudem ließen sich die Produkte in jeweils sechs Unterkategorien untergliedern (Tabelle 1, Publikation 2). Des Weiteren wurden 72% der Proben als individuell verpackt und 28% als industriell verpackt klassifiziert (Tabelle 1, Publikation 2). Als individuell verpackt gelten in dieser Arbeit Produkte ohne sichtbare Produktkennzeichnung auf der Verpackung mit Informationen über die Produktart, die Zutaten oder das Mindesthaltbarkeitsdatum. Individuell verpackte Produkte wurden in

dieser Arbeit als im Privathaushalt verarbeitete bzw. verpackte Lebensmittel eingestuft. Industriell verpackte Lebensmittel waren mit einer Produktkennzeichnung, einer Zutatenliste und einem Mindesthaltbarkeitsdatum versehen und wurden als im Supermarkt gekaufte Lebensmittel kategorisiert. Es konnten teilweise statistisch signifikante Korrelationen zwischen dem Nachweis von bestimmten Mikroorganismen und der Verpackungsart festgestellt werden, deren Diskussion in den Kapiteln 5.2.3 und 5.2.4 aufgeführt ist. Des Weiteren ließen sich die Lebensmittel hinsichtlich des Verarbeitungszustandes als roh (21%) und als verarbeitet/verzehrfertig (79%) klassifizieren (Tabelle 1, Publikation 2). Die Bedeutung des Verarbeitungszustandes der Lebensmittel in Zusammenhang einer mikrobiellen Kontamination wird in den Kapiteln 5.2.3 und 5.2.4 diskutiert.

5.2 Mikrobiologische Beschaffenheit legal und illegal importierter Lebensmittel tierischer Herkunft in die EU

Zur Beurteilung der lebensmittelhygienischen Qualität von insgesamt 100 legal importierten Rindfleischproben wurden diese nach den jeweiligen DIN EN ISO Standardmethoden auf die aerobe mesophile Gesamtkeimzahl (AKZ) sowie die Nachweisraten von *Enterobacteriaceae* und *E. coli* sowie auf relevante lebensmittelassoziierte Pathogene (*Salmonella* spp., *L. monocytogenes*, *S. aureus* und STEC) untersucht (Publikation 1). Dadurch, dass in der VO (EU) Nr. 2073/2005 keine Grenzwerte für rohes Rindfleisch festgeschrieben sind, erfolgte die Evaluierung der mikrobiologischen Qualität anhand der mikrobiologischen Richt- und Warnwerte der DGHM (Publikation 1). Für die Auswertung wurden die Keimzahlwerte \log_{10} -transformiert.

Zusätzlich erfolgt eine Untersuchung auf ESBL-produzierende *Enterobacterales*, auf welche in Kapitel 5.3.3 Bezug genommen wird.

5.2.1 Mikrobiologische Qualität von legal in die EU importiertem Rindfleisch anhand von Hygieneparametern

Insgesamt ließen sich bei den Untersuchungen auf Hygieneindikator-Keime nicht unerhebliche hygienische Defizite innerhalb der mikrobiologischen Untersuchungen der legal importierten Rindfleischproben feststellen. Die AKZ-Werte von allen Proben ($n = 100$) lagen in einem Bereich von 4,18 bis 10,04 \log_{10} KbE/g mit einem Medianwert von 8,06 \log_{10} KbE/g, wobei die einzelnen AKZ-Werte bezogen auf die jeweilige

Herkunft der Rindfleischproben in Tabelle 2 in Publikation 1 aufgeführt sind. Die DGHM gibt für rohes Rindfleisch keine Richt- und Warnwerte für die AKZ an, jedoch lag der Medianwert der untersuchten Rindfleischproben mit $8,06 \log_{10}$ KbE/g deutlich über dem Richtwert der DGHM für rohes Fleisch anderer Tierarten (rohes Geflügel-, Lamm- und Schweinefleisch) mit $6,7 \log_{10}$ KbE/g (DGHM 2021). Darüber hinaus werden in der Literatur AKZ-Werte zwischen 7 und $8 \log_{10}$ KbE/g bei rohem Rindfleisch mit einer potentiellen Qualitätsminderung, sensorischen Abweichungen in Bezug auf die Fleischfarbe, Fleischbeschaffenheit, Geruchsabweichungen sowie einer verkürzten Mindesthaltbarkeitsdauer in Verbindung gebracht (McCain et al. 2015; González-Gutiérrez et al. 2020). Insbesondere Farbveränderungen sind in der Literatur als Grund für die Verschlechterung der Fleischqualität und der Entwicklung inakzeptabler organoleptischer Eigenschaften gelistet (Vieira et al. 2009). Einfluss auf die hauptsächlich vom Myoglobin-Gehalt abhängige Farbe von Fleisch können beispielsweise die Verpackungsart, die Lagerungsart und Lagerungsdauer sowie die mikrobielle Besiedlung nehmen (McCain et al. 2015; Mörlein 2019). Bei vakuumverpacktem Rindfleisch überwiegt der Anteil an nativem Myoglobin, sodass das Fleisch purpurrot erscheint. Da eine erhöhte mikrobielle Stoffwechselfähigkeit zu grünlich erscheinenden Derivaten des Myoglobins führen kann, lässt sich durch eine Analyse der Fleischfarbe ein erster Rückschluss auf einen mikrobiellen Verderb schließen (Mörlein 2019; Mancini und Hunt 2005). In diesem Kontext muss berücksichtigt werden, dass in der vorliegenden Arbeit keine umfassende sensorische Analyse durchgeführt, sondern dass die Proben lediglich auf Auffälligkeiten in Bezug auf den Geruch (z.B. muffiger Geruch) sowie auf das Aussehen (z.B. grau-grünliche Farbabweichungen als Anzeichen für beginnenden Verderb) überprüft wurden. Im Gegensatz dazu führten die Autoren der Studie von Stella et al. (2013), in der aus Argentinien nach Italien vakuumverpacktes Rindfleisch untersucht worden ist, eine Analyse der Färbeveränderungen durch. So konnte gezeigt werden, dass nach einer Lagerungszeit von 100 Tagen (bei $0^\circ \text{C Grad} \pm 2^\circ \text{C}$) zwar Abweichungen des Färbegrades im Gegensatz zu kürzer gelagertem Rindfleisch (35 Tage, bei $0^\circ \text{C Grad} \pm 2^\circ \text{C}$) feststellbar waren, jedoch konnte keine erhöhte mikrobielle Kontamination nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu konnten in einer spanischen Studie, in der gefrorenes vakuumverpacktes Rindfleisch untersucht wurde, nach einer Lagerungszeit von 90 Tagen (bei -20°C) statistisch signifikante Farbveränderungen festgestellt werden, die mit einer Erhöhung der Detektionsrate an psychrotrophen

Bakterien einherging (Tag 0: 1,7 log₁₀ KbE/g, Tag 90: 3,11 log₁₀ KbE/g) (Vieria et. al, 2009). In der vorliegenden Studie konnten hingegen bei den untersuchten Rindfleischproben mit einer hohen Keimbesiedelung (AKZ-Werte über 7 log₁₀ KbE/g) keine Auffälligkeiten in Bezug auf die Farbe festgestellt werden. Hier muss berücksichtigt werden, dass lediglich zu einem Zeitpunkt (Beginn der mikrobiologischen Untersuchung) eine rein visuelle Farbbegutachtung des Fleisches erfolgte und nur zu einem Zeitpunkt eine mikrobielle Untersuchung durchgeführt wurde, sodass über Farbveränderungen über eine bestimmte Lagerungszeit hinweg keine Aussage getroffen werden kann. Die hohen AKZ-Werte in den rohen Rindfleischproben sollten dennoch im Zusammenhang mit der hohen Nachweisrate von *Enterobacteriaceae* (83 %), im Hinblick auf mögliche Hygienemängel berücksichtigt werden. Da *Enterobacteriaceae* natürlicherweise im Darm von Wirbeltieren vorkommen, kann eine hohe Kontaminationsrate in rohem Fleisch darauf hindeuten, dass es während des Schlachtprozesses, der Verarbeitung und Verpackung der Produkte zu Kontaminationen gekommen ist (Mladenović et al. 2021). Als ursächliche Risikofaktoren sind insbesondere ein mangelndes Bewusstsein für Hand- und Oberflächenhygiene von Personal in der lebensmittelverarbeitenden Industrie für Kontaminationen von Lebensmitteln beschrieben (Lues und van Tonder 2007). Dabei konnte bei den ermittelten AKZ-Werten sowie den *Enterobacteriaceae*-Werten eine schwach positive Korrelation zwischen hohen AKZ-Werten und *Enterobacteriaceae*-Werten festgestellt werden, sodass *Enterobacteriaceae* als vorherrschende mikrobielle Kontamination festzuhalten sind. In einer Studie, in der in die EU importiertes Geflügel- und Schweinefleisch untersucht worden ist, konnten ebenfalls als vorherrschende mikrobielle Kontamination *Enterobacteriaceae* detektiert werden (Jansen et. al. 2018). Im Gegensatz dazu berichten die Autoren einer italienischen Studie, in der aus Argentinien nach Italien importiertes rohes Rindfleisch untersucht wurde, als vorherrschende Kontamination den Nachweis von *Lactobacillus* spp., deren Detektion in der vorliegenden Arbeit nicht inkludiert war (Stella et. al., 2013). Die deutlich niedrigere nachgewiesene *Enterobacteriaceae*-Detektionsrate von 3,2 log₁₀ KbE/g in der Studie von Stella et. al. (2013) könnte im Zusammenhang mit der hohen *Lactobacillus* spp.-Besiedelung stehen, da bereits nachgewiesen wurde, dass Milchsäurebakterien das Wachstum von *Enterobacteriaceae* in Fleisch hemmen können (Lee und Yoon 2001). Diese wachstumshemmende Wirkung könnte auch die Ergebnisse einer weiteren Studie erklären, in der gefrorenes Rindfleisch untersucht

wurde (Viera et. al., 2000). In dieser ließen sich keine *Enterobacteriaceae* nachweisen, wohingegen eine Keimbesiedlung mit Milchsäurebakterien ($1,54 \log_{10}$ KbE/cm²) festgestellt wurde (Vieira et. al., 2009). Dass in der Studie von Vieira et. al (2009) keine *Enterobacteriaceae* nachzuweisen waren, könnte desweiteren daran liegen, dass im Gegensatz zu der vorliegenden Arbeit kein zusätzlicher Schritt einer Inkubation in einem Anreicherungsmedium erfolgte, welcher sich nachweislich auf eine höhere *Enterobacteriaceae*-Detektionsrate auswirken kann (Jazmati et al. 2016). Niedrigere *Enterobacteriaceae*-Keimzahlwerte ($2,0 \log_{10}$ KbE/g) im Vergleich zu der vorliegenden Arbeit wurden auch in einer Studie, in der aus Uruguay importiertes rohes Rindfleisch aus den USA untersucht wurde, nachgewiesen (Bosilevac et al. 2007). Diese niedrigeren Keimzahlwerte könnten damit zusammenhängen, dass in der Studie von Bosilevac et. al. (2007) sowie in den weiter oben genannten Studien gefrorenes Fleisch untersucht wurde, was einen Einfluss auf die Überlebens- und Vermehrungsrate mikrobieller Erreger hat. In der Literatur ist beschrieben, dass die Lagerung unter Tiefkühlbedingungen (unter $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$) die Vermehrung von *Enterobacteriaceae* in Fleisch hemmt (Medić et al. 2018; Bover-Cid et al. 2006). Zudem kann es zu einem Absterben der Mikroorganismen unter Tiefkühlbedingungen kommen. Dies konnte in der Studie von Medić et al. (2018), in welcher der *Enterobacteriaceae*-Keimgehalt in Schweinefleisch über einen gesamten Zeitraum von 18 Monaten bei einer Lagerung von -18°C gemessen wurde, gezeigt werden. Der zu Beginn der Studie gemessene *Enterobacteriaceae*-Keimgehalt von $2,96 \log_{10}$ KbE/g reduzierte sich nach 18 Monaten auf $0,73 \log_{10}$ KbE/g (Medić et al. 2018). Zusätzlich kann das Einfrieren und die lange Lagerung bei unter $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ bei *Enterobacteriaceae* einen lebensfähigen, aber nicht kultivierbaren (engl.: viable but non-culturable; VNBC) Zustand hervorrufen, sodass eine Detektion der Mikroorganismen mit klassischen Kulturmethoden nicht möglich ist und so die vergleichsweise niedrigen Kontaminationsraten in den oben genannten Studien zu erklären sind (Ramamurthy et al. 2014).

Insgesamt überschritten 40% der Proben den von der DGHM angegebenen Warnwert für *Enterobacteriaceae* und sind somit nach der DGHM als mikrobiologisch unbefriedigend einzustufen (DGHM 2023; DGHM 2018). Bei 24% der Proben konnten *Enterobacteriaceae*-Werte nachgewiesen werden, die zwischen dem Richt- und Warnwert liegen, 19% lagen unterhalb des Richtwertes und nur bei 17% konnten keine *Enterobacteriaceae* detektiert werden. Die Warnwert-Überschreitung von Hygiene-

Indikatoren wie *Enterobacteriaceae* in fast der Hälfte der Proben kann auf unhygienische Zustände während der Verarbeitung sowie auf eine unzureichende Kühlung während des Transports und der Lagerung hindeuten (Jaja et al. 2018; Halkman und Halkman 2014). Eine unzureichende Kühlung bzw. eine erhöhte Lagerungstemperatur sind insofern als kritisch anzusehen, da gezeigt werden konnte, dass eine Erhöhung der Lagerungstemperatur (von 0° C auf 20° C) bei frischem Fleisch zu einer Verschiebung der mikrobiellen Zusammensetzung führt: Psychrophile Mikroorganismen der typischen Kühlhausflora werden zunehmend durch mesophile Keimarten ersetzt (Kreyenschmidt et. al. 2003)

In einer Studie von Bosilevac et al. (2007), konnte in rohem Rindfleisch, das aus Uruguay (woher 12% der Proben, die in dieser Arbeit untersucht worden sind, stammten) in die USA importiert wurde, eine geringere Nachweisrate von *Enterobacteriaceae* (31,1%) im Vergleich zur in dieser Arbeit ermittelten Nachweisrate (83%) festgestellt werden. Gleichzeitig lag die *E. coli*-Nachweisrate mit 9,5% höher als die hier detektierte (3%) (Bosilevac et al. 2007). Im Vergleich dazu konnten in einer Studie von Stella et al. (2013), in der aus Argentinien nach Italien importiertes rohes Rindfleisch untersucht wurde, keine *E. coli* nachgewiesen werden. Da in dieser Studie die Keimzahlbestimmung über eine Tupferprobenentnahme erfolgte und die Ergebnisse in KbE/cm² berechnet wurden, ist ein direkter Vergleich nur eingeschränkt möglich. Bei der Tupferprobenentnahme kann eine Aussage über die Oberflächenkontamination des Lebensmittels getroffen werden, wohingegen tieferliegende Keime undetektiert bleiben können (Pearce und Bolton 2005). Hinsichtlich der Nachweismethoden unterschieden sich die oben genannten Studien noch in weiteren Aspekten. So wurden in der Studie von Bosilevac et. al (2006) nicht wie in der vorliegenden Arbeit nach DIN EN ISO Standardmethoden gearbeitet, sodass ein exakter Vergleich der Detektionsrate lediglich bedingt möglich ist.

Die in dieser Arbeit hohen Nachweisraten an *Enterobacteriaceae* sind neben der Bedeutung als Hygieneindikatoren aufgrund eines pathogenen Potentials einiger Pathovaren von *Enterobacteriaceae*, wie STEC, von Relevanz (EFSA 2020). Dieser Nachweis kann insbesondere bei einem Lebensmittel wie Rindfleisch, das teilweise roh bzw. nicht vollständig erhitzt verzehrt wird, für die Gesundheit der Verbraucher von Bedeutung sein, dessen Diskussion im Kapitel (5.2.2) folgt.

5.2.2 Nachweis von lebensmittelassoziierten Pathogenen in legal in die EU importiertem Rindfleisch

In der vorliegenden Arbeit wurde eine niedrige Nachweisrate an lebensmittelassoziierten Pathogenen in den untersuchten legal in die EU importierten Rindfleischproben festgestellt (Publikation 1, Tabelle 1). Dass Untersuchungen von in die EU importierten Fleisch- und Fleischprodukten aufgrund von Kontaminationen mit lebensmittelassoziierten Pathogenen jedoch von hoher Relevanz sind, konnte bereits in vergangenen Studien gezeigt werden. In einer umfassenden Auswertung der Jahre 2011 bis 2015 der registrierten RASFF-Meldungen konnten innerhalb der Produktkategorie Fleisch- und Fleischprodukte (ausgenommen Geflügel) von insgesamt 922 Meldungen 492 (53,4%) auf den Nachweis pathogener Mikroorganismen zurückgeführt werden (Kononiuk et. al. 2017). Von diesen bezogen sich 184 (38%) auf den Nachweis von STEC, 226 (46%) auf den von *Salmonella* spp. und 73 (15%) auf eine Kontamination mit *L. monocytogenes* (Kononiuk et. al. 2017). Von den insgesamt 184 Meldungen in Verbindung mit einer STEC-Kontamination ließen sich ein Großteil auf den STEC-Nachweis von aus Argentinien (46 Meldungen, 24%) und aus Brasilien (40, 21%) importierten Fleisch- und Fleischprodukten zurückführen (Kononiuk et. al. 2017). Hier muss jedoch berücksichtigt werden, dass innerhalb der Produktkategorie Fleisch- und Fleischprodukte rohes Rindfleisch zwar inkludiert wurde, jedoch nicht ausschließlich rohes Rindfleisch untersucht wurde und somit eine Aussage über die mikrobielle Kontamination dieser Lebensmittelmatrix schwer möglich ist. Auswertungen jüngster Studien zeigen einen Rückgang der RASFF-Meldungen im Kontext mit STEC-Kontaminationen. Dies lässt sich aus den aktuellen Daten der RASFF-Meldungen im Zeitraum von 2020 bis 2022 erkennen: Von insgesamt 79 registrierten Meldungen im Zusammenhang mit einer STEC-Kontamination, ließen sich 20 dieser auf Nachweise in Fleisch- und Fleischprodukten zurückführen, wobei 14 Meldungen davon auf in die EU importiertes Rindfleisch aus Brasilien (6), Uruguay (4) und Argentinien (4) fiel. In dieser Arbeit konnten in 2% (n = 2) der Rindfleischproben STEC nachgewiesen werden, wobei es sich bei beiden Proben um aus Argentinien eingeführtes Rindfleisch handelt. Die hier erhobene STEC-Nachweisrate ist dabei mit der STEC-Prävalenz in rohem Rindfleisch in Deutschland (2,1%, 2021) sowie in der EU von 2,4% in den Jahren 2017-2020 zu vergleichen (EFSA 2022a; BVL 2021). Deutlich höhere STEC-Nachweisraten von 25% in rohen Rindfleischstücken bzw. 9% in Rindfleischschlachtkörpern dokumentierten hingegen

Autoren zweier Studien aus Argentinien bei Untersuchungen von insgesamt neun in die EU exportierenden Schlachtbetrieben (Masana et al. 2011; Etcheverría et al. 2010). Um die STEC-Nachweisraten in Schlachtkörpern in Argentinien zu reduzieren, wurde 2014 seitens des nationalen Dienstes für die Gesundheit und die Qualität von Lebensmitteln in Argentinien (engl.: The National Service for Agrifood Health and Quality; SENASA) konkrete Maßnahmen eingeführt, die im Kontext mit den vergleichsweise geringeren Nachweisraten jüngerer Studien mit 5,8% in rohen Rindfleisch, das für den Export produziert wurde, stehen könnten (Brusa et al. 2017). Eine erfolgreiche Umsetzung dieser Maßnahmen zur STEC-Reduktion könnte auch im Zusammenhang mit der in dieser Arbeit nachgewiesenen niedrigen STEC-Prävalenz stehen. Obgleich die Nachweisrate für STEC in den hier untersuchten legal importierten Rindfleischproben niedrig war, kommt aufgrund der erhöhten Pathogenität einzelner Genotypen der molekularen Charakterisierung der Isolate eine große Relevanz zu, die in Kapitel 4.3.1 thematisiert wird.

In den untersuchten Rindfleischproben konnte des Weiteren eine Prävalenz von *L. monocytogenes* von 5% (n = 5 Proben) ermittelt werden, wovon drei dieser Proben aus Argentinien eingeführt wurden, eine Probe aus Uruguay und eine aus Paraguay. Im Vergleich dazu lag nach der jährlichen Zoonoseberichterstattung der EFSA eine niedrigere als die in dieser Arbeit detektierte Nachweisrate von 2,7 bis 3,9% in Fleischprodukten (Rind und Schwein) in der EU für das Jahr 2021 vor (EFSA 2022a). Eine deutlich höhere Nachweisrate von *L. monocytogenes* mit einer Prävalenz von 12% konnte in Untersuchungen in für den Export zugelassenen Schlachtbetrieben in Mato Grosso, dem Staat in Brasilien mit der höchsten Exportrate an Rindfleisch, detektiert werden (Teixeira et al. 2019). Daraus ließe sich eine deutlich höhere Nachweisrate in importiertem Rindfleisch erwarten. In einer anderen Studie italienischer Autoren konnten in importiertem Rindfleisch keine *L. monocytogenes* nachgewiesen werden. Hier muss jedoch beachtet werden, dass in dieser Studie lediglich aus Argentinien nach Italien importiertes Rindfleisch untersucht wurde und die Probenanzahl (24) deutlich geringer war als die in der vorliegenden Arbeit (Stella et al. 2013).

In der VO (EU) Nr. 2073/2005 sind für Rindfleisch zwar keine *L. monocytogenes* Richtwerte angegeben, jedoch ist nach der DGHM ein Warnwert von 2,0 log₁₀ KbE/g für rohes Rindfleisch definiert, sodass bei einer Keimzahl über diesen Wert hinaus die gesundheitliche Unbedenklichkeit nicht gewährleistet ist (DGHM 2018; DGHM 2021).

Die in dieser Arbeit ermittelten Keimzahlwerte der quantitativ untersuchten Proben lagen unterhalb des Richtwertes der DGHM, sodass das Untersuchungsergebnis als akzeptabel einzustufen ist. Dennoch sind die Eingangsuntersuchungen auf *L. monocytogenes* von importiertem Rindfleisch dringend zu empfehlen, da das für den Import nach Deutschland vorgesehene rohe Rindfleisch über einen längeren Zeitraum gekühlt transportiert und gelagert wird und eine Vermehrung von psychotrophen Bakterien wie *L. monocytogenes* begünstigt sein kann (Jones und D'Orazio 2013; Glass und Doyle 1989). So konnte bereits in vergangenen Studien ein Wachstum von *L. monocytogenes* in gekühltem Fleisch nachgewiesen werden: Glass und Doyle (1989) beobachteten einen Anstieg von 10^3 auf 10^5 KbE/g über einen Zeitraum von vier Wochen bei $4,4^\circ\text{C}$ Lagerungstemperatur in vakuumverpacktem Rindfleisch, während Barbosa et al. (1995) eine Wachstumsrate von $0,066 \log_{10} \text{KBE/g/Tag}$ bei 4°C in Rinderhackfleisch beobachteten. Grau und Vanderlinde (1990) berichteten zudem über ein Überleben von *L. monocytogenes* über einen Zeitraum von bis zu 76 Tagen bei 0°C in Rinderfilet. In einer weiteren Studie von Burnett et al. (2005) wurden Wachstumsraten von bis zu $0,45 \log_{10} \text{KbE/g/Tag}$ bei 5°C in verzehrfertigen Fleischprodukten detektiert, welche bei einer Lagerung bei 10°C auf eine Wachstumsrate von bis zu $1,08 \log_{10} \text{KbE/g/Tag}$ anstieg. Aus diesen Daten lässt sich schlussfolgern, dass zum einen mit einer Persistenz des Erregers selbst bei ausreichender Kühlung zu rechnen ist, sowie zum anderen eine Vermehrung von *L. monocytogenes* in gekühlt transportiertem Rindfleisch, wie in der vorliegenden Arbeit untersucht wurde, nicht auszuschließen ist. So kann bei einer weiteren Lagerung der Rindfleischproben mit ansteigenden Keimzahlen von *L. monocytogenes* gerechnet werden, die ein späteres gesundheitliches Risiko darstellen können (Jones und D'Orazio 2013).

Des Weiteren wurden in der vorliegenden Arbeit *Staphylococcus aureus* lediglich in einer aus Argentinien eingeführten Rindfleischprobe detektiert und der ermittelte Keimzahlwert lag mit $2,54 \log_{10} \text{KbE/g}$ lag unterhalb des DGHM-Richtwertes. Deutlich höhere *S. aureus* -Nachweisraten dokumentieren Bosilevac et al. (2007) mit 29,5% (71 von 256) in aus Uruguay in die USA importiertem Rindfleisch. Ebenfalls höhere Nachweisraten wurden in importiertem Geflügelfleisch (16%, 78 von 475) und importiertem Schweinefleisch (10,3%, 13 von 134) dokumentiert (Jansen et al. 2018). Obschon die Vergleichbarkeit aufgrund der deutlichen höheren Probenanzahl von Bosilevac et al. (2007) und der unterschiedlichen Fleischprodukte eingeschränkt ist,

geht aus vergangenen Studien sowie der vorliegenden Arbeit hervor, dass importiertes Fleisch als Vehikel für *S. aureus* dienen kann, sodass die Detektion von *S. aureus* bei Einfuhruntersuchungen von rohem Rindfleisch zu empfehlen ist. Eine Kontamination von Lebensmitteln mit *S. aureus* ist vor allem unter dem Aspekt interessant, da *S. aureus*, bestimmte SE-Gene beherbergen können, die für hitzestabile Enterotoxine codieren, die im Falle einer Intoxikation beim Menschen zu Bauchkrämpfen, Vomitus und Nausea führen können, worauf in Kapitel 5.3.2 eingegangen wird.

In den Proben konnten keine *Salmonella* spp. nachgewiesen werden. Über den Nachweis von *Salmonella* spp. in importiertem Rindfleisch sind wenig Daten bekannt. In einer Studie, in welcher Untersuchungen an in die EU importiertem Geflügel- und Schweinefleisch durchgeführt wurden, konnte in keiner der untersuchten Schweinefleischproben (136) *Salmonella* spp. nachgewiesen werden, wohingegen in den Geflügelfleischproben (498) ein positiver Salmonellen-Nachweis in 1,2% (6) der Proben erfolgte (Jansen et. al. 2018). Dieser Nachweis ist insofern nicht verwunderlich, da Geflügelfleisch die am häufigsten mit *Salmonella* spp. kontaminierte Lebensmittelmatrix darstellt. So lassen sich allein 94,45% (3170) der gemeldeten RASFF-Meldungen (3356) in den Jahren 2020-2022 innerhalb der Kategorie „Pathogene Mikroorganismen“ in der untersuchten Lebensmittelmatrix „Geflügelfleisch und Geflügelfleischprodukte“ auf den Nachweis von *Salmonella* spp. zurückführen (Eissa et al. 2025). Nach Angaben der Zoonoseberichterstattung der EFSA ist die Untersuchung von rohem, unverarbeitetem Rindfleisch auf den Nachweis von *Salmonella* spp. nicht in routinemäßige Untersuchungen eingeschlossen. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass ein niedriges Salmonellen-Risiko bei Rindfleisch angenommen wird. In die Untersuchungen der EFSA wurden in den letzten Jahren Rinderschlachtkörper inkludiert, bei denen eine niedrige *Salmonella*-spp.-Prävalenz von 0,81% (106) bei insgesamt 13.071 untersuchten Schlachtkörpern detektiert wurde (EFSA 2022a). In einer weiteren Studie der Autoren Stella et al. (2013), in der nach Italien importiertes Rindfleisch umfassenden mikrobiologischen Untersuchungen unterzogen wurde, wurde die Untersuchung auf *Salmonella* spp. nicht inkludiert. Dass Rindfleisch als Vehikel für *Salmonella* spp. dienen kann, wurde in einer Studie, in der aus Uruguay in die USA importiertes Rindfleisch untersucht wurde, gezeigt: Hier konnten in einer Probe *Salmonella* spp. nachgewiesen werden (Bosilevac et. al. 2007). Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass in dieser Studie eine deutlich höhere Probenanzahl (256) im Vergleich zu der hier vorliegenden Arbeit untersucht wurde.

Dennoch zeigt das Ergebnis dieser Studie, dass Eingangsuntersuchungen von importiertem rohem Rindfleisch auf *Salmonella* spp. als sinnvoll erachtet werden können.

5.2.3 Mikrobiologische Qualität illegal importierter Lebensmittel tierischer Herkunft anhand von Hygieneparametern

Zur Evaluierung der mikrobiologischen Qualität von insgesamt 100 illegal importierten Lebensmitteln tierischer Herkunft erfolgte nach DIN ISO Standardmethoden eine Erhebung der aeroben mesophilen Gesamtkeimzahl (AKZ) sowie der Nachweisraten von *Enterobacteriaceae* und *E. coli*. Zudem wurden die Proben auf die Anwesenheit von lebensmittelassoziierten bakteriellen Pathogenen (*Salmonella* spp., *L. monocytogenes*, *S. aureus* and STEC) untersucht (Publikation 2). Um die mikrobiologische Qualität illegal importierter Lebensmittel tierischen Ursprungs beurteilen und mit den auf EU- und nationaler Ebene festgelegten mikrobiologischen Kriterien vergleichen zu können, wurden die Grenzwerte der Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 (soweit vorhanden) sowie die mikrobiologischen Richt- und Warnwerte der DGHM als Referenz herangezogen (Publikation 2). Dabei gilt es zu berücksichtigen, dass es sich um illegal importierte Produkte handelt, die nicht für den Binnenmarkt produziert worden sind, und diese Grenz- bzw. Warnwerte lediglich als Orientierung herangezogen wurden. Um die Keimzahlwerte auszuwerten, wurden sie \log_{10} transformiert. Zusätzlich erfolgte eine Untersuchung auf ESBL/AmpC-produzierende Enterobacterales sowie Methicillin-resistente *S. aureus* (MRSA) worauf in den Kapiteln 5.3.2 bzw. 5.3.3 eingegangen wird.

Insgesamt konnten im Rahmen der mikrobiologischen Untersuchungen erhebliche (mikrobiologische) hygienische Mängel bei den 100 konfiszierten Lebensmitteln tierischer Herkunft festgestellt werden, welche im Detail im untenstehenden Text dieses Kapitels erläutert werden. Hygienedefizite konnten bereits von Nagy et. al. (2015), Beutlich et. al. (2014), Ciolacu et. al. (2016) sowie Schoder et. al. (2014) an illegal eingeführten Lebensmitteln tierischer Herkunft festgestellt werden. Für die in dieser Studie untersuchten Produkte sind keine Grenz- oder Warnwerte durch die VO (EG) Nr. 2073/2005 vorgegeben. Für einen Großteil der Fleischprodukte (21 von 29), für die jedoch DGHM-Werte zur Evaluierung herangezogen werden konnten, wurden diese überschritten (Publikation 2, Tabelle 4). Die Autoren der Studie von Beutlich et. al. (2014), in welcher zur Evaluierung des hygienischen Status die erhobenen AKZ-

Werte ebenfalls mit den DGHM-Richtwerten verglichen wurden, wiesen eine Überschreitung in 25% (70 von 282) der untersuchten Fleisch- und Fleischprodukte nach, wobei hier keine Angaben über die jeweilige Produktart bzw. den Verarbeitungszustand dokumentiert ist, sodass eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse nicht möglich ist.

In der vorliegenden Arbeit konnten zudem in über einem Drittel (36%) der Proben *Enterobacteriaceae* nachgewiesen werden. Für die hier untersuchten Produkte sind seitens der VO (EU) Nr. 2073/2005 keine Grenzwerte vorgegeben, wohingegen seitens der DGHM für 12 der 40 untersuchten Milchprodukte DGHM-Warnwerte herangezogen werden konnten. Fünf (5/12) aus der Türkei eingeführte Produkte überschritten diese Warnwerte. Bei den Fleisch- und Fleischprodukten konnten für insgesamt 56 der 60 untersuchten Produkte DGHM-Warnwerte zur Evaluierung herangezogen werden, wovon 13 diese übertrafen (Publikation 2, Tabelle 4). Der Fäkalindikator *E. coli* wurde in insgesamt 23% der Proben nachgewiesen. Dabei überschritten sieben Milchprodukte (7/36) die zur Evaluierung herangezogenen Werte der VO (EU) Nr. 2073/2005. Bei den Fleischprodukten wurde in zwei Rohwürsten und zwei rohen Fleischproben eine Überschreitung der DGHM-Warnwerte für *E. coli* festgestellt (Tabelle 4, Publikation 2). Insbesondere die Überschreitung der zur Evaluierung herangezogenen Werte der VO (EG) Nr. 2073/2005 für *E. coli* in den Milchprodukten zusammen mit der Überschreitung der DGHM-Warnwerte für *Enterobacteriaceae* deuten auf hygienische Defizite sowie fäkale Kontaminationen in den illegal eingeführten Lebensmitteln hin (Buchanan 2000; Ghafir et al. 2008). Ebenso konnten auch von Nagy et al. (2015) mit einer *E. coli*-Nachweisrate von 18,8% (113/600) bei illegal über den Flugverkehr eingeführten Lebensmitteln tierischer Herkunft hygienische Mängel nachgewiesen werden. Diese erhobene Nachweisrate wurde analog zu der vorliegenden Arbeit mit denen VO (EU) Nr. 2073/2005-Grenzwerten verglichen, und es konnte festgestellt werden, dass 25 von 262 (9,5%) der Fleisch- und Fleischprodukte sowie 42 von 315 (13,3%) der Milchprodukte diese überschritten. Dabei wurde fast ein Drittel (27%) der insgesamt untersuchten Proben (474) aus der Türkei eingeführt. Dies ist insofern interessant, da in der vorliegenden Arbeit insgesamt 39% der Proben von aus der Türkei einreisenden Passagieren konfisziert wurden. Mittels statistischer Analysen konnte ermittelt werden, dass Proben aus Südwestasien (insgesamt n = 47, von diesen n = 39 aus der Türkei) häufiger mit *Enterobacteriaceae* und *E. coli* kontaminiert waren. Hygienische Defizite in türkischen Lebensmitteln

konnten bereits von Autoren einer Studie nachgewiesen werden, in der insgesamt 67 Fleisch- und Fleischprodukte sowie 112 Milchprodukte aus Kleinbetrieben der Türkei untersucht wurden. In dieser Studie von Çetin et al. (2018) wurden *Enterobacteriaceae* und *E. coli* in 126 (70,4%) bzw. 88 (49,2%) der Proben detektiert, und die Mehrheit der Proben (53,6% in denen *Enterobacteriaceae* und 27,9 % in denen *E. coli* detektiert wurde) zeigten Keimzahlwerte von mehr als 10^3 KBE/g auf (Çetin et al. 2018). Dass die hygienischen Defizite bei illegal eingeführten Lebensmitteln durch ungekühlte Transportwege sowie mangelnde Hygienebedingungen während der Verarbeitung begünstigt werden, schlussfolgerten auch die Autoren der Studie um Beutlich et. al. (2014) sowie Jansen et. al. (2018). Dass insbesondere die ungekühlte Lagerung von Lebensmitteln zu einer Verschlechterung der hygienischen Qualität führt, belegen auch mehrere Studien, die eine längere Lagerung der Produkte bei Raumtemperaturen ($>18^\circ\text{C}$) durchgeführt haben (Dabasso et al. 2021; Venter et al. 2006; Handley et al. 2010). Die Autoren der Studie von Dabasso et. al. (2021), die Untersuchungen an getrockneten Fleischprodukten durchführten, verglichen die AKZ-Werte bei 5°C und bei Raumtemperatur und dokumentierten einen Unterschied von $1,91 \log_{10}$ KbE/g auf $2,51 \log_{10}$ KbE/g. Einen großen Einfluss der Lagerungstemperatur wiesen des Weiteren die Autoren der Studie um Handley et. al (2010) nach. Sie dokumentieren an frischem Geflügelfleisch bei einer Temperaturerhöhung von 7°C auf 21°C innerhalb von 54 Stunden eine Erhöhung des AKZ-Keimzahlwertes von $2,86 \log_{10}$ KbE/g auf $7,02 \log_{10}$ KbE/g, der *Enterobacteriaceae*-Keimzahl von $0,66 \log_{10}$ KbE/g auf $6,64 \log_{10}$ KbE/g sowie der quantitativen *E. coli*-Detektion von $0,53 \log_{10}$ KbE/g auf $4,45 \log_{10}$ KbE/g.

Mittels statistischer Analysen konnte ermittelt werden, dass die in dieser Arbeit untersuchten individuell verpackten Proben häufiger mit *Enterobacteriaceae* und *E. coli* kontaminiert waren als industriell verpackte Proben (Chi-Quadrat-Test $p=0,002$, $p=0,004$). Die individuelle Verpackung, die bei einem Großteil (72%) der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Proben vorzufinden war, lässt auf die Herstellung in einem Privathaushalt schließen. In einer Studie der Autoren um Ciolacu et. al. (2016), in der illegal nach Rumänien eingeführte Lebensmittel untersucht wurden, wurden statistisch signifikant höhere AKZ-Werte ($>10^7$ KbE/g) in Fleischprodukten, die in Privathaushalten hergestellt worden sind, im Vergleich zu kommerziell hergestellten Produkten, detektiert. Des Weiteren wurden in der Studie von Beutlich et. al. (2014), in welcher ebenfalls hygienische Defizite in den illegal über den Flugverkehr

eingeführten Lebensmittel festgestellt wurden, ein Großteil der Proben (52% der Milchprodukte und 35% der Fleischprodukte) ebenfalls als nicht kommerziell bzw. im privaten Haushalt hergestellt eingruppiert. Betrachtet man diese Ergebnisse in Kombination mit denen in der vorliegenden Arbeit lässt sich daraus schließen, dass neben der unzureichenden Kühlung die Herstellung im Privathaushalt im Zusammenhang mit den hygienischen Defiziten steht. Bei diesen Produkten ist zu vermuten, dass eine Kontamination während der Verarbeitung und/oder Verpackung der Lebensmittel mit bakteriellen Erregern stattgefunden hat. Ähnliches schlussfolgern auch die Autoren der Studie um Ciolacu et. al. (2016), da bei in Privathaushalten hergestellten Fleischprodukten wirksame Prozesse, die nachweislich zu einer Reduktion einer unerwünschten Mikroflora führen, nicht oder nur unvollständig durchgeführt werden. Bei Fleischprodukten sind als effektive Maßnahmen beispielsweise eine ordnungsgemäße und zeitnahe Ausweidung sowie effiziente Kühlverfahren während der Lagerung geeignet, um eine Reduktion der mikrobiellen Besiedlung von rohem Fleisch erheblich zu reduzieren (Cervený et al. 2009).

Neben den Hygieneindikatoren bei Lebensmitteln sind einige Bakterienspezies wie *Salmonella* spp., *L. monocytogenes* oder STEC in ihrer Rolle als lebensmittelassoziierte Pathogene von hoher Relevanz (EFSA 2023). Auf den Nachweis und die Bedeutung von lebensmittelassoziierten Pathogenen in illegal importierten Lebensmitteln wird im folgenden Kapitel eingegangen.

5.2.4 Nachweis von lebensmittelassoziierten Pathogenen in illegal importierten Lebensmitteln tierischer Herkunft

Bei den illegal importierten Lebensmitteln tierischer Herkunft konnten in 17 der insgesamt 100 untersuchten Proben lebensmittelassoziierte bakterielle Pathogene (*Salmonella* spp., *L. monocytogenes*, *S. aureus* und STEC) detektiert werden (Tabelle 2, Publikation 2). Die Ergebnisse der statistischen Analysen zeigten keine Korrelation zwischen individuell verpackten Proben und dem Nachweis von lebensmittelassoziierten Pathogenen bzw. zwischen dem Erregernachweis und der Herkunft der Proben bzw. der Art des Lebensmittels.

Am häufigsten konnte *S. aureus* mit einer Detektionsfrequenz von 11% innerhalb der Proben nachgewiesen werden. In einer umfassenden Auswertung, in der der mikrobiologische Status von insgesamt 692 illegal in die EU eingeführten Fleisch- und Fleischprodukten sowie Milchprodukten, evaluiert wurde, konnte festgehalten werden, dass illegal importierte Milchprodukte am häufigsten mit *S. aureus* kontaminiert sind,

mit einer Prävalenz von 7,4% und vorrangig in hohen Konzentrationen ($>6 \log_{10}$ KbE/g) (Jansen et al. 2019). In einer Studie der Autoren Schoder et. al. (2014) konnten in 4,1% der illegal eingeführten Milchprodukte *S. aureus* detektiert werden, wohingegen in einer weiteren Studie der Autoren Ciolacu et. al. (2015) die *S. aureus*-Nachweisrate bei 11% (8 von 73) lag. Die in dieser Arbeit erhobene *S. aureus*-Detektionsfrequenz in Milchprodukten lag mit 15% (5/40) etwas höher. Die unterschiedlichen Detektionsraten können im Zusammenhang mit dem heterogenen Probenspektrum stehen. Unter den Milchprodukten in der Studie um Ciolacu et. al. (2015) wurden unter anderem Rohmilch sowie Rohmilchprodukte untersucht, welche in der Literatur als häufig mit *S. aureus* kontaminierte Produkte beschrieben sind. Damit könnte die höhere Detektionsrate zu erklären sein (Rosengren et al. 2010). Die niedrigere Detektionsrate von Schoder et. al (2014) könnte darauf zurückzuführen sein, dass es sich bei fast der Hälfte der Milchprodukte um gereiften Käse handelte und nur ein geringer Anteil der Proben (7,6%, 20/262) als Salzlakenkäse eingruppiert wurde, wohingegen in der vorliegenden Arbeit ein vergleichsweise hoher Anteil dieses Produktes untersucht wurde (28%, 11/40). Dabei kann durch die Abwesenheit konkurrierender Starterkulturen und einen relativ hohen pH-Wert (5,2-6,1) das Wachstum von Mikroorganismen wie *S. aureus* in Salzlakenkäse begünstigt sein (Al-Nabulsi et al. 2020; Al-Holy et al. 2012). Zudem können eine nicht ausreichende Salzkonzentration der Salzlake ($<15\%$), die bei illegal eingeführten Produkten unter Umständen nicht gewährleistet werden kann, sowie eine unzureichende Lagerungstemperatur ($>10^\circ \text{C}$), die bei den illegal eingeführten Lebensmitteln bereits beschrieben wurde, zu einer Vermehrung von *S. aureus* beitragen (Al-Nabulsi et al. 2020).

Bei den untersuchten Fleisch- und Fleischprodukten konnte eine *S. aureus*-Nachweisrate von 10% (6/60) ermittelt werden. Im Gegensatz dazu zeigen Auswertungen bisher untersuchter illegal importierter Fleisch- und Fleischprodukte insgesamt geringere Nachweisraten (4,3%) (Jansen et al. 2019). In den hier untersuchten Proben konnten in einer Probe (Schafsfett, importiert aus Syrien) ein Keimzahlwert über 10^5 KbE/g bzw. in einer Probe (Getrocknetes Rindfleisch, importiert aus der Türkei) ein Wert über 10^6 KbE/g ermittelt werden, wobei für die untersuchten Lebensmittelmatrices keine Grenzwerte in der VO (EG) Nr. 2073/2005 und keine DGHM-Warnwerte definiert sind. Für die restlichen Proben lagen Werte jeweils unter 10^5 KbE/g vor. Der Nachweis von *S. aureus* in Lebensmitteln tierischer Herkunft in hohen Konzentrationen ist dabei in dem Hinblick von besonderer Relevanz, da *S.*

aureus, die SE-Gene beherbergen, insbesondere bei höheren Keimzahlwerten über $10^5 \log_{10}$ KbE/g hitzestabile Enterotoxine bilden, die ein potentiell gesundheitliches Risiko für den Verbraucher darstellen (Hennekinne et al. 2010). Auf den Nachweis von Genen, die für hitzestabile Enterotoxine codieren, bei denen in dieser Arbeit isolierten *S. aureus*-Isolaten wird in Kapitel 5.3.2 eingegangen. Ähnliche Ergebnisse konnten auch in anderen Studien ermittelt werden, in denen die Konzentrationswerte von *S. aureus* in illegal importierten Fleisch- und Fleischprodukten im Mittel unter 10^5 KbE/g lagen. Allerdings sind für illegal importiertes Schweinefleisch höhere Werte ($<10^6$ KbE/g) beschrieben (Jansen et al. 2019; Rodríguez-Lázaro et al. 2015). Vergleicht man nun die erhobenen Keimzahlwerte mit den vorgegebenen mikrobiologischen Kriterien der VO (EG) Nr. 2073/2005, überschritten bei den Milchprodukten zwei Proben, bei denen es sich jeweils um zwei aus der Türkei eingeführte Salzlakenkäse handelte, mit einem Keimzahlwert von $3,60 \log_{10}$ KbE/g bzw. $5,04 \log_{10}$ KbE/g den angegebenen Grenzwert von $3,0 \log_{10}$ KbE/g.

In einer hier untersuchten Probe (Schafsfett, importiert aus Syrien) wurde eine Co-Kontamination mit *S. aureus* und STEC nachgewiesen. Insgesamt wurde lediglich in dieser Probe STEC nachgewiesen, woraus sich insgesamt eine STEC-Prävalenz von 1%, und innerhalb der Fleischprodukte von 1,6%, ergab. Vergleicht man diese Nachweisrate mit vorherigen Auswertungen der STEC-Prävalenz in illegal importierten Fleischprodukten, fällt auf, dass eine niedrige STEC-Nachweisrate mit 0,5% in einer Studie beschrieben ist (Jansen et al. 2019). In einer anderen Studie um Schoder et al. (2014) wurde eine vergleichbare Nachweisrate von 1,1% (3 von 262) in Fleischprodukten dokumentiert. In zwei weiteren Studien der Autoren Ciolacu et al. (2016) sowie Rodríguez-Lázaro et al. (2015), in denen illegal eingeführte Lebensmittel untersucht worden sind, konnten keine STEC nachgewiesen werden. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass die Nachweismethoden für STEC sich von den in dieser Arbeit verwendeten Methoden unterschieden. Beispielsweise verwenden Schoder et al. (2015) sowie Beutlich et al. (2015) in ihren Studien ein mit Novobiocin angereichertes Nährmedium, was einen Einfluss auf die Nachweisrate gehabt haben könnte. So wurde bereits gezeigt, dass zwar das Wachstum von STEC O157:H7 durch Novobiocin erheblich begünstigt werden kann, jedoch andere nicht-O157:H7 STEC-Serotypen wie O103 und O145 in ihrem Wachstum gehemmt werden (Kanki et al. 2011; Vimont et al. 2007).

In Milchprodukten ist insgesamt in illegal eingeführten Lebensmitteln eine höhere STEC-Nachweisrate von 2,2% beschrieben (Jansen et al. 2019). Die Autoren der Studie von Schoder et. al. (2015) dokumentieren eine STEC-Kontaminationsrate von 1,6% (5/315) und die Autoren der Studie um Beutlich et. (2015) konnten in 7 der insgesamt 328 (2,13%) konfiszierten Milchprodukten STEC nachweisen. Auffallend war dabei, dass die insbesondere die illegal aus der Türkei eingeführten Milchprodukte, eine höhere STEC-Kontaminationsrate auswiesen (Nagy et al. 2015; Schoder et al. 2015; Beutlich et al. 2015). In der Studie aus Deutschland der Autoren Schoder et. al. (2015) sowie in der österreichischen Studie um Beutlich et. al (2015) ist dabei beschrieben, dass es sich bei 60% bzw. 100% der STEC-positiven Milchprodukte um Käse aus der Türkei handelte. Vergangene Studien der Autoren Sancak et al. (2015) sowie Gundogan und Avci (2014), die in der Türkei hergestellten Käse untersuchten haben, dokumentieren STEC-Prävalenzen von jeweils 2%. Dadurch könnten die höheren STEC-Nachweisraten in den oben genannten Studien der Autoren um Schoder et. al. (2015) sowie Beutlich et. al. (2015) zu erklären sein. In der vorliegenden Arbeit wurden allerdings keine STEC in den Milchprodukten nachgewiesen. Interessanterweise wurde ein Großteil der Milchprodukte aus der Türkei importiert (n = 29). Hierbei ist zu berücksichtigen, dass in den oben genannten Studien die Anzahl der untersuchten Milchprodukte deutlich größer war und so ein direkter Vergleich der Ergebnisse lediglich bedingt möglich ist.

Das Weiteren konnte in der vorliegenden Arbeit eine Prävalenz von *Listeria monocytogenes* von 3% in den untersuchten illegal eingeführten Lebensmitteln tierischer Herkunft ermittelt werden. Dabei handelte es sich bei zwei Produkten um rohes Rindfleisch aus Armenien bzw. Kasachstan und bei einem Produkt um einen aus Armenien eingeführten Käse. Für rohes Rindfleisch sind in der VO (EU) Nr. 2073/2005 keine Grenzwerte für *L. monocytogenes* angegeben. Vergleicht man die hier erhobenen Keimzahlwerte mit dem DGHM-Warnwert ($2,0 \log_{10} \text{KbE/g}$) für rohes Rindfleisch, wurde dieser in beiden illegal importierten rohen Rindfleischproben überschritten (Tabelle 2, Publikation 2). In der Literatur ist *L. monocytogenes* als der am häufigsten nachgewiesene bakterielle pathogene Erreger in illegal in die EU eingeführten Fleisch- und Fleischprodukten mit einer Nachweisrate von 5% beschrieben, wobei sich die einzelnen Studien hinsichtlich der Nachweisraten unterschieden (Jansen et al. 2019; Schoder et al. 2015; Beutlich et al. 2015; Rodríguez-Lázaro et al. 2015). Dabei dokumentierten die Autoren der spanischen

Studie eine höhere Kontaminationsrate von 7,5% in konfiszierten Fleischprodukten (Rodríguez-Lázaro et al. 2015). Die deutlichen höheren Kontaminationsraten mit 7,5% (15 von 200) könnten damit im Zusammenhang stehen, dass sich die Probenherkunft von der in der vorliegenden Arbeit unterschied und zudem heterogener ausfiel. So stammten die *L. monocytogenes*-positiven Proben vorwiegend aus China (3), Ecuador (2), Kolumbien (2) und der Ukraine (2), wobei es sich um Herkunftsländer handelt, aus denen in der vorliegenden Arbeit keine illegal eingeführten Lebensmittel konfisziert worden sind. Eine mit der in der vorliegenden Arbeit vergleichbaren *L. monocytogenes*-Prävalenz mit 4,2% wurde dahingegen bei illegal importierten Fleisch- und Fleischprodukten an zwei deutschen Flughäfen (Schoder et. al. 2014) detektiert. Bei Betrachtung der quantitativen Ergebnisse der in der eigenen Studie untersuchten Milchprodukte konnte lediglich in einem Milchprodukt (Käse, importiert aus Armenien) *L. monocytogenes* mit einem Keimzahlwert von 1,79 log₁₀ KbE/g nachgewiesen werden, wobei der Grenzwert gemäß der VO (EU) Nr. 2073/2005 somit nicht überschritten wurde. Trotz einer insgesamt niedrigen Nachweisrate von *L. monocytogenes* in den hier untersuchten Proben sollte berücksichtigt werden, dass der Verzehr von mit *L. monocytogenes* kontaminierten Lebensmitteln insbesondere für Risikogruppen ein gesundheitliches Risiko darstellt. In der Literatur ist beschrieben, dass schwangere Frauen aufgrund einer schwangerschaftsbedingten Immunsuppression und des Plazentotropismus von *L. monocytogenes* etwa 18-mal anfälliger für eine Listeriose sind als die normale Bevölkerung (Madjunkov et al. 2017). Eine Infektion mit dem Erreger während der Schwangerschaft kann zu schwerwiegenden Folgen wie Fehlgeburten oder neonataler Sepsis und Meningitis führen, mit einer Sterblichkeitsrate von 25–35% bei fetaler Listeriose und 20% bei neonatalen Fällen (Madjunkov et al., 2017). Des Weiteren sind einzelne Stämme bzw. genetische Linien von *L. monocytogenes* mit einer erhöhten Virulenz assoziiert, auf die in Kapitel 5.3.3 eingegangen wird (Vázquez-Boland et al. 2020).

In den in der eigenen Studie untersuchten illegal eingeführten Milch- und Milchprodukten wurden keine *Salmonella* spp. nachgewiesen. Insgesamt ist in der Literatur eine geringe *Salmonella* spp. Nachweisrate von 0,86% bei konfiszierten Milchprodukten von in die EU einreisenden Flugpassagieren dokumentiert. Allerdings zeigen die Nachweisraten in den einzelnen Studien Unterschiede auf (Jansen et al. 2019; Schoder et al. 2015; Beutlich et al. 2015). Während in einer deutschen Studie in illegal über den Flugverkehr importierten Milchprodukten keine Salmonellen

nachgewiesen wurden, dokumentierten spanische Autoren eine höhere Nachweisrate von 6,7% (5/75) (Rodríguez-Lázaro et al. 2015; Beutlich et al. 2015). Eine direkte Vergleichbarkeit der Detektionsrate ist jedoch schwierig, da sich die Probenherkunft deutlich von der in der vorliegenden Arbeit unterscheidet. So untersuchten Rodríguez-Lázaro et al. (2015) beispielsweise zu einem großen Anteil aus Südamerika eingeführte Lebensmittel, wohingegen in der vorliegenden Arbeit keines der Produkte aus dieser Region eingeführt wurde. Höhere Kontaminationsraten mit *Salmonella* spp. in Milchprodukten aus Südamerika konnten bereits in vergangenen Studien nachgewiesen werden, die mit den von Rodríguez-Lázaro et al. (2015) erhobenen Ergebnissen übereinstimmen. So dokumentierten die Autoren zweier brasilianischer Studien in untersuchten Käseproben *Salmonella* spp.-Nachweisraten zwischen 1,3% (3/225) und 8,7% (2/23) nach (Castañeda-Salazar et al. 2021; Carvalho et al. 2009). Insbesondere nicht festgelegte Verarbeitungs- und Hygienestandards, traditionelle/ursprüngliche Produktionsmethoden sowie eine unzureichende Umsetzung guter Hygienepraktiken in Südamerika seien potenzielle Faktoren, die zu höheren *Salmonella* spp.-Nachweisraten in Lebensmitteln in Südamerika führen (Ramos et al. 2021).

In den in dieser Arbeit untersuchten Fleisch- und Fleischprodukten wurden drei Fleischprodukte positiv auf *Salmonella* spp. getestet, was einer Nachweisrate von 5% entspricht. Dies entspricht der von Rodríguez-Lázaro et al. (2015) detektierten Kontaminationsfrequenz von 5% der Proben bei illegal eingeführten Fleischprodukten, die über einen spanischen Flughafen importiert wurden. Im Gegensatz dazu berichten Schoder et al. (2015) von einer etwas niedrigeren Kontaminationsrate von 1,9% (5/262). Obschon eine direkte Vergleichbarkeit der Detektionsraten aufgrund der unterschiedlichen Probenanzahl und Probenherkünfte nur bedingt möglich ist, fällt auf, dass es sich bei einem Großteil der Fleischprodukte, bei denen die Tierart identifiziert werden konnte (57,6%, 150 Produkte), um Geflügelfleisch (63) handelte. Dieses Ergebnis war zu erwarten, da Geflügelfleisch als die am häufigsten mit *Salmonella* spp. kontaminierte Lebensmittelmatrix beschrieben ist (EFSA 2022a; EFSA 2023).

Die in der vorliegenden Arbeit festgestellte *Salmonella* spp.-Kontamination ist durchaus relevant, da es sich bei zwei der drei *Salmonella enterica*-positiven Proben um verzehrfertige Fleischprodukte handelte (Getrocknetes Rindfleisch und Rohwurst vom Schwein), bei denen von keiner Erhitzung vor dem Verzehr auszugehen ist. Für eine keimabtötende Wirkung von *Salmonella* spp. wird nach Angaben des Autors

Juneja (2007) eine Kerntemperatur von mindestens 62,5 °C in Geflügelfleisch über mindestens 5,88 Minuten benötigt. Das RKI gibt sogar eine höhere Kerntemperatur von 70 °C in Lebensmitteln wie rohem Geflügelfleisch für 10 Minuten vor (RKI 2016a). In früheren Untersuchungen an illegal importierten Lebensmitteln wurde bereits gezeigt, dass in importierten Fleisch- und Fleischerzeugnissen *Salmonella enterica* Serotypen wie *S. Enteritidis* und *S. Typhimurium*, welche am häufigsten in humane Salmonellosefälle in der EU involviert sind, nachgewiesen werden (Jansen et al. 2019; Beutlich et al. 2015; Rodríguez-Lázaro et al. 2015; EFSA 2022a). So wurden allein in der EU 65.208 (2022) gemeldete Salmonellosefälle verzeichnet, bei denen in über der Hälfte der Erkrankungsfälle das Serovar *Enteritidis* nachgewiesen wurde (EFSA 2023).

Da illegal eingeführte Lebensmittel als Vehikel und potenzielle Kontaminationsquelle dieser pathogenen Serovare dienen können, war eine Serovar-Bestimmung der in der eigenen Studie gefundenen *Salmonella enterica*-Isolate unerlässlich, worauf in Kapitel 5.3.4 eingegangen wird.

Insgesamt ist aufgrund der Heterogenität illegal eingeführter Lebensmittel tierischer Herkunft eine direkte Vergleichbarkeit mit früheren Studien in Bezug auf die Nachweisraten lebensmittelassoziierter Pathogene schwierig. Zudem ist wichtig zu betonen, dass es sich bei den Produkten um illegal eingeführte Lebensmittel handelt und sie nicht für den kommerziellen Markt eingeführt wurden. Damit fallen diese nicht in den Geltungsbereich der VO (EG) Nr. 2073/2005 sowie den der Empfehlungen der DGHM.

Dennoch zeigen die Ergebnisse, dass die illegal importierten Lebensmittel teilweise nicht den mikrobiologischen Kriterien auf EU-Ebene bzw. den Warnwerten der DGHM entsprechen.

In diesem Kontext ist neben der rein mikrobiologischen Analyse insbesondere auch die molekularbiologische Untersuchung dieser Isolate wichtig, um Hinweise auf die Pathogenität der einzelnen bakteriellen lebensmittelassozierten Erreger zu erhalten. Dies kann zur Klärung der Fragestellung beitragen, inwiefern illegal importierte Lebensmittel tierischer Herkunft einen Einfluss auf eine mögliche Verbreitung pathogener und/oder besonders virulenter Genotypen haben können (Kapitel 5.3).

5.3. Molekulare Charakteristika der aus legalen und illegal importierten Lebensmittel tierischer Herkunft gewonnenen Isolate

Um die molekularen Charakteristika der in dieser Arbeit gewonnenen Isolate zu analysieren, wurden alle STEC-Isolate (n = 3), die aus illegal importierten Lebensmitteln tierischer Herkunft isolierten *L. monocytogenes* (n = 3) und *S. aureus*-Isolate (n = 11) einer Ganzgenomsequenzierung (WGS) unterzogen. Die Herkünfte der molekularbiologisch untersuchten Isolate sind in Tabelle 3 aufgeführt. Die WGS bietet eine präzise Möglichkeit, die Genome lebensmittelassoziierter Pathogene zu analysieren und zu vergleichen, Resistenzdeterminanten sowie Virulenz-assoziierte Gene zu bestimmen und ermöglicht eine Verwandtschaftsanalyse einzelner Isolate (Painset et al. 2019; Moura et al. 2016). Die Analyse von WGS-Daten wird mittlerweile als Standardmethode für die Untersuchung epidemiologischer Zusammenhänge bei lebensmittelassozierten Infektionsgeschehen verwendet (Painset et al. 2019; EFSA 2022c). Die Genomsequenzen der STEC-Isolate wurden in die *Escherichia/Shigella*-Enterobase Datenbank hochgeladen (<http://enterobase.warwick.ac.uk/>) (Accession numbers siehe Publikation 1 und 2). Außerdem wurden die erhaltenen Genomsequenzen der STEC-Isolate (Publikation 1) in der GenBank-Datenbank hinterlegt (Zugangsnummern/Projektnummern siehe Publikation 1 und 2).

Tabelle 3: Herkünfte der mittels Ganzgenomsequenzierung untersuchten Isolate

Isolat	Spezies	Matrix	Tierart	Herkunft	Status
Fa8	<i>S. aureus</i>	Salzlakenkäse	N.b. ¹	Türkei	illegal
Fa12	<i>S. aureus</i>	Fett	Schaf	Türkei	illegal
Fa14	<i>S. aureus</i>	Getrocknetes Fleisch	Rind	Türkei	illegal
Fa24	<i>S. aureus</i>	Fett mit rohen Fleischstücken	Schaf	Syrien	illegal
Fa29	<i>S. aureus</i>	Salzlakenkäse	N.b.	Türkei	illegal
Fa30	<i>S. aureus</i>	Rohwurst	Rind	Türkei	illegal
Fa32	<i>S. aureus</i>	Käse	N.b.	Moldawien	illegal
Fa52	<i>S. aureus</i>	Käse	N.b.	Türkei	illegal
Fa61	<i>S. aureus</i>	Rohes Fleisch	Geflügel	Moldawien	illegal
Fa63	<i>S. aureus</i>	Rohes Fleisch	Geflügel	Kasachstan	illegal
Fa77	<i>S. aureus</i>	Salzlakenkäse	N.b.	Türkei	illegal
Fs24	STEC	Fett mit rohen Fleischstücken	Schaf	Syrien	illegal
Ha28	STEC	Rohes Fleisch	Rind	Argentinien	legal
Ha91	STEC	Rohes Fleisch	Rind	Argentinien	legal
Fm41	<i>L. monocytogenes</i>	Rohes Fleisch	Rind	Armenien	illegal
Fm42	<i>L. monocytogenes</i>	Käse	N.b.	Armenien	illegal
Fm69	<i>L. monocytogenes</i>	Rohes Fleisch	Rind	Kasachstan	illegal
Fsal6	<i>Salmonella enterica</i>	Fett mit rohen Fleischstücken	Schaf	Libanon	illegal
Fsal10	<i>Salmonella enterica</i>	Getrocknetes Fleisch	Rind	Sudan	illegal
Fsal38	<i>Salmonella enterica</i>	Rohwurst	Schwein	Moldawien	illegal

¹N.b. - nicht bestimmbar

5.3.1 Shigatoxin-produzierende *Escherichia coli* (STEC)

Im Rahmen dieser Studie wurden drei STEC-Isolate isoliert und die WGS-Daten dieser Isolate analysiert. Tabelle 4 zeigt einen Vergleich der Charakteristika dieser Isolate mit weiteren STEC von legal und illegal importierten Lebensmitteln. Zwei Isolate (Ha28, Ha91) wurden aus zwei legal aus Argentinien importierten Rindfleischproben (Publikation 1) und ein Isolat (Fs24) aus einer illegal aus Syrien eingeführten Schafs Fettprobe isoliert (Publikation 2). Alle drei STEC-Isolate ließen sich der phylogenetischen Gruppe B1 zuordnen, die vor allem bei Isolaten tierischer Herkunft nachgewiesen wird und vorrangig kommensale *E. coli* umfasst (Picard et al. 1999; Higgins et al. 2007; Carlos et al. 2010; Clermont et al. 2000). Keines der drei Isolate konnte den Hauptserogruppen (O157, O26, O103, O111, O121 und O145), die nach Angaben der EFSA in der EU für die meisten Krankheitsfälle in Verbindung mit STEC verantwortlich sind, zugeordnet werden (EFSA 2022a). Zudem wurden die drei Isolate negativ auf das *eae*-Gen, welches für das Adhäsionsprotein Intimin codiert, getestet

(Donnenberg et al. 1993). Dieses befähigt den Erreger zur dichten Anheftung und Läsionsbildung im Bereich des Darmepithels (Donnenberg et al. 1993; Hua et al. 2020). Dabei sind STEC-Stämme, die das *eae*-Gen beherbergen, mit einer erhöhten Virulenz assoziiert und können in Zusammenhang mit der Entwicklung eines Hämolytisch Urämischen Syndroms (HUS) stehen (Donnenberg et al. 1993; Hua et al. 2020). So konnte in zwei Studien das *eae*-Gen in 94,2% (49 von 52) und in 93,33% (56 von 60) klinischer STEC-Isolate von an HUS erkrankten Patienten nachgewiesen werden (Wang et al. 2023; Hua et al. 2020). In der vorliegenden Arbeit wurde kein *eae*-Gen bei den Isolaten nachgewiesen. Dahingegen konnte in einer anderen Studie, in der insgesamt 15 STEC-Isolate untersucht worden sind, die aus an zwei europäischen Flughäfen konfiszierten Lebensmitteln tierischer Herkunft isoliert wurden, in einem illegal importierten Käse aus der Türkei ein *eae*-positiver O26-STECC isoliert werden (Tabelle 4) (Nagy et al. 2015). Dabei handelte es sich um einen O26-Serotyp, der zu den Hauptserogruppen gehört, die in humane Krankheitsgeschehen in der EU involviert sind (Colello et al. 2019; EFSA 2022b; EFSA 2023).

Für die Evaluierung der Virulenz einzelner STEC-Stämme ist zudem die Subtypisierung der Shigatoxin-Gene (*stx1* und *stx2*), von denen einzelne *stx*-Gen-Subtypen mit schwereren Krankheitsverläufen in Zusammenhang stehen, relevant (RKI 2011; Bai et al. 2013; Rivas et al. 2016; Melton-Celsa 2014). Insbesondere ist die *stx2*-Subtypisierung bedeutsam, da in der Literatur der Nachweis von *stx2a* allein oder in Kombination mit *stx2c* häufig bei an HUS und HC (Hämorrhagische Colitis) erkrankten Patienten beschrieben ist (Lisboa et al. 2019; Scheutz et al. 2012). In der Studie von Nagy et al. (2015) konnte bei einem illegal aus der Türkei importierten Käse der simultane Nachweis von zwei *stx2*-Subtypen nachgewiesen werden (*stx2a* und *stx2d*), sowie in drei Proben der simultane Nachweis von *stx1a*, *stx2c* und *stx2d* detektiert werden (Tabelle 4). Bei den in dieser Arbeit untersuchten Isolaten (n = 3) konnten jeweils beide *stx*-Subtypen (*stx1* und *stx2*) detektiert werden, wobei bei Isolat Ha28 die Gene *stx1a/stx2c*, bei Ha91 *stx1a/stx2a* und bei Isolat Fs24 *stx1c/stx2b* nachzuweisen waren (Tabelle 4). Dies ist insofern interessant, da in der EU bei in Krankheitsgeschehen involvierten STEC-Isolaten im Jahr 2021 am häufigsten *stx2a* (38,8%), gefolgt von *stx1a* (27,7%), *stx2d* (9,0%) und *stx2c* (8,8%) isoliert wurden (EFSA 2022a). Dabei ergaben Sequenzanalysen gemäß der EFSA aus dem Jahr 2021, dass die Virulenzgenkombination *stx2/eae* (34,1%) am häufigsten bei Isolaten

nachgewiesen wurde, die mit schweren Krankheitsverläufen (HUS und blutigen Durchfallerkrankungen) assoziiert waren (EFSA 2022a).

Obschon diese Virulenzgenkombination in der vorliegenden Arbeit sowie bei Nagy et al. (2015) nicht detektiert wurde, sollte das potenziell pathogene Potential von STEC mit weniger häufig in Krankheitsfälle involvierten *stx*-Gen-Kombinationen beachtet werden. So wurden seitens der EFSA in einem Zeitraum von 2012 bis 2017 insgesamt 234 Krankheitsfälle im Zusammenhang mit *stx1c/stx2b/eae*-negativen STEC-Stämmen, wie Isolat Fs24, gemeldet, mit einer Hospitalisierungsrate von 9% und insgesamt zwei Fällen des Hämolytisch Urämisches Syndroms (HUS) (EFSA 2020). In der Literatur ist des Weiteren beschrieben, dass importierte Lebensmittel tierischer Herkunft als Eintragsquellen für bisher nicht beschriebene STEC-Genotypen dienen. So konnten in der Studie von Nagy et al. (2015) zwei STEC-Isolate mit nicht typisierbaren O-Antigenen, die als potentiell neue Antigen-Varianten eingestuft wurden, nachgewiesen werden sowie drei STEC-Isolate der bisher nicht beschriebenen Sequenztypen ST4505, ST4506 und ST4507 (Tabelle 4). Auch bei einem in der vorliegenden Arbeit untersuchten STEC-Isolat, bei dem sich das O-Antigen ebenfalls nicht typisieren ließ, wurde eine ungewöhnliche Antigensequenz B17 identifiziert werden, welche erstmalig bei *Sighella boydii* beschrieben wurde (Lacher et al. 2016). In Lebensmitteln wie Rindfleisch konnten vereinzelt STEC mit dieser Antigensequenz B17 nachgewiesen werden, es sind jedoch nach aktuellem Stand keine Daten über Nachweise von STEC mit dieser Antigensequenz im klinischen Kontext beschrieben (Lacher et al. 2016). Ein weiteres Isolat Ha28 konnte dem häufig in Argentinien auf Rindfleisch vorkommenden STEC-Serotyp O178 zugeordnet werden. Interessanterweise wurde dieser Serotyp auch von Schoder et al. (2015) in einem illegal importierten Käse aus der Türkei detektiert (Tabelle 4). Dieser Serotyp ist lediglich sporadisch in primär unkompliziert verlaufende humane Erkrankungsgeschehen involviert (Miko et al. 2014; Masana et al. 2011). Die Serotypisierung des dritten STEC-Isolates (Fs24) in dieser Arbeit erlaubte eine Zuordnung zu dem Serotyp O43:H2, welcher in der Literatur als stark Nutztier-assoziiert beschrieben ist. Dessen mögliche klinische Relevanz wird jedoch durch die Isolierung bei einem HC-Patienten in Europa verdeutlicht (Johura et al. 2016; Malahlela et al. 2022; Martikainen et al. 2012; Mag et al. 2010; Eklund et al. 2002). Des Weiteren beherbergten die untersuchten STEC-Isolate weitere Virulenz-assoziierte Faktoren (Tabelle 3, Publikation 1). Ein Isolat Ha28 (O178:H7) konnte

positiv auf das *astA*-Gen getestet werden. Der Nachweis eines *astA*-positiven STEC-Isolates erfolgte bereits von Nagy et al. (2015) in einem illegal aus der Türkei eingeführten Käse (Tabelle 4). Dieser Nachweis ist insofern interessant, da dieses Gen für das hitzestabile Enteroaggregative *E. coli* Enterotoxin EAST1 codiert, welches insbesondere bei atypischen Enteropathogenen *E. coli* (aEPEC) nachgewiesen wird (Maluta et al. 2017). Dieser Gen-Nachweis kann insofern relevant sein, da bereits EAST1-positive aEPEC mit Krankheitsgeschehen (Durchfallerkrankungen bei Kindern) in Japan sowie in den USA assoziiert wurden (Hedberg et al. 1997; Yatsuyanagi et al. 2003). In einer weiteren Studie konnte zudem EAST1 als häufigster Virulenzfaktor (24%) in insgesamt 65 untersuchten klinischen aEPEC-Isolaten identifiziert werden, dessen Nachweis zudem in einem signifikanten Zusammenhang mit der Ausprägung einer Durchfallsymptomatik bei Kindern stand (Dulguer et al. 2003).

Zudem ließ sich in zwei Isolaten (Fa91 und Fs24) das für ein Enterohämolysin codierende Gen *ehxA* nachweisen. Dieser Nachweis ist interessant, da die Detektion von *ehxA* in klinischen STEC-Isolaten, in Kombination mit einer *stx*- und *eae*-Gen-Detektion, als potenzieller Risikoindikator bei klinischen STEC-Isolaten für die Entwicklung von HUS diskutiert wird (Hua et al. 2021b). So konnte bereits in einer schwedischen Studie in 83,26% (199 von 239) der klinischen Isolate das *ehxA*-Gen nachgewiesen werden und es konnte zudem eine statistisch signifikante Korrelation zwischen dem simultanen Nachweis der Gene *ehxA*, *eae* und *stx2* bei von an HUS-erkrankten Personen festgestellt werden (Hua et al. 2021b).

5. Zusammenfassung der Ergebnisse und übergreifende Diskussion

Tabelle 4: Vergleichende Übersicht über molekulare Charakteristika von aus von legal und illegal eingeführten Lebensmitteln isolierten STEC-Isolaten

Isolat	Herkunft	Probenart	Tierart	Status	Serotyp	Phylo- genetische Gruppe	MLST	stx-Gen	eae- Gen	Virulenz- assoziierte Faktoren	Referenz
13/01061	Türkei	Käse	k. A. ¹	Illegal	O178:H7	B1	ST4505 ²	<i>stx1c, stx2b</i>	- ³	<i>hlyA, senB, lpfA, iha, espl, iss</i>	
13/01062	Türkei	Käse	k. A.	Illegal	O6:H10	A	ST43	<i>stx1c</i>	-	-	
13/01064	Türkei	Wurst	k. A.	Illegal	O39:H48	A	ST3519	<i>stx1a, stx2a</i>	-	<i>hlyA, lpfA, iha, saa, epeA, iss</i>	
13/01065	Türkei	Käse	k. A.	Illegal	O8:HNM	A	ST3249	<i>stx1a</i>	-	<i>hlyA, lpfA, iha, saa, epeA, iss</i>	
13/01066	Türkei	Käse	k. A.	Illegal	O2:H27	A	ST10	<i>stx1a</i>	-	<i>astA</i>	Nagy et. al. (2015)
13/01067	Türkei	Wurst	k. A.	Illegal	OR:H7	B1	ST4506 ²	<i>stx2c, stx2d</i>	-	<i>lpfA, iha</i>	
13/01068	Türkei	Käse	k. A.	Illegal	O8:HNM	A	ST23	<i>stx2a, stx2d</i>	-	<i>lpfA, iss</i>	
E001	Türkei	Käse	k. A.	Illegal	O117:H8	A	ST13	<i>stx1c</i>	-	<i>hlyA, lpfA, iha, espl, eaaA, iss, ireA</i>	
E002	Türkei	Käse	k. A.	Illegal	O26:H46	A	ST21	<i>stx1a</i>	+ ⁴	<i>hlyA, ilpfA, iha, efa1, espP, cif, nle, iss, katP, tccP</i>	
E004	Türkei	Käse	k. A.	Illegal	ONT ⁵ :H48	A	ST4507 ²	<i>stx1a, stx2c, stx2d</i>	-	<i>lpfA, saa, epeA, cba, celb, iss</i>	
E007	Ägypten	Käse	k. A.	Illegal	ONT:H48	A	ST3519	<i>stx1a, stx2c, stx2d</i>	-	<i>hlyA, lpfA, iha, saa, epeA, iss</i>	
2-3	Serbien	Huhn	k. A.	Illegal	O153:HNM	A	ST3101	<i>stx1c</i>	-	<i>hlyA, senB, lpfA, iha, prfB, espl, eaaA, ireA</i>	
62-4	Kosovo	Käse	k. A.	Illegal	O134:HNM	B1	ST297	<i>stx1a, stx2c, stx2d</i>	-	<i>hlyA, lpfA, iha, saa, espP, iss</i>	
80-8	Mazedonien	Käse	k. A.	Illegal	O117:H1	B1	ST101	<i>stx1a</i>	-	<i>cdtB, lpfA, iha, saa, espP, cnf1, iss</i>	
81-30	Mazedonien	Käse	k. A.	Illegal	OR:H16	A	ST336	<i>stx1c</i>	-	<i>cba, cma</i>	

5. Zusammenfassung der Ergebnisse und übergreifende Diskussion

k. B. ⁶	Türkei	Käse	k. A.	illegal	O2:H27	n. u. ⁷	n. u.	<i>stx1</i>	+		Schoder et. al. (2014)
k. B.	Türkei	Frischkäse	k. A.	illegal	O8:HNM	n. u.	n. u.	<i>stx1</i>	-	<i>hly</i>	
k. B.	Türkei	Käse	k. A.	illegal	O178:H7	n. u.	n. u.	<i>stx1, stx2</i>	-	<i>hly</i>	
k. B.	Türkei	Käse	k. A.	illegal	O8:HNM	n. u.	n. u.	<i>stx1, stx2</i>	+		
k. B.	Türkei	Käse	k. A.	illegal	O6:H10	n. u.	n. u.	<i>stx1, stx2</i>	-	<i>hly</i>	
k. B.	Türkei	Rohwurst	Rind	illegal	n.d. ⁸	n. u.	n. u.	<i>stx1, stx2</i>	-		
k. B.	Türkei	Wurst	k. A.	illegal	O39:H48	n. u.	n. u.	<i>stx1, stx2</i>	-	<i>hly</i>	
k. B.	Armenien	Wurst	k. A.	illegal	H7	n. u.	n. u.	<i>stx2</i>	-		
Ha28	Argentinien	rohes Fleisch	Rind	legal	O178:H7	B1	ST278	<i>stx1a, stx2c</i>	-	<i>astA, fimH, gad, iha, iss, lpfA, ompT, terC, celb, cia, fimH, ehxA, espP, gad, ompT, terC</i>	Rinn et. al. (2024) Publikation1
Ha91	Argentinien	rohes Fleisch	Rind	legal	B17:H19	B1	ST6661	<i>stx1a, stx2a</i>	-	<i>ehxA, iss, lpfA, colE6, ompT, traT, yehC</i>	Rinn et. al. (2025) Publikation 2
Fs24	Syrien	Fett mit Fleischstücken	Schaf	illegal	O43:H2	B1	ST937	<i>stx1c, stx2b</i>	-		

¹k. A. - Keine Angabe der Tierart. ²Neu beschriebene Sequenztypen. ³ – Kein *eae*-Gen nachgewiesen. ⁴+ - *eae*-Gen wurde nachgewiesen. ⁵ONT - Nicht typisierbar. ⁶k. B.- Keine Isolatbezeichnung innerhalb der Studie. ⁷n.u.- Wurde im Rahmen der Studie nicht untersucht. ⁸n.d. - Konnte innerhalb der Studie nicht bestimmt werden.

5.3.2 *Staphylococcus aureus* einschließlich MRSA

Insgesamt wurden in dieser Arbeit die Ganzgenomsequenzen von elf *S. aureus* Isolaten untersucht (Tabelle 3), die aus illegal eingeführten Lebensmitteln tierischer Herkunft isoliert wurden (Publikation 2). Unter den Isolaten wurde anhand der Anwesenheit des *mecA*-Gens ein Isolat (Fa12), gewonnen aus einer Probe aus der Türkei (Schafs fett), als MRSA klassifiziert. Mittels der erhobenen WGS-Daten des MRSA-Isolates sowie der weiteren zehn MSSA-Isolate konnte eine Einteilung zu zehn verschiedenen MLS-Typen, zehn unterschiedlichen *spa*-Typen sowie eine Zuteilung zu fünf klonalen Komplexen vorgenommen werden. In Tabelle 5 ist eine vergleichende Übersicht über molekulare Charakteristika der in dieser Arbeit gewonnenen *S. aureus*-Isolaten mit weiteren *S. aureus*-Isolaten, gewonnen aus legal und illegal eingeführten Lebensmitteln tierischer Herkunft, dargestellt.

Die Isolate wurden mittels der MLS-Typisierung den fünf klonalen Komplexen CC1 (n = 2), CC5 (n = 1), CC8 (n = 2), CC15 (n = 2), CC97 (n = 3) zugeordnet und ein Isolat (ST522) konnte keinem klonalen Komplex zugeteilt werden. In der Studie von Müller et al. (2016) konnte die Mehrheit der Isolate den klonalen Komplexen CC1 und CC5 zugeordnet werden. Diese Komplexe gelten als weltweit verbreitet, wobei sowohl Nutztier-assoziierte MRSA als auch MSSA diesen Komplexen zugeordnet werden sowie Stämme mit hoher klinischer Relevanz (Alba et al. 2015). Weltweit werden HA-MRSA sowie CA-MRSA als Erreger humaner Erkrankungen diesen Komplexen zugeordnet (Monecke et al. 2011; Deurenberg et al. 2007; Ceballos et al. 2022). Das MRSA-Isolat in dieser Arbeit ließ sich als CC1/ST1/t127 charakterisieren. In einer anderen Studie, in der aus legal und illegal importierten Fleischprodukten isolierte *S. aureus*-Isolate (n = 23, darunter 9 MRSA-Isolate und 14 MSSA-Isolate) untersucht wurden, konnten acht MSSA und zwei MRSA ebenfalls als CC1/ST1/t127 klassifiziert werden (Müller et al. 2016). Dieser Nachweis in Lebensmitteln ist nicht unerwartet, da dieser Genotyp häufig aus Nutztieren (Schweinen und Kühen) sowie Lebensmitteln tierischer Herkunft isoliert wird (Parisi et al. 2016; Franco et al. 2011; Luini et al. 2015). Interessanterweise konnte in zwei europäischen Studien bei aus Kühen sowie Schweinen isolierten CC1/ST1/t127-MRSA eine hohe genetische Ähnlichkeit zu Isolaten von Menschen nachgewiesen werden, wodurch das zoonotische Potential verdeutlicht wird (Franco et al. 2011; Luini et al. 2015). Der detektierte *spa*-Typ t127 gehört einer europaweiten Analyse nach zu den sechs am häufigsten nachgewiesenen *spa*-Typen bei invasiven MSSA-Infektionen (Grundmann et al. 2010). Ebenso wurde

in einer griechischen Studie, in der 39 klinische MRSA-Isolate untersucht wurden, am fünft häufigsten der Typ t127 nachgewiesen (Tsergouli et al. 2022). Des Weiteren konnte dem MRSA-Isolat aus der eigenen Untersuchung der SCC*mec* Typ IV zugeordnet werden, welcher vor allem bei CA-MRSA nachgewiesen wird, wohingegen andere SCC*mec*-Typen wie I, II und III vorrangig bei HA-MRSA identifiziert werden (Zhang et al. 2005; Asghar 2014). Betrachtet man die erhobenen Untersuchungsergebnisse erlauben diese den Rückschluss, dass es sich bei dem isolierten MRSA-Isolat vermutlich um einen CA-MRSA oder LA-MRSA handelt (Ceballos et al. 2022).

Interessanterweise gehörte keines der in dieser Arbeit untersuchten Isolate dem in Europa vorherrschenden Nutztier-assoziierten MRSA klonalen Komplex CC398 an, welcher auch häufig auf Fleischprodukten nachgewiesen wird (Li et al. 2019; Khairullah et al. 2022). Im Vergleich dazu wurde in einer anderen Studie von Rodríguez-Lázaro et al. (2017) in einer illegal aus Serbien eingeführten Fleischprobe ein MRSA-CC398 isoliert. Ursprünglich wurden CC398-MRSA ausschließlich als Kolonisatoren bei Nutztieren beschrieben und konnten lediglich sporadisch bei Infektionen bei Menschen registriert werden, die im engen Kontakt mit Nutztieren standen (Smyth et al. 2009; Tegegne et al. 2017). Ein Nachweis von MRSA-CC398 in einer Fleischprobe wie in der Studie um Rodríguez-Lázaro et al. (2017) ist dabei relevant, da dies weiterhin auf eine Übertragung von Nutztieren auf ein Lebensmittel schließen lässt. Aktuellen Daten zu Folge werden CC398-Isolate zunehmend als Ursache für humane Infektionen identifiziert, selbst bei Patienten ohne jeglichen Kontakt zu Tieren (Bouiller et al. 2020; Smith und Wardyn 2015; Laumay et al. 2021). Auch der Nachweis von CC97-Stämmen bei drei der hier untersuchten Isolate ist von Relevanz. Dieser klonale Komplex wird in Europa häufig bei an Mastitis erkrankten Rindern nachgewiesen (Hoekstra et al. 2020; Zadoks et al. 2011). Interessanterweise konnte bereits von den Autoren um Rodríguez-Lázaro et al. (2017) ein CC97-MRSA-Isolat, isoliert aus illegal eingeführtem Käse, detektiert werden (Tabelle 5). Die drei in der vorliegenden Arbeit detektierten CC97-Isolate wurden ebenfalls aus Milchprodukten isoliert, sodass eine Übertragung ausgehend vom Tier auf das Lebensmittel vermutet wird. Dies ist von Bedeutung, da weltweit mit MRSA-CC97 assoziierte humane Infektionen verzeichnet werden (Diep et al. 2003; Ruimy et al. 2009; Ellington et al. 2008; Spoor et al. 2013).

In Europa sind neben ST398, der mit dem CC398 assoziiert ist, bei MRSA die Sequenztypen ST5, ST8 und ST9 am häufigsten auf Fleisch- und Fleischprodukten nachzuweisen (Fessler et al. 2011; González-Machado et al. 2024). Der Sequenztyp ST8 konnte bereits in einer vergangenen Studie in 15,4% (4 von 26) untersuchten MRSA-Isolaten (Rodríguez-Lázaro et al. 2017), isoliert aus illegal eingeführten Lebensmitteln, sowie bei einem MSSA-Isolat in der vorliegenden Arbeit detektiert werden (Rodríguez-Lázaro et al. 2017). Weltweit werden ST8 insbesondere bei CA-MRSA/MSSA detektiert, sodass bei den illegal eingeführten Lebensmitteln von Isolaten humaner Herkunft auszugehen ist (David und Daum 2010; Sato et al. 2017). Der Sequenztyp ST5 konnte in der vorliegenden Arbeit nicht detektiert werden, wohingegen in der Studie um Rodríguez-Lázaro et al. (2017) ein Drittel der untersuchten MRSA-Isolate diesem Sequenztyp zuzuordnen waren (siehe Tabelle 5). Interessanterweise wurden diese Isolate vorrangig aus illegal eingeführten Milchprodukten isoliert, wohingegen MRSA-ST5 in Europa vorrangig in Geflügelfleisch nachgewiesen werden (Lowder et al. 2009). Zwei Isolate der vorliegenden Arbeit konnten dem gleichen Sequenztyp (ST15) zugeordnet werden, welcher in der Literatur zu den häufigsten beschriebenen lebensmittelassoziierten Sequenztypen in China gehört und dort insbesondere in Fleischprodukten nachgewiesen wird (Tabelle 5) (Lv et al. 2021). Dieser Nachweis ist interessant, da dies aufzeigt, dass illegal eingeführte Lebensmittel als Vehikel für bisher in Europa selten detektierte Sequenztypen in Lebensmitteln dienen können.

Des Weiteren wurde ein Isolat von den Kuratoren der PubMLST-Datenbank für *Staphylococcus aureus* als ein neuer Sequenztyp (ST8323) klassifiziert. Bei diesem wurde ein neues Allel des Haushalts-Gens *ygiL* nachgewiesen. Der Nachweis neuer Sequenztypen in illegal eingeführten Lebensmitteln ist bereits in einer vergangenen Studie beschrieben worden, in der insgesamt 23 *S. aureus*-Isolate untersucht wurden, die aus sechs legal und 17 illegal, vorrangig aus Nordafrika (14 Proben) sowie Südamerika (5 Proben), importierten Fleisch- und Fleischprodukten isoliert wurden (siehe Tabelle 5) (Müller et al. 2016). Unter diesen konnten bei zwei Isolaten, gewonnen aus legal importierten Geflügelfleischproben aus Chile und Brasilien zwei neue Sequenztypen (ST3216 und ST3218) definiert werden. Zusätzlich wurde ein Isolat, gewonnen aus einer illegal importierten Geflügelfleischprobe aus Ägypten, einem neuen Sequenztyp ST3217 zugeordnet (Müller et al. 2016). Diese Ergebnisse, gemeinsam mit denen in der vorliegenden Arbeit erhobenen

Untersuchungsergebnissen, weisen auf bisher wenig bekannte *S. aureus*-Typen hin und zeigen auf, dass importierte Lebensmittel tierischen Ursprungs als Vektoren für bisher nicht beschriebene Genotypen fungieren.

Bei allen untersuchten *S. aureus*-Isolaten wurden hitzestabile Staphylokokken-Enterotoxin (SE)-codierende Gene nachgewiesen, die in Tabelle 5 dargestellt sind. Daraus lässt sich schlussfolgern, sodass es sich bei den Isolaten vermutlich um Enterotoxin-Bildner handelt. Bei allen Isolaten wurde das *sea*-Gen nachgewiesen, welches am häufigsten im Kontext mit *S. aureus*-bedingten Lebensmittelintoxikationen nachgewiesen wird (Argudín et al. 2010; Kadariya et al. 2014). Im Vergleich dazu wurde von Müller et. al. (2016) vorherrschend das *seh*-Gen nachgewiesen, wohingegen in der Studie von Rodríguez-Lázaro et al. (2017) ein sehr heterogenes *se*-Genprofil detektiert wurde, wobei fast ein Drittel (27,15%) der *se*-Gen-positiven Isolate (16 von 26) ebenfalls das *sea*-Gen beherbergten (Tabelle 5). Interessanterweise konnten in beiden Studien in rund einem Drittel der Isolate, 26,9% bei Müller et al. (2016) und 34,8% bei Rodríguez-Lázaro et al. (2017), keine *se*-Gene nachgewiesen werden. Dabei muss jedoch berücksichtigt werden, dass die untersuchte Isolatanzahl beider Studien deutlicher höher lag.

Der Nachweis von *se*-Genen in *S. aureus*-Isolaten ist kritisch, da eine Intoxikation mit SE beim Menschen zu einer starken Magen-Darm-Symptomatik führen kann, die durch Bauchkrämpfe, Erbrechen sowie Durchfall gekennzeichnet ist (Kadariya et al. 2014; Argudín et al. 2010). Die gesundheitliche Relevanz wird durch Auswertungen der EFSA aus dem Jahr 2021 deutlich, bei welcher 19,6% der gesamten lebensmittelassoziierten Krankheitsausbrüche auf bakterielle Intoxikationen zurückgeführt werden konnten. Dabei sind *S. aureus*-Toxine als die vierthäufigste Ursache in dieser Kategorie gelistet (EFSA 2022a). Zudem sind die Toxine in drei EU-Mitgliedsstaaten (Portugal, Rumänien und Nordmazedonien) in dem Jahr 2021 als die häufigste Ursache für lebensmittelassoziierte Krankheitsausbrüche vermerkt (EFSA 2022a). Außerdem ist der Nachweis des Toxischen Schock Syndrom (TSS) Toxin 1-Gens (engl.: toxic shock syndrome toxin-1 gene; *tsst1*,) in einem Isolat, isoliert aus einem Salzlakenkäse aus der Türkei, von Relevanz. Das Genprodukt des *tsst1*-Gens besitzt, wie SE-Gene, eine Aktivität als Superantigen. Somit können beim Menschen schwere systemische Erkrankungen ausgelöst werden, die initial durch unspezifische Symptome wie hohes Fieber, Erbrechen und Durchfall gekennzeichnet sind (Xu und McCormick 2012; Lang et al. 2003). Das TSS kann in akuten Fällen innerhalb weniger

Stunden zu einem hypovolämischen Schock, Atemnot sowie Multiorganversagen führen (Lang et al. 2003).

Des Weiteren konnte bei jedem der untersuchten Isolate mindestens ein Gen des IEC-Clusters nachgewiesen werden (Tabelle 5). Dabei ließ sich bei allen Isolaten das *scn*-Gen detektieren, welches in der Literatur als Marker-Gen für den Nachweis von Genen des IEC-Clusters beschrieben ist (van Wamel et al. 2006). Ähnliche Ergebnisse konnten auch in der Studie von Müller et al. (2016) erzielt werden. Die Autoren dieser Studie dokumentierten bei insgesamt 16 der 23 untersuchten MRSA-Isolate, isoliert aus illegal und legal eingeführten Lebensmitteln tierischer Herkunft, den Nachweis von mindestens einem Gen des IEC-Clusters (Tabelle 5). In der Literatur sind IEC-Gene vorrangig bei human-adaptierten Isolaten nachzuweisen. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass es sich bei den hier untersuchten Isolaten, um klonale Linien handelt, die häufig beim Menschen vorkommen (Hau et al. 2015; Verkaik et al. 2011; Nepal et al. 2021). Dies lässt auf Kontaminationen durch Personen während der Zubereitung und Verpackung der Lebensmittel aufgrund mangelnder hygienischer Bedingungen schließen, die bei illegal eingeführtem Lebensmittel bereits beschrieben sind (Falk et al. 2013; Müller et al. 2016; Nagy et al. 2015). Dies könnte damit zusammenhängen, dass unter den elf untersuchten *S. aureus*-Isolaten in der vorliegenden Arbeit neun individuell verpackt waren, was auf eine Zubereitung im Privathaushalt hindeutet. Dass insbesondere illegal eingeführte Lebensmittel, die im Privathaushalt hergestellt wurden, mikrobielle Kontaminationen aufweisen, dokumentierten bereits verschiedene Autoren (Beutlich et al. 2015; Ciolacu et al. 2016).

Der Verwandtschaftsgrad der Isolate wurde mittels einer PFGE und anschließender Clusteranalyse überprüft. Dabei gelten Stämme als Klone, wenn die Anzahl und Position der Banden zu 100% identisch sind (Tenover et al. 1995). Als eng verwandt gelten solche Stämme, die sich in ihren Mustern um nicht mehr als drei Banden unterscheiden, wohingegen Stämme mit vier oder mehr unterschiedlichen Banden als nicht miteinander verwandt eingestuft wurden (Chadi und Arcangioli 2023; Tenover et al. 1995). Der Ähnlichkeitskoeffizient wird gemäß der Empfehlung von Struelens et al. (1992) auf 80% festgelegt. Insgesamt wiesen die Isolate eine große genetische Heterogenität auf, obwohl 64% der Isolate aus Lebensmitteln tierischen Ursprungs aus der Türkei importiert worden sind. Dabei ließ sich eine hohe Ähnlichkeit (>95%) der Bandenmuster der zwei CC97/t521-Klone erkennen, was trotz unterschiedlicher

Herkunft (Türkei und Moldawien) einen engen Verwandtschaftsgrad aufzeigt (Tenover et al. 1995). Des Weiteren ähneln sich die Bandenmuster der zwei CC1-Klone, die aus zwei konfiszierten Käseproben aus der Türkei gewonnen wurden, mit einer Übereinstimmung von 80%. Interessanterweise konnte bei den CC15/ST15-Isolaten lediglich eine Übereinstimmung der Bandenmuster von 75% festgestellt werden (Abb. 1, Publikation 2). In der Literatur ist die PFGE als zuverlässige Methode beschrieben, um insbesondere eng verwandte Stämme zu identifizieren und zu analysieren (Chadi und Arcangioli 2023). In den letzten Jahren hat jedoch bei der Untersuchung epidemiologischer Ausbrüche die Bedeutung von Typisierungsmethoden auf der Grundlage von Gesamtgenomsequenzierungen, wie Core Genome MLST (cgMLST) und Single Nucleotide Polymorphism (SNP), zugenommen (EFSA 2024; Vingadassalon et al. 2025). Ein wichtiger Unterschied dieser beiden WGS-basierten Methoden besteht darin, dass im Gegensatz zur cgMLST-Analyse, die auf die in einem Schema enthaltenen Allele und damit auf die Kernregionen der analysierten Genome beschränkt ist, die SNP-Analyse das gesamte Genom und nicht nur die im cgMLST-Schema definierten Loci mit einbezieht (Vingadassalon et al. 2025; Cunningham et al. 2017). Um die Präzision der Methoden zu untersuchen, wurden in einer umfassenden Studie die Verwandtschaftsgerade von 351 *S. aureus*-Isolaten vergleichend mittels PFGE, cgMLST und SNP untersucht (Vingadassalon et al. 2025). Insgesamt konnte gezeigt werden, dass mittels cgMLST und SNP hinsichtlich der Auflösung von Clustern und der Detektion phylogenetischer Inferenzen, die insbesondere bei nicht eng verwandten Stämmen von Bedeutung sind, im Vergleich bessere Ergebnisse erzielt werden konnten als bei der PFGE (Vingadassalon et al. 2025). Die Autoren schlussfolgern daraus, dass WGS-basierte Typisierungsmethoden als Methode der Wahl für die Analyse von Populationsstrukturen von *S. aureus* verwendet werden sollen (Vingadassalon et al. 2025). Diese neuen Methoden wurden in der vorliegenden Arbeit aber nicht angewendet, da keine Populationsstrukturen untersucht wurden. Aber es wurden phänotypische Resistenzmuster sowie verschiedene Resistenzgene nachgewiesen, auf die in Kapitel 4.4.2 eingegangen wird.

5. Zusammenfassung der Ergebnisse und übergreifende Diskussion

Tabelle 5. Vergleichende Übersicht über molekulare Charakteristika von *S. aureus*-Isolaten, gewonnen aus legal und illegal eingeführten Lebensmitteln tierischer Herkunft

Spezies	Isolat	Matrix / Tierart	Einfuhr	Herkunft	MRSA	CC/ST ¹	spa-type	IEC-Gen	Enterotoxin-Gen	Referenz
<i>S. aureus</i>	641	Küken	illegal	Ägypten	nein	CC01	t127	- ²	<i>seh</i>	Müller et al. (2016)
<i>S. aureus</i>	642	Küken	illegal	Ägypten	nein	CC01	t127	-	<i>seh</i>	
<i>S. aureus</i>	643	Küken	illegal	Ägypten	nein	CC01	t127	-	<i>seh</i>	
<i>S. aureus</i>	647	Küken	illegal	Ägypten	nein	CC01	t127	-	<i>seh</i>	
<i>S. aureus</i>	635	Fleisch / Huhn	legal	Brasilien	nein	CC01	t127	-	<i>seh</i>	
<i>S. aureus</i>	534	Rohwurst / k.A. ³	illegal	Russland	nein	CC01/ST1	t127	<i>sak, scn</i>	<i>seh</i>	
<i>S. aureus</i>	535	Rohwurst / k.A.	illegal	Weißrussland	nein	CC01	t127	<i>sak, scn</i>	<i>seh</i>	
<i>S. aureus</i>	585	Fleisch / Huhn	illegal	Thailand	nein	CC01	t127	<i>sak, scn</i>	<i>seh</i>	
<i>S. aureus</i>	284	Fleisch / Huhn	legal	Brasilien	nein	CC15/ST3216 ⁴	t084	<i>chp, scn</i>	-	
<i>S. aureus</i>	316	Fleisch / Huhn	legal	Argentinien	nein	CC15	t084	<i>chp, scn</i>	-	
<i>S. aureus</i>	651	Fleisch / Huhn	illegal	Ägypten	ja	CC01	t127	<i>sak, scn</i>	<i>sea, seh, sek, seq</i>	
<i>S. aureus</i>	667	Fleisch / Ente	illegal	Ägypten	ja	CC01	t127	<i>sak, scn</i>	<i>sea, seh, sek, seq</i>	
<i>S. aureus</i>	478	Fleisch / Huhn	illegal	Ägypten	ja	CC97/ST97	t267	<i>sak, scn</i>	-	
<i>S. aureus</i>	430	Blutwurst / k. A.	illegal	Vietnam	nein	CC05/ST5	t105	<i>sak, chp, scn</i>	<i>sep, egc</i>	
<i>S. aureus</i>	632	Fleisch / Huhn	legal	Chile	nein	CC05/ST3218 ⁴	t002	-	<i>egc</i>	
<i>S. aureus</i>	693	Fleisch /Schwein	legal	Chile	nein	CC05	t002	-	<i>egc</i>	
<i>S. aureus</i>	649	Fleisch / Huhn	illegal	Ägypten	ja	CC80	t376	<i>sak,scn</i>	-	
<i>S. aureus</i>	652	Fleisch / Huhn	illegal	Ägypten	ja	CC80	t376	<i>sak,scn</i>	-	
<i>S. aureus</i>	655	Fleisch / Ente	illegal	Ägypten	ja	CC80	t376	<i>sak,scn</i>	-	
<i>S. aureus</i>	341	Fleisch / Ente	illegal	Ägypten	nein	S ⁵ /ST3217 ⁴	t376	<i>sak,scn</i>	-	
<i>S. aureus</i>	333	Fleisch / Huhn	illegal	Ägypten	ja	CC05/ST5	t131	<i>sak,scn</i>	<i>sed, sei, sep, ser, egc</i>	
<i>S. aureus</i>	334	Fleisch / Huhn	illegal	Ägypten	ja	CC88/ST88	t786	<i>sak, chp, scn</i>	-	
<i>S. aureus</i>	181	Küken	illegal	Ägypten	ja	CC30/ST30	t318	<i>sak, scn</i>	<i>egc</i>	

5. Zusammenfassung der Ergebnisse und übergreifende Diskussion

<i>S. aureus</i>	01-02 a	Käse / Ziege	illegal	Rumänien	ja	ST1	/ ⁶	/ ⁶	/ ⁶	Rodríguez-Lázaro et al. (2017)
<i>S. aureus</i>	01-05 a	Käse / Schaf	illegal	Rumänien	ja	ST1	/	/	/	
<i>S. aureus</i>	476x	Käse / k. A.	illegal	Ägypten	ja	ST1	/	/	/	
<i>S. aureus</i>	45-1.1	Käse / k. A.	illegal	Ägypten	ja	ST97	/	/	/	
<i>S. aureus</i>	24.1x	Fleisch / Schaf	illegal	Nigeria	ja	ST8	/	/	/	
<i>S. aureus</i>	117.1x	Käse / k. A.	illegal	Ecuador	ja	ST8	/	/	/	
<i>S. aureus</i>	122-2.1	Käse / k. A.	illegal	Peru	ja	ST8	/	/	/	
<i>S. aureus</i>	153-1.1	Käse / k. A.	illegal	Bolivien	ja	ST8	/	/	/	
<i>S. aureus</i>	137-2.1	Fleisch / k. A.	illegal	Serbien	ja	ST398	/	/	/	
<i>S. aureus</i>	68.1	Käse / k. A.	illegal	Nicaragua	ja	ST72	/	/	/	
<i>S. aureus</i>	50x	Fleisch / k. A.	illegal	Ägypten	ja	ST22	/	/	/	
<i>S. aureus</i>	165x	Käse / k. A.	illegal	Türkei	ja	ST22	/	/	/	
<i>S. aureus</i>	46-2.3	Käse / k. A.	illegal	Hondura	ja	ST7	/	/	/	
<i>S. aureus</i>	50-2.1	Fleisch / k. A.	illegal	China	ja	ST7	/	/	/	
<i>S. aureus</i>	45-3.1	Fleisch / Rind	illegal	Ägypten	ja	ST5	/	/	/	
<i>S. aureus</i>	80-2.1	Käse / k. A.	illegal	Nicaragua	ja	ST5	/	/	/	
<i>S. aureus</i>	124.1	Käse / k. A.	illegal	Nicaragua	ja	ST5	/	/	/	
<i>S. aureus</i>	132.2	Käse / k. A.	illegal	Kolumbien	ja	ST5	/	/	/	
<i>S. aureus</i>	133.1	Käse / k. A.	illegal	Nicaragua	ja	ST5	/	/	/	
<i>S. aureus</i>	138.1	Käse / k. A.	illegal	Nicaragua	ja	ST5	/	/	/	
<i>S. aureus</i>	41x	Käse / k. A.	illegal	Ägypten	ja	ST5	/	/	/	
<i>S. aureus</i>	140x	Käse / k. A.	illegal	Türkei	ja	ST5	/	/	/	
<i>S. aureus</i>	74.1	Käse / k. A.	illegal	Bolivien	ja	ST1649	/	/	/	
<i>S. aureus</i>	115.1x	Käse / k. A.	illegal	Bolivien	ja	ST1649	/	/	/	
<i>S. aureus</i>	135.1x	Käse / k. A.	illegal	Peru	ja	ST1649	/	/	/	
<i>S. aureus</i>	151-1.1	Quark / k. A.	illegal	Bolivien	ja	ST1649	/	/	/	
<i>S. aureus</i>	Fa24	Fett mit rohem Fleisch / Schaf	illegal	Syrien	nein	CC8/ST8	t8	sak, scn	sea, sed, seg	Rinn et. al. (2025) Publikation 2
<i>S. aureus</i>	Fa61	Fleisch / Geflügel	illegal	Moldawien	nein	CC8/ST789	t91	sak, scn	sea, see	
<i>S. aureus</i>	Fa12	Fett / Schaf	illegal	Türkei	ja	CC1/ST1	t127	sak, scn	sea, seh	

5. Zusammenfassung der Ergebnisse und übergreifende Diskussion

<i>S. aureus</i>	Fa29	Salzlakenkäse / k. A.	illegal	Türkei	nein	CC1/ST188	t189	<i>sak, chp, scn</i>	<i>sea</i>
<i>S. aureus</i>	Fa8	Salzlakenkäse / k. A.	illegal	Türkei	nein	CC97/ST2826	t521	<i>scn</i>	<i>sea, sed</i>
<i>S. aureus</i>	Fa32	Käse / k. A.	illegal	Türkei	nein	CC97/ST97	t521	<i>scn</i>	<i>sea, sed</i>
<i>S. aureus</i>	Fa52	Käse / k. A.	illegal	Türkei	nein	CCC97/ST8323 ³	t267	<i>scn</i>	<i>sea, sed</i>
<i>S. aureus</i>	Fa30	Rohwurst / Rind Fleisch, getrocknet /	illegal	Türkei	nein	CC5/ST6	t3878	<i>sak, scn</i>	<i>sea</i>
<i>S. aureus</i>	Fa14	Rind	illegal	Türkei	nein	CC15/ST15	t346	<i>scn, chp</i>	<i>sea</i>
<i>S. aureus</i>	Fa63	Fleisch / Geflügel	illegal	Kasachstan	nein	CC15/ST15	t84	<i>scn, chp</i>	<i>sea</i>
<i>S. aureus</i>	Fa77	Salzlakenkäse / k. A.	illegal	Türkei	nein	Si ⁵ /ST522	t1534	<i>scn</i>	<i>sea, sec</i>

¹In der Studie von Müller et. al. (2016) erfolgte nicht für jedes Isolat eine Angabe des MLST. In der Studie von Rodríguez-Lázaro et al. (2017) erfolgte keine Zuteilung zu klonalen Komplexen. ²- Es konnte kein Gen des IEC-Clusters nachgewiesen werden. ³k. A. - Keine Angabe der Tierart für das spezifische Produkt. ⁴Neu beschriebene Sequenztypen. ⁵Si - Keine Zuordnung zu einem klonalen Komplex möglich (Singleton). ⁶/ - In der Studie von Rodríguez-Lázaro et al. (2017) wurde zwar das Vorkommen von Genen des IEC-Clusters sowie das von Enterotoxin-Genen untersucht, jedoch erfolgte keine spezifische Angabe über das Vorkommen in den einzelnen Isolaten.

5.3.3 *Listeria monocytogenes*

Insgesamt wurden die WGS-Daten von drei *L. monocytogenes*-Isolaten analysiert, die aus illegal importierten Lebensmitteln tierischen Ursprungs isoliert wurden (Publikation 2). In der Literatur ist beschrieben, dass in illegal importierten Lebensmitteln nahezu die Hälfte der isolierten *L. monocytogenes*-Isolate der Linie II angehören, zu welcher auch die drei im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Isolate angehören (Jansen et al. 2019; Rychli et al. 2018; Schoder et al. 2015). Dies ist nicht verwunderlich, da *Listeria monocytogenes* der Linie II vorrangig auf Lebensmitteln sowie in Lebensmittelverarbeitenden Betrieben detektiert werden (Gray et al. 2004; Nightingale et al. 2008; Nightingale et al. 2005; Orsi et al. 2011). Klinische Isolate werden hingegen vorrangig der Linie I zugeordnet, aber auch Linie II-*L. monocytogenes* wurden im klinischen Kontext beschrieben. Somit ist diesen Stämmen ebenfalls eine humanpathogene Bedeutung zuzuschreiben (Knabel et al. 2012; Gözel et al. 2019; Lopez-Valladares et al. 2017).

In Tabelle 6 sind molekulare Charakteristika der in dieser Arbeit untersuchten *L. monocytogenes*-Isolaten im Vergleich zu in anderen Studien untersuchten *L. monocytogenes*-Isolaten, gewonnen aus illegal eingeführten Lebensmitteln, aufgelistet. In dieser Arbeit konnte keines der drei genomsequenzierten Isolate den hypervirulenten klonalen Komplexen CC1, CC2, CC4 und CC6 zugeordnet werden, die am häufigsten in der EU in humane Listeriosefälle involviert sind (Maury et al. 2016; EFSA 2022b). Im Gegensatz dazu konnte in einer zuvor veröffentlichten Studie, in welcher die Genotypen von 57 *L. monocytogenes*-Isolaten analysiert wurden, die aus illegal importierten Lebensmitteln tierischen Ursprungs isoliert wurden, neun *L. monocytogenes*-Isolate dem hypervirulenten CC2 zugeordnet werden (Tabelle 6) (Rychli et al. 2018). Auch dokumentierten die Autoren Schoder et al. (2015) den Nachweis eines CC2-*L. monocytogenes*-Isolates, gewonnen aus einer illegal aus Albanien eingeführten Fleischprobe (Tabelle 6). Diese abweichenden Ergebnisse könnten damit zusammenhängen, dass die Isolate der anderen Autoren aus Lebensmitteln isoliert wurden, deren Herkunftsländer sich nicht mit den Herkunftsländern der Isolate in der vorliegenden Arbeit überschneiden. Dabei wurden in der Studie um Rychli et al. (2018) drei der CC2/ST2-Isolate aus Lebensmitteln (aus zwei Milchprodukten und einem Fleischprodukt), gewonnen, die aus Ecuador eingeführt wurden. Eine hohe Prävalenz von CC2/ST2 in Ecuador wurde bereits in der Studie um Mejía et al. (2023) nachgewiesen, in welcher 65 *L. monocytogenes*-Isolate (20 klinische Isolate isoliert

von Listeriose-Patienten, sowie 45 Isolate gewonnen aus Käse) untersucht wurden (Mejía et al. 2023). Insgesamt wurden in der Studie um Mejía et. al. (2023) 93,33% der aus Käseproben igewonnenen Isolate und 65% der klinischen Isolate dem Genotyp CC2/ST2 zugeordnet (Mejía et al. 2023). Zudem wurde eines der CC2/ST2-Isolate aus einem illegal eingeführten Fischprodukt isoliert (Rychli et. al. 2018). Fisch- und Fischprodukte sind nach Angaben der EFSA mit einer Prävalenz von 7,1% (2021) die am häufigsten mit *L. monocytogenes* kontaminierte Lebensmittelmatrix (EFSA 2022). Diese wurden in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht untersucht. Dadurch lassen sich ebenfalls die unterschiedlichen Ergebnisse erklären.

Des Weiteren dokumentierten die Autoren um Rychli et. al. (2018), dass drei ihrer Isolate dem klonalen Komplex CC1 angehörten, isoliert aus einer Fleischprobe und aus einem Milchprodukt aus der Türkei sowie einer Fleischprobe aus Nepal (Tabelle 6). Dieser klonale Komplex ließ sich ebenfalls in der Studie um Schoder et. al. (2015) in 13,3% (2 von 15) der isolierten *L. monocytogenes*-Isolate detektieren (Tabelle 6). Er zeigt weltweit eine weite Verbreitung und wurde in Fleisch aus Südafrika und in Isolaten aus Lebensmitteln in Chile isoliert und mit lebensmittelbedingten Listeriose-Ausbrüchen in China, USA und Österreich in Verbindung gebracht. Somit konnte ein Nachweis bei illegal eingeführten Lebensmitteln erwartet werden (Yin et al. 2015; Mafuna et al. 2021; Toledo et al. 2018). In dieser Arbeit wurde keines der untersuchten Isolate dem CC1 zugeordnet. Allerdings wurden lediglich drei Isolate bei den 100 illegal eingeführten Lebensmitteln nachgewiesen, während die Autoren um Rychli et. al. (2018) und Schoder et. al. (2015) Untersuchungen an einem deutlich größeren Probenumfang durchführten (1474 Proben und 600 Proben).

Obschon keines der in der vorliegenden Studie untersuchten Isolate einem hypervirulenten Komplex zuzuordnen war, ist die Detektion eines dem ST8 zugehörigen Isolats durchaus relevant. So waren *L. monocytogenes* ST8-Isolate für einen mehrere EU-Mitgliedstaaten betreffenden Listerioseausbruch zwischen 2015 und 2018 verantwortlich, was die potentiell gesundheitliche Gefahr dieses Sequenztypen verdeutlicht (EFSA 2019b). Als Infektionsquelle konnten bei diesem Listerioseausbruch kontaminierte Lachsprodukte identifiziert werden, die innerhalb mehrere EU-Mitgliedsstaaten vermarktet wurden (EFSA 2019b). Der MLS-Typ 8 konnte auch von Rychli et. al (2018) bei Isolaten aus einer illegal aus China importierten Fleischprobe sowie bei zwei aus Moldawien importierten Produkten (Fleisch und Fisch) nachgewiesen werden (Tabelle 6). Somit können illegal importierte

Lebensmittel als Vektoren für bisher in der Literatur als wenig pathogen beschriebene Stämme dienen, welche dennoch ein potenzielles Gesundheitsrisiko bergen.

Interessanterweise ließen sich in den drei Studien der Autoren Rodríguez-Lázaro et al. (2015), Rychli et al. (2018) sowie Schoder et al. (2015), in denen illegal eingeführte Lebensmittel untersucht wurden, *L. monocytogenes* ST87 mit einer Prävalenz von 10% (2 von 20), 7% (4 von 57) sowie 13,3% (2 von 15) nachweisen (siehe Tabelle 6), während in dieser Studie kein Isolat diesem MLS-Typ angehörte. Der Nachweis von ST87-*L. monocytogenes* in illegal eingeführten Lebensmitteln ist insofern interessant, da in den Jahren 2013 bis 2014 *L. monocytogenes* ST87 mit einem lebensmittelassoziierten Listerioseausbruch in Spanien assoziiert wurden. Dieser Ausbruch war auf den Verzehr von Gänseleber zurückzuführen (Pérez-Trallero et al. 2014). Dass in dieser Studie keine ST87 detektiert wurden könnte damit zusammenhängen, dass *Listeria monocytogenes* ST87-Isolate prädominierend in Lebensmitteln in China nachgewiesen werden und die Hälfte der ST87-*L. monocytogenes* der oben genannten Studien aus Lebensmitteln gewonnen wurden, die illegal aus China eingeführt wurden. In dieser Studie wurde hingegen kein aus China eingeführtes Lebensmittel untersucht (Wang et al. 2012).

Das zweite Isolat der eigenen Studie wurde als ST425 (CC90) klassifiziert. Über die Verbreitung dieses Sequenztyps ist in der Literatur bisher wenig beschrieben. So ließen sich *L. monocytogenes* ST425 aus Abwasser in Russland sowie aus einer Lebensmittelprobe in Italien isolieren (Caruso et al. 2020; Astashkin et al. 2021). In der MLST-Datenbank des Pasteur-Instituts (Paris, Frankreich), in welcher sequenzierte Isolate mit Angabe der Ursprungsmatrix und des Herkunftslandes gelistet werden, wurden bisher lediglich sieben *L. monocytogenes* ST425-Isolate aus Russland gelistet und es liegen aktuell keine Daten aus Studien über den Nachweis von ST425 in illegal importierten Lebensmitteln vor. Dennoch kann der Nachweis von *L. monocytogenes*-ST425 bedeutsam sein, da in einer Studie der Nachweis von ST425 bei an Listeriose erkrankten Menschen in Russland festgestellt wurde (Voronina et al. 2023)

Das dritte Isolat dieser Arbeit, isoliert von einer illegal aus Kasachstan eingeführten Fleischprobe, wurde dem in Europa weit verbreiteten CC121/ST121 zugeordnet (Rychli et al. 2018; Moura et al. 2016). In der Studie von Rychli et al. 2018 wurden insgesamt neun und in der Studie von Schoder et al. (2015) zwei (13,3%) CC121/ST121-*L. monocytogenes* aus illegal importierten Lebensmitteln isoliert (siehe Tabelle 6). In der Literatur sind CC21/ST121-Klone als wenig virulent beschrieben und

werden vor allem auf Fleischprodukten nachgewiesen, sodass ein Nachweis in Fleischprodukten wie in dieser vorliegenden Arbeit sowie in den oben genannten Studien zu erwarten war (Maury et al. 2016; Painsset et al. 2019; Cabal et al. 2019; Henri et al. 2016; EURL 2021). In der MLST-Datenbank des Instituts Pasteur sind bei 78,6% der gelisteten *L. monocytogenes* CC121/ST121-Isolate als Isolationsquelle Lebensmittel oder eine lebensmittelnahe Umgebung genannt. Dennoch sind diese Genotypen bereits im Zusammenhang mit humanen Listeriosefällen beschrieben worden, jedoch selten und vorrangig bei Risikogruppen-Patienten (Voronina et al. 2023; Rychli et al. 2018; Maury et al. 2016).

Bei allen drei Isolaten wurde zudem das Vorkommen der Pathogenitätsinsel LIPI-1 nachgewiesen. Dabei handelt es sich um ein Virulenzgencluster, bestehend aus sechs Genen (*prfA*, *plcA*, *hly*, *mpl*, *actA* und *plcB*), welches das intrazelluläre Überleben von *L. monocytogenes* ermöglicht und dessen Vorkommen bei allen vier *L. monocytogenes*-Linien (I-IV) beschrieben ist (Chen et al. 2017). Dahingegen konnten innerhalb der untersuchten Isolate nicht die Pathogenitätsinseln LIPI-3 oder LIPI-4 nachgewiesen werden, die mit einer erhöhten Virulenz von *L. monocytogenes* beschrieben sind und vorrangig bei hypervirulenten Stämmen vorkommen (Guidi et al. 2021; Maury et al. 2016). So wird von den Genen des Virulenzgenclusters LIPI-3 der Virulenzfaktor Listeriolysin S exprimiert, welcher mit einer erhöhten cytotoxischen und hämolytischen Aktivität von *L. monocytogenes* in Verbindung steht (Cotter et al. 2008). Die Pathogenitätsinsel LIPI-4 wird vorrangig bei den als hypervirulent beschriebenen CC4/ST4-Stämmen detektiert, welche in dieser Studie sowie in den oben genannten Studien nicht nachgewiesen wurden. Dabei konnte innerhalb eines Zellkulturversuches eine statistisch signifikante Reduktion der Zelladhäsion, Zellinvasion sowie intrazellulären Proliferation von *L. monocytogenes*-Isolaten, bei denen eine Deletion von LIPI-4 durchgeführt wurde, beobachtet werden, wodurch die Autoren im Umkehrschluss von einer erhöhten Virulenz von Stämmen, die LIPI-4 beherbergen, ausgehen (Liu et al. 2025). Die Virulenzfaktoren des LIPI-4 weisen aktuellen Studien zufolge zudem einen verstärkten Tropismus für das Zentralnervensystem (ZNS) und die Plazenta auf und Isolate, die LIPI-4 beherbergen, sind epidemiologisch stark mit Infektionen des ZNS und der maternalen-neonatalen Listeriose beim Menschen assoziiert (Maury et al. 2016).

Tabelle 6. Vergleichende Übersicht über molekulare Charakteristika von *L. monocytogenes*-Isolaten, gewonnen aus illegal eingeführten Lebensmitteln

Isolat	Herkunft	Matrix	Tierart	Linie	Serovar	ST/CC	Referenz
6	Ecuador	Käse	k. A. ¹	I	4b, 4d, 4e	2/2	Rodríguez-Lázaro et al. (2015)
32	Ukraine	Fleisch	Schwein	I	4b, 4d, 4e	2/2	
41	Argentinien	Fleisch	Schwein	I	4b, 4d, 4e	2/2	
44	Georgien	Käse	k. A.	I	4b, 4d, 4e	2 ² /2	
47	Ecuador	Fleisch	Rind	I	4b, 4d, 4e	2/2	
49	Ecuador	Fleisch	k. A.	I	4b, 4d, 4e	2/2	
57	Ecuador	Käse	k. A.	I	4b, 4d, 4e	2/2	
86	Peru	Käse	k. A.	I	4b, 4d, 4e	2/2	
153	Kolumbien	Fleisch	Rind	I	1/2b, 3b	87/87	
177	Venezuela	Fleisch	k. A.	I	1/2b, 3b	87/87	
189	Nepal	Fleisch	k. A.	I	1/2b, 3b	308/Si ³	
33	Ukraine	Fleisch	Schwein	II	1/2a, 3a	37/S	
63	China	Fleisch	k. A.	II	1/2a, 3a	8/8	
65	China	Fleisch	k. A.	II	1/2a, 3a	8/8	
131	Brasilien	Fleisch	Geflügel	II	1/2a, 3a	155/155	
115	Türkei	Fleisch	k. A.	II	1/2a, 3c	9/9	
137	Bolivien	Käse	k. A.	II	1/2a, 3c	9/9	
112	China	Fleisch	Ente	II	1/2a, 3c	9/9	
210	Kolumbien	Fleisch	k. A.	II	1/2a, 3b	378/Si	
214	Marokko	Fleisch	Geflügel	II	1/2a, 3b	199 ²	
Ro15	Moldawien	Fisch	Fisch	I	n.a. ⁴	2/2	Rychli et al. (2018)
6_11	Peru	Milchprodukt	k. A.	I	n.a.	2/2	
6_8	Ecuador	Milchprodukt	k. A.	I	n.a.	2/2	
6_6	Ecuador	Fleisch	k. A.	I	n.a.	2/2	
6_5	Georgien	Milchprodukt	k. A.	I	n.a.	2/2	
6_4	Argentinien	Fleisch	k. A.	I	n.a.	2/2	
6_2	Ukraine	Fleisch	k. A.	I	n.a.	2/2	
1_5	Albanien	Fleisch	k. A.	I	n.a.	2/2	
6_1	Ecuador	Milchprodukt	k. A.	I	n.a.	2/2	
2_5	Russland	Fleisch	k. A.	I	n.a.	5/5	
1_3	Türkei	Milchprodukt	k. A.	I	n.a.	5/5	
6_18	Nepal	Fleisch	k. A.	I	n.a.	1/1	
1_13	Türkei	Milchprodukt	k. A.	I	n.a.	1/1	
1_4	Türkei	Fleisch	k. A.	I	n.a.	1/1	
1_6	Türkei	Milchprodukt	k. A.	I	n.a.	3/3	
6_17	Venezuela	Fleisch	k. A.	I	n.a.	87/87	
6_16	Kolumbien	Fleisch	k. A.	I	n.a.	87/87	
1_9	China	Fleisch	k. A.	I	n.a.	87/87	
1_8	China	Fleisch	k. A.	I	n.a.	87/87	
1_11	Armenien	Fleisch	k. A.	II	n.a.	18/18	
Ro14	Moldawien	Fleisch	k. A.	II	n.a.	9/9	
6_15	Bolivien	Milchprodukt	k. A.	II	n.a.	9/9	
6_13	Türkei	Fleisch	k. A.	II	n.a.	9/9	

5. Zusammenfassung der Ergebnisse und übergreifende Diskussion

6_12	China	Fleisch	k. A.	II	n.a.	9/9	
2_12	Russland	Fleisch	k. A.	II	n.a.	9/9	
1_14	Türkei	Fleisch	k. A.	II	n.a.	9/9	
1_10	Türkei	Fleisch	k. A.	II	n.a.	9/9	
1_7	Türkei	Fleisch	k. A.	II	n.a.	9/9	
1_1	Türkei	Fleisch	k. A.	II	n.a.	9/9	
Ro08	Moldawien	Fisch	Fisch	II	n.a.	20/20	
Ro06	Moldawien	Fisch	Fisch	II	n.a.	20/20	
Ro04	Moldawien	Fisch	Fisch	II	n.a.	20/20	
Ro03	Moldawien	Fisch	Fisch	II	n.a.	20/20	
Ro01	Moldawien	Fisch	Fisch	II	n.a.	20/20	
1_2	Türkei	Fleisch	k. A.	II	n.a.	37/37	
6_3	Ukraine	Fleisch	k. A.	II	n.a.	37/37	
2_9	Russland	Fleisch	k. A.	II	n.a.	37/37	
6_19	Kolumbien	Fleisch	k. A.	II	n.a.	37/37	
Ro13	Moldawien	Fisch	Fisch	II	n.a.	155/155	
Ro09	Moldawien	Fisch	Fisch	II	n.a.	155/155	
Ro07	Moldawien	Fisch	Fisch	II	n.a.	155/155	
Ro05	Moldawien	Fisch	Fisch	II	n.a.	155/155	
6_14	Brasilien	Fleisch	k. A.	II	n.a.	155/155	
6_20	Marokko	Fleisch	k. A.	II	n.a.	199/199	
Ro02	Moldawien	Fisch	Fisch	II	n.a.	8/8	
6_9	China	Fleisch	k. A.	II	n.a.	8/8	
Ro12	Moldawien	Fisch	Fisch	II	n.a.	8/8	
2_10	Russland	Fleisch	k. A.	II	n.a.	11/11	
Ro11	Moldawien	Fleisch	k. A.	II	n.a.	121/121	
1_12	Türkei	Fleisch	k. A.	II	n.a.	121/121	
1_15	Türkei	Fisch	k. A.	II	n.a.	121/121	
2_1	Russland	Fleisch	k. A.	II	n.a.	121/121	
2_3	Türkei	Fleisch	k. A.	II	n.a.	121/121	
2_6	Türkei	Fleisch	k. A.	II	n.a.	121/121	
2_8	China	k. A	k. A.	II	n.a.	121/121	
Ro11	Moldawien	Milchprodukt	k. A.	II	n.a.	121/121	
2_11	Russland	Fleisch	k. A.	II	n.a.	121/121	
.							
k. B ⁵	Türkei	Käse	k.A.	I	n.a.	1/1	Schoder et al. (2015)
k. B	Türkei	Fleisch	Geflügel	I	n.a.	1/1	
k. B	Albanien	Fleisch	k. A.	I	n.a.	2/2	
k. B	Türkei	Käse	k. A.	III	n.a.	3/3	
k. B	China	Fleisch	Geflügel	I	n.a.	87/87	
k. B	China	Fleisch	Geflügel	I	n.a.	87/87	
k. B	Türkei	Käse	k. A.	I	n.a.	5/5	
k. B	Türkei	Wurst	Rind	I	n.a.	121/121	
k. B	Türkei	Fisch	Fisch	I	n.a.	121/121	
k. B	Türkei	Wurst	Rind	I	n.a.	9/9	
k. B	Türkei						
k. B	Türkei	Wurst /					
k. B	Türkei	Fleisch	k. A.	I	n.a.	9/9	

5. Zusammenfassung der Ergebnisse und übergreifende Diskussion

Fm41	Armenien	Rohes Fleisch	Rind	II	1/2a	425/90	Rinn et. al. (2015), Publikation 2
Fm42	Armenien	Käse	NT	II	1/2a	8/8	
Fm69	Kasachstan	Rohes Fleisch	Rind	II	1/2a	121/121	

¹k. A. - Keine Angabe. ²Als genetisch nächster MLST angegeben. ³Si - Konnte keinem klonalen Komplex zugeordnet werden (Singleton) ⁴n. a. - Wurde nicht für jedes Isolat einzeln angegeben. ⁵k. B. - Keine Isolatbezeichnung innerhalb der Studie.

5.3.4 *Salmonella enterica*

Insgesamt sind wenig Daten zu *Salmonella enterica*-Serovaren, die aus illegal importierten Lebensmitteln tierischer Herkunft isoliert wurden, bekannt. Die Serotypisierung nach dem White-Kaufmann-Le Minor Schema der drei im Rahmen der eigenen Studie isolierten *Salmonella enterica* subsp. *enterica*-Isolate ergab eine Zuordnung zu drei unterschiedlichen Serovaren. Ein Isolat, gewonnen aus einer Schafsfettprobe mit rohen Fleischstücken aus dem Libanon, gehörte dem Serovar Uganda an, während das zweite Isolat, isoliert aus getrocknetem Rindfleisch aus dem Sudan, dem Serovar Altona zugeordnet werden konnte. Das dritte Isolat dieser Studie wurde aus einer Rohwurst aus Moldawien isoliert und wurde als *S.* subsp. I Rauform klassifiziert.

Somit gehören die in dieser Arbeit identifizierten Serovare nach Auswertungen der EFSA nicht zu den 20 am häufigsten in der EU in humane Salmonellose-Fälle involvierten Serovaren der Jahre 2019 bis 2021 (siehe Kapitel 2.4.2, Tabelle 1 mit den häufigsten in humane Salmonellose-Fälle involvierte Serovare in der EU sowie in Deutschland) (EFSA 2022a). Dabei wird in der EU am häufigsten das Serovar Enteritidis bei humanen Salmonellose-Fälle nachgewiesen, welches auch am häufigsten in der EU aus Fleisch- und Fleischprodukten isoliert wird (EFSA 2022a; EFSA 2021). Insgesamt konnten in der EU 79,1% der humanen Salmonellosefälle im Jahr 2021 auf die Serovare Enteritidis, *S.* Typhimurium sowie auf die monophasische *S.* Typhimurium-Variante zugeführt werden, wobei dem Serovar Enteritidis mit 64,6% die größte Bedeutung zukommt (EFSA 2022a).

Obschon die in der vorliegenden Arbeit identifizierten Serovare nicht zu den 20 am häufigsten an humanen Salmonellose-Fällen ursächlich beteiligten Serovaren gehören, wurden die Serovare Altona und Uganda bereits mit lebensmittelassoziierten Ausbrüchen außerhalb der EU in Verbindung gebracht (Forshey et al. 2012; Jones et al. 2004). So wurde einem Bericht des Centers for Disease Control and Prevention (CDC) aus dem Jahr 2019 zufolge ein Salmonellenausbruch mit 81 Erkrankten in neun US-Bundesstaaten und einer Hospitalisierungsrate von 33% auf aus Mexiko importierte Papayas zurückgeführt werden, die mit *S.* Uganda kontaminiert waren (CDC 2019b). Zudem wurden in einer weiteren US-Studie verzehrfertige Schweinefleischprodukte, die mit *S.* Uganda kontaminiert waren, mit einem Salmonellose-Ausbruch in Verbindung gebracht (Jones et al. 2004).

Interessanterweise konnte bereits in zwei illegal importierten Käse-Proben ebenfalls *S. subsp. I* Rauform-Isolate, wie in einem Isolat in dieser Arbeit, detektiert werden (Rodríguez-Lázaro et al. 2015). Dies zeigt, dass illegal importierte Produkte möglicherweise als Vektoren für bisher in der EU wenig beschriebene Serovare dienen könnten, die über diese Produkte verbreitet werden könnten.

In anderen Studien wurde gezeigt, dass illegal eingeführte Lebensmittel tierischen Ursprungs als Eintragsquellen für pathogene Serovare wie *S. Enteritidis* und *S. Typhimurium* dienen können (Müller et al. 2018a; Rodríguez-Lázaro et al. 2015). In Tabelle 7 sind die molekularen Charakteristika der in dieser Arbeit untersuchten *Salmonella enterica*-Isolate vergleichend zu weiteren *Salmonella enterica*-Isolaten, gewonnen aus legal und illegal eingeführten Lebensmitteln tierischer Herkunft, dargestellt. In einer spanischen Studie konnten unter elf *S. enterica*-Isolaten ein Isolat, gewonnen aus einer Geflügelfleischprobe aus Äquatorialguinea, dem Serovar Enteritidis zugeordnet werden (siehe Tabelle 7) (Rodríguez-Lázaro et al. 2015). Ein weiteres Isolat, isoliert aus einer Fleischprobe aus Bolivien, ließ sich dem Serovar Typhimurium zuordnen (Rodríguez-Lázaro et al. 2015). Insgesamt gehörten über die Hälfte der Isolate in der erwähnten Studie zu *Salmonella enterica*-Serovaren, die in den Jahren 2019 bis 2021 unter den 20 häufigsten Erregern humaner Salmonellose gelistet sind (EFSA 2022a). Während die im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten Lebensmittel primär aus Südwestasien ($n = 47$, mit $n = 39$ aus der Türkei) und Südostasien eingeführt wurden, stammten die Isolate der spanischen Studie vorwiegend aus Lebensmitteln aus Zentral- und Südamerika, wodurch eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse schwierig ist.

In einer anderen Studie wurden aus illegal aus Russland importierten Fleischprodukten ebenfalls *S. Enteritidis*- sowie *S. Infantis*-Isolate nachgewiesen (Beutlich et al. 2015). In einer weiteren Studie, in der *S. enterica*-Isolate aus legal und illegal importierten Fleisch untersucht wurden, konnte von einer illegal eingeführten Geflügelfleischprobe aus Ägypten ebenfalls ein *S. Infantis*-Isolat isoliert werden (siehe Tabelle 7) (Müller et al. 2018a). Dieses Serovar gehört ebenfalls zu den 20 Serovaren, die in der EU am häufigsten bei menschlichen Salmonellosefällen nachgewiesen werden (EFSA 2022a; Beutlich et al. 2015). Dennoch ist insgesamt aufgrund der limitierten Anzahl untersuchter Isolate, der Heterogenität der Lebensmittelmatrices sowie der Herkunftsländer der untersuchten Proben schwierig zu evaluieren (siehe Tabelle 7),

5. Zusammenfassung der Ergebnisse und übergreifende Diskussion

inwiefern Lebensmittel illegaler Herkunft zur Verbreitung von bisher in der EU weniger in Salmonellose-Fälle involvierten Serovaren beitragen können.

Tabelle 7. Vergleichende Übersicht über nachgewiesene *Salmonella enterica* Isolate, gewonnen aus illegal und legal in die EU eingeführten Lebensmitteln tierischer Herkunft

Spezies	Herkunft	Matrix	Tierart	Einfuhr	Serovar	Referenz
<i>S. enterica</i>	Georgien	Käse	k.A. ¹	illegal	<i>S. subsp. I</i> Rauform	(Rodríguez-Lázaro et al. 2015)
<i>S. enterica</i>	Bolivien	Käse	k.A.	illegal	4,12:d:- <i>S. subsp. I</i>	
<i>S. enterica</i>	Moldawien	Käse	k.A.	illegal	Rauform	
<i>S. enterica</i>	Peru	Fleisch	k.A.	illegal	4,12:d:-	
<i>S. enterica</i>	Peru	Käse	k.A.	illegal	4,12:d:-	
<i>S. enterica</i>	Äquatorialguinea	Fleisch	Geflügel	illegal	Enteritidis	
<i>S. enterica</i>	Äquatorialguinea	Fleisch	Geflügel	illegal	Oranienburg	
<i>S. enterica</i>	Bolivien	Fleisch	k.A.	illegal	Anatum	
<i>S. enterica</i>	Bolivien	Fleisch	k.A.	illegal	Typhimurium	
<i>S. enterica</i>	Bolivien	Fleisch	k.A.	illegal	Anatum	
<i>S. enterica</i>	Bolivien	Käse	k.A.	illegal	Newport	
<i>S. enterica</i>	Vietnam	Fleisch	Kaninchen	illegal	Welteverden	(Müller et al. 2018a)
<i>S. enterica</i>	Ägypten	Fleisch	Geflügel	illegal	Infantis	
<i>S. enterica</i>	Brasilien	Fleisch	Geflügel	legal	4:-:-	
<i>S. enterica</i>	Brasilien	Fleisch	Geflügel	legal	Heidelberg	
<i>S. enterica</i>	Brasilien	Fleisch	Geflügel	legal	Heidelberg	
<i>S. enterica</i>	Russland	Fleisch	k.A.	illegal	Infantis	(Beutlich et al. 2015)
<i>S. enterica</i>	Russland	Fleisch	k.A.	illegal	Infantis	
<i>S. enterica</i>	Russland	Fleisch	k.A.	illegal	Enteritidis	
<i>S. enterica</i>	Russland	Fleisch	k.A.	illegal	Enteritidis	
<i>S. enterica</i>	Libanon	Fett mit rohem Fleisch	Schaf	illegal	Uganda	Rinn et. al. (2025), Publikation 2
<i>S. enterica</i>	Sudan	Getrocknetes Fleisch	Rind	illegal	Altona <i>S. subsp. I</i>	
<i>S. enterica</i>	Moldawien	Rohwurst	Schwein	illegal	Rauform	

¹k.A. - Keine Angabe

5.3.4 Kommensale *E. coli* und ESBL-produzierende *E. coli*

Insgesamt konnten aus den illegal importierten Lebensmittel 23 präsumtiv kommensale *E. coli* isoliert werden und vier der fünf ESBL-produzierenden Enterobacterales-Isolate mittels der Speziesbestimmung als *E. coli* identifiziert werden. Das vierte Isolat wurde als *Klebsiella (K.) pneumoniae* klassifiziert.

Von den 23 präsumtiv kommensalen *E. coli*-Isolaten ließen sich 16 Isolate zur phylogenetischen Gruppe A und sechs Isolate zur Gruppe B1 zuordnen. Unter den ESBL-produzierenden *E. coli* wurden drei der vier Isolate der Gruppe A und ein Isolat der Gruppe B1 zugeordnet. Dabei handelt es sich bei den Gruppen A und B1 um phylogenetische Gruppen, die vorrangig mit kommensalen *E. coli* assoziiert werden und gewöhnlich bei der Bevölkerung sowie bei Tieren nachgewiesen werden (Dobrindt 2005; Clermont et al. 2000). Zusammengefasst lässt sich darauf schließen, dass es sich aufgrund der Mehrheit der *E. coli*-Isolate, die Gruppe A und B1 zugeordnet werden konnten, um kommensale *E. coli* handelt. Interessanterweise ließ sich eines dieser Isolate, isoliert aus Schafsfett, welches aus dem Libanon importiert wurde, der Gruppe D zuordnen. Dabei werden klinische *E. coli*-Isolate zum Großteil den Gruppen D und Gruppe B2 zugeordnet, sodass eine Pathogenität dieses Isolates nicht auszuschließen ist (Dobrindt 2005; Bok et al. 2018). Da in dieser Arbeit jedoch keine weiteren Untersuchungen auf Virulenzeigenschaften der präsumtiv kommensalen *E. coli* durchgeführt wurden, ist eine Aussage über deren Pathogenität nicht abschließend zu treffen.

5.4 Antibiotikaresistenzen und Nachweis von Resistenzgenen in legal und illegal importierten Lebensmitteln tierischer Herkunft

5.4.1 Antibiotikaresistenzen von isolierten *Staphylococcus aureus* einschließlich MRSA

Inwiefern von importierten Lebensmitteln tierischer Herkunft ein erhöhtes Risiko von Infektionen mit multiresistenten *S. aureus* bzw. MRSA ausgeht bzw. wie groß deren Einfluss auf eine Verbreitung dieser ist, ist bisher nur unvollständig untersucht. Allerdings wurden bereits auf legal und illegal importierten Lebensmitteln tierischer Herkunft multiresistente *S. aureus* sowie MRSA nachgewiesen, die teils untypische Resistenzmuster aufwiesen (Müller et al. 2016; Rodríguez-Lázaro et al. 2017). Bei denen in der vorliegenden Arbeit untersuchten *S. aureus*-Isolaten (n = 11), die aus illegal importierten Lebensmitteln tierischer Herkunft isoliert wurden, konnten

unterschiedliche Resistenzmuster sowie multiresistente Stämme nachgewiesen werden (Publikation 2, Abbildung 1). Insgesamt ließen sich drei Isolate aufgrund einer Resistenz gegenüber mehr als drei Wirkstoffklassen als multiresistent einstufen. Im Gegensatz dazu dokumentieren Rodríguez-Lázaro et al. (2017), dass die Hälfte der untersuchten *S. aureus*-Isolate, die aus illegal über einen spanischen Flughafen importierten Lebensmitteln tierischer Herkunft isoliert wurden, sensibel gegenüber den getesteten antimikrobiellen Wirkstoffen waren. Höhere Nachweisraten an resistenten Isolaten konnten dahingegen in einer Studie von Müller et al. (2016), in der importiertes Fleisch untersucht wurde, festgestellt werden. Dabei ließen sich sechs von 14 *S. aureus* und acht der neun MRSA-Isolate, als multiresistent klassifizieren. Die höhere Rate an multiresistenten Isolaten in dieser Studie könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Mehrheit der untersuchten Isolate (14 von 23) aus Geflügelfleisch, welches aus Ägypten eingeführt wurde, isoliert wurde, wo hohe Prävalenzen an multiresistenten MRSA-Stämmen in Geflügelfleisch beschrieben sind (Sallam et al. 2015).

Bei Betrachtung der Resistenzprofile in der vorliegenden Arbeit fällt auf, dass sich am häufigsten eine phänotypische Resistenz gegenüber Penicillin in 54% (6 von 11) der Isolate zeigte, gefolgt von einer Resistenz gegenüber Tetrazyklin (18,2%, 2 von 11). Ähnlichkeiten bezüglich der festgestellten Resistenzmuster konnten zu früheren Studien nachgewiesen werden. So detektierten Rodríguez-Lázaro et al. (2017), unter 49 aus illegal eingeführten Lebensmitteln isolierten MRSA bei 77,8% (43 von 49) eine Resistenz gegenüber Penicillin und bei knapp einem Drittel (28,7%) eine Resistenz gegenüber Tetrazyklin. In der Studie um Müller et al. (2016) zeigten sich insgesamt ebenfalls fast ein Drittel der Isolate (6 von 23, 26%) resistent gegenüber Tetrazyklin. Am häufigsten wurde in der Studie von Müller et al. (2016) eine Resistenz gegenüber β -Laktam-Antibiotika nachgewiesen (14 von 23), es handelte sich aber bei neun der 14 Isolate um MRSA, die als resistent gegenüber β -Laktam-Wirkstoffen gelten (Lade et al. 2022; Stefani und Goglio 2010; Peacock und Paterson 2015). In der vorliegenden Arbeit wurde nur ein Isolat, gewonnen aus illegal importiertem Schafsfett aus der Türkei, aufgrund einer phänotypischen Resistenz gegenüber Cefoxitin und der Anwesenheit des *mecA*-Gens als MRSA klassifiziert. Zusätzlich konnte in dem MRSA-Isolat sowie einem weiteren MSSA-Isolat eine phänotypische Resistenz gegenüber Tetrazyklinen, vermittelt durch ein *tet(K)*-Gen, nachgewiesen werden.

Interessanterweise konnte bei einem Isolat, welches phänotypisch resistent gegenüber Erythromycin war, kein *erm(A)* oder *erm(C)*-Gen nachgewiesen werden. Dabei sind diese Gene häufig für die Ausbildung dieser Resistenz verantwortlich (Ross et al. 1990). Dennoch sind auch Resistenzen gegenüber Erythromycin beschrieben, die auf die Anwesenheit von anderen Genen, wie *msr(A/B)*-Genen, zurückgeführt werden (Musher et al. 2002).

Der Nachweis von *S. aureus* in importierten Lebensmitteln mit untypischen Resistenzmustern konnte bereits in vergangenen Studien gezeigt werden, wie der Nachweis eines *mecA*-Gen-positiven MRSA-Isolates mit Oxacillin-sensitivem Phänotyp sowie von *mecA*- bzw. *mecC*-negativen MRSA-Isolaten mit phänotypischer Oxacillin-Resistenz (Müller et al. 2016; Rodríguez-Lázaro et al. 2017). Solche Stämme mit untypischen Resistenzmustern können bei routinemäßigen Resistenzbestimmungen unentdeckt bleiben oder zu fehlerhaften Aussagen bezüglich der Sensibilität gegenüber bestimmten Wirkstoffklassen führen. Dies kann sich aufgrund der Wahl eines nicht wirksamen Antibiotikums negativ auf den Therapieerfolg auswirken.

5.4.2 Nachweis von ESBL-produzierenden *Enterobacterales* sowie deren Genotypen
Insgesamt wurden 50 legal importierte Rindfleischproben (Publikation 1) sowie 100 illegal importierte Lebensmittel tierischen Ursprungs (Publikation 2) auf das Vorkommen von ESBL-bildenden Enterobacterales untersucht. Zur Überprüfung einer Cephalosporin-Resistenz wurden die Proben einem initialen Screeningtest nach dem Protokoll des Dänischen Nationalen Lebensmittelinstituts (engl.: National Food Institute; DTU Food) unterzogen (Hasman et al. 2015). Mittels dieses Screeningtest wurden 14 Isolate als verdächtig eingestuft. Von den insgesamt 14 ESBL-verdächtigen Isolaten ($n = 5$ aus legal importierten Rindfleischproben, $n = 9$ aus den illegal eingeführten Lebensmitteln), konnten fünf Isolate phänotypisch als ESBL-Bildner bestätigt werden mit einer Resistenz gegenüber Cephalosporinen der dritten Generation. Dies erfolgte über einen nach CLSI-Standard durchgeführten ESBL-Bestätigungstest mittels Bouillon-Mikrodilutionsverfahren (CLSI 2020). Die fünf bestätigten ESBL-bildenden Enterobacterales-Isolate wurden alle aus illegal importierten Lebensmitteln isoliert (Tabelle 3, Publikation 2).

In Europa gehören *E. coli* zu der am häufigsten nachgewiesenen Spezies von ESBL-Bildnern, was sich in den hier vorliegenden Ergebnissen widerspiegelt (EFSA 2011).

Mittels einer Sequenzanalyse der 16S rRNA-PCR-Amplifikate konnten vier der Isolate als *E. coli* und ein Isolat als *K. pneumoniae* klassifiziert werden (Tabelle 3, Publikation 2).

Bei den untersuchten Isolaten wurden bei allen Isolaten ESBL-Gene aus der Gruppe 1 der CTX-M- β -Laktamasen nachgewiesen werden. Diese sind weltweit verbreitet (Bevan et al. 2017; Cantón et al. 2012). Interessanterweise konnte in *E. coli*-Isolaten, die in einer vorherigen Studie von Müller et al. (2018b) aus legal und illegal eingeführten Fleisch- und Fleischprodukten gewonnen wurden, vorrangig *bla*_{CTX-M-2} und *bla*_{CTX-M-8}-Gene nachgewiesen werden, wobei in dieser Studie in zwei Isolaten *bla*_{CTX-M-1}-Gene, in einem Isolat *bla*_{CTX-M-3} und in zwei Isolaten *bla*_{CTX-M-15}-Gene nachgewiesen wurden. Die unterschiedlichen Ergebnisse können damit zusammenhängen, dass in der vorher genannten Studie im Gegensatz zu der vorliegenden Arbeit vorrangig Geflügelfleisch aus Südamerika, prädominierend aus Brasilien, untersucht wurde, wo *bla*_{CTX-M-2} und *bla*_{CTX-M-8}-Gen-tragende Isolate als weit verbreitet gelten (Rocha et al. 2016). Zudem wurde in der vorliegenden Arbeit ein breiteres Spektrum unterschiedlicher Lebensmittelmatrizes aus verschiedenen Herkunftsländern untersucht, was ebenfalls zu den unterschiedlichen Ergebnissen beitragen könnte.

Die *bla*_{CTX-M-1} und *bla*_{CTX-M-15}-Gene, welche in jeweils zwei Isolaten in der vorliegenden Arbeit detektiert werden konnten, gehören zu den am häufigsten nachgewiesenen β -Laktamase-Genen in klinischen Isolaten in Europa (Falgenhauer et al. 2016; Pietsch et al. 2017). Da *bla*_{CTX-M-15}-Gene häufig bei Isolaten von lebensmittelliefernden Tieren in Europa nachgewiesen und gleichzeitig bei Erkrankungsfällen mit komplizierten Harnwegsinfektionen sowie septikämischen Geschehen identifiziert werden, sind Nachweise dieses Gens in Isolaten von Lebensmitteln wegen einer potentiellen Übertragung der Isolate auf den Menschen von Relevanz (Valentin et al. 2014; López-Cerero et al. 2011; Irrgang et al. 2018; Peirano et al. 2012; EFSA 2011; Livermore et al. 2007).

Als das am häufigsten vorkommende *bla*_{SHV}-Gen in Europa ist *bla*_{SHV-12} beschrieben, wobei in dieser Arbeit kein Isolat dieses β -Laktamase-Gen beherbergte (Ceccarelli et al. 2019; Alonso et al. 2017). Lediglich in dem einzelnen *K. pneumoniae*-Isolat, isoliert aus rohem Geflügelfleisch, das aus Moldawien eingeführt wurde, konnte ein *bla*_{SHV}-Gen nachgewiesen werden. Dabei handelte es sich um ein bisher in der Literatur wenig beschriebenes *bla*_{SHV-168}-Gen. Denisuik et al. (2013) dokumentierten den

Nachweis von *bla*_{SHV-168} in einem *K. pneumoniae*-Isolat, welches aus einem pflanzlichen Lebensmittel gewonnen wurde, wohingegen Chelaghma et al. (2022) *bla*_{SHV-168} in einem klinischen Isolat nachweisen konnten. Es sind in der Literatur keine phänotypischen Besonderheiten in Bezug auf erhöhte MHK-Werte gegenüber Cephalosporinen der dritten oder vierten Generation beschrieben und auch in der vorliegenden Arbeit konnten keine Abweichungen im Resistenzspektrum im Vergleich zu den anderen getesteten ESBL-produzierenden *Enterobacteriaceae* festgestellt werden. Interessanterweise berichten Chelaghma et al. (2022) ebenfalls von dem simultanen Nachweis eines *bla*_{CTX-M-15}-Gens in dem beschriebenen Isolat, wie es auch in dem in dieser Arbeit untersuchten Isolat vorgefunden wurde.

Zusätzlich ließ sich bei drei der untersuchten Isolate, die aus illegal aus der Türkei importierten Lebensmitteln tierischen Ursprungs isoliert wurden, *bla*_{TEM-1} nachweisen, wobei es sich hier um ein Gen handelt, welches für eine β -Laktamase ohne erweitertes Wirtsspektrum codiert (Medeiros 1997).

Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass illegal importierte Lebensmittel als Vektoren für ESBL-bildende *Enterobacteriaceae* dienen können, die zudem selten vorkommende β -Laktamase-Typen beherbergen können. Gleichzeitig deuten unsere Ergebnisse darauf hin, dass von legal importiertem rohen Rindfleisch von keinem erhöhten Risiko bezogen auf den Eintrag von ESBL-bildenden Enterobacterales auszugehen ist.

5.4.3 Weitere Antibiotikaresistenzen von ESBL-produzierenden *Enterobacterales*, kommensalen *E. coli* und STEC

Neben der Überprüfung auf den ESBL-Phäno- und Genotyp wurden die ESBL-produzierenden Enterobacterales auf das Vorkommen weiterer Antibiotikaresistenzen mittels Agardiffusionstest überprüft. Ebenso erfolgt eine Empfindlichkeitstestung der präsumtiv kommensalen *E. coli* sowie des STEC-Isolates. Insgesamt konnte eine Vielzahl an phänotypischen Resistenzen detektiert werden, wobei bei fünf der 23 präsumtiv kommensalen *E. coli*-Isolate die phänotypische Resistenz gegenüber mindestens einem der getesteten antimikrobiellen Wirkstoffe nachzuweisen war. Dabei wurden drei der Isolate (3/23, 13%) als multiresistent klassifiziert. In Tabelle 8 sind die genotypischen und phänotypischen Charakteristika der in dieser Arbeit untersuchten ESBL-produzierenden Enterobacterales, kommensalen *E. coli* und STEC-Isolate dargestellt.

Der Nachweis antibiotikaresistenter kommensaler *E. coli* in Lebensmitteln ist wichtig, da deren Detektion seitens der EFSA genutzt wird, um Rückschlüsse über das Vorkommen und die Verbreitung bestimmter Resistenzen entlang der Lebensmittelkette zu ziehen (Szmolka und Nagy 2013; EFSA und ECDC 2023). Insgesamt sind in der Literatur wenig Daten über die Verbreitung von multiresistenten kommensalen *E. coli* auf illegal importierten Lebensmitteln tierischer Herkunft verfügbar. In einer Studie von Nagy et al. (2015) konnten von 113 kommensalen *E. coli*-Isolaten 12,4% als multiresistent klassifiziert werden. Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit der in dieser Arbeit vorliegenden Detektionsfrequenz von 13%. Diese vergleichbaren Ergebnisse könnten damit zusammenhängen, dass unter den von Nagy et al. (2015) untersuchten kommensalen multiresistenten *E. coli*-Isolate über ein Drittel aus türkischen Einfuhren isoliert wurden und in der vorliegenden Arbeit vier der fünf multiresistenten kommensalen *E. coli*-Isolate aus Lebensmitteln tierischen Ursprungs aus der Türkei stammten. In mehreren Studien, in denen die Prävalenz von multiresistenten *Enterobacteriaceae* in Fleisch- und Fleischprodukten sowie Milchprodukten in der Türkei untersucht wurde, konnten Nachweisraten an multiresistenten *E. coli* von 9,9% bis 45% detektiert werden (Tekiner und Özpınar 2016; Arslan und Özdemir 2008; Kürekci et al. 2016).

Unter den vier ESBL-produzierenden *E. coli* konnten drei als multiresistent klassifiziert werden. Neben den Resistenzen gegenüber den β -Laktam-Antibiotika wurden am häufigsten Resistenzen gegenüber Tetrazyklinen (8 von 13) und Sulfonamiden (7 von 13) detektiert (Tabelle 8). Ähnliche Resistenzmuster wurden in zwei vorherigen Studien nachgewiesen, in denen kommensale *E. coli* sowie ESBL-produzierende *E. coli* aus importierten Lebensmitteln tierischer Herkunft untersucht wurden (Nagy et al. 2015; Müller et al. 2018b). Resistenzen gegenüber Tetrazyklinen und Sulfonamiden waren zu erwarten, da diese Wirkstoffe zu den in der Behandlung von Infektionen bei Nutztieren am häufigsten eingesetzten Antibiotika zählen und Resistenzen gegenüber diesen Wirkstoffklassen häufig bei *E. coli* nachgewiesen werden. Die Detektion multiresistenter kommensaler *E. coli*, die gegen Wirkstoffe wie Ampicillin resistent sind, ist durchaus bedeutsam, da Ampicillin seitens der WHO als "kritisch wichtiger antimikrobieller Wirkstoff" (engl.: critically important antimicrobials; CIA) in der Behandlung humaner Infektionen eingestuft wird. Ebenso werden Sulfamethoxazol sowie Tetrazyklin seitens der WHO als "sehr wichtige antimikrobielle Wirkstoffe" (engl.: highly important antimicrobials; HIA) eingestuft, obwohl sich deren Einsatz in der

Humanmedizin in den letzten Jahren aufgrund der Resistenzlage reduziert hat und Sulfonamide, wie Sulfamethoxazol, primär eher in Kombination mit Trimethoprim bei der Initialbehandlung unkomplizierter Hautinfektionen oder akuter, unkomplizierter Harnwegsinfektionen eingesetzt wird (Bowen et al. 2017; Wesolek et al. 2022).

Interessanterweise ließ sich bei einem der drei *E. coli*-Isolate, die eine phänotypische Resistenz gegenüber Trimethoprim aufwiesen, keines der getesteten *dfp*-Gene nachweisen, welche häufig eine Trimethoprim-Resistenz vermitteln (Šeputienė et al. 2010). Diskrepanzen zwischen dem phänotypischen und genotypischen Resistenzprofil sind bereits bei antibiotikaresistenten *E. coli* beschrieben (Moran et al. 2017; Davis et al. 2011; Do Nascimento et al. 2017). So zeigten die Autoren Moran et al. (2017) in einer Studie, dass Trimethoprim-Resistenz vermittelnde chromosomale Mutationen, wie die innerhalb des *folA*-Gens, nicht durch wie in der vorliegenden Arbeit angewendete Standard-PCR-Verfahren nachgewiesen werden können. Des Weiteren konnten bei drei der untersuchten *E. coli*-Isolate (bei einem ESBL-produzierenden *E. coli*, einem kommensalen *E. coli* sowie dem untersuchten STEC-Isolat) phänotypische Resistenzen gegenüber Chinolonen festgestellt werden. In einem ESBL-bildenden *E. coli*-Isolat (Fe22), isoliert aus einem türkischen Frischkäse, wurde sogar eine phänotypische Resistenz gegenüber Ciprofloxacin festgestellt. Resistenzen gegenüber Chinolonen werden bei *E. coli* häufig über Mutationen der für Untereinheiten der DNA-Gyrase codierenden Gene *gyrA* und *gyrB* und/oder der Topoisomerase IV codierenden Gene (*parC* und *parE*) hervorgerufen (Hopkins et al. 2005). Bei allen drei Isolaten konnte eine Ser83Leu Mutation in *gyrA* detektiert werden, welche die phänotypische Resistenz gegenüber Nalixidinsäure erklärt. Die phänotypische Resistenz gegenüber Ciprofloxacin in dem Isolat Fe22 kann vermutlich auf die detektierte Doppelmutation in *gyrA* (Ser83Leu, Asp87Asn) sowie eine zusätzliche Doppelmutation in *parC* (Ser80Ile, Ala56Thr) zurückzuführen werden, wie bereits in der Literatur beschrieben (Tabelle 8) (Guillard et al. 2016; Aworh et al. 2023). Dabei ist insbesondere die Co-Resistenz des ESBL-produzierenden *E. coli*-Isolates gegenüber Fluorchinolonen sowie Cephalosporinen der dritten und vierten Generation als kritisch anzusehen, da diese Wirkstoffe seitens der WHO äußerst als "höchst prioritär klassifizierte antimikrobielle Wirkstoffe" (engl.: highest priority critically important antimicrobials; HCIA) eingestuft wurden (WHO 2019). Dieser Nachweis ist in der EU bei lebensmittelliefernden Tieren und legal importiertem Frischfleisch selten. Inwiefern illegal importierte Lebensmittel zu einer Verbreitung von ESBL-

produzierenden *E. coli*-Isolaten mit solchen kombinierten Resistenzen beitragen können, ist aufgrund der limitierten Studienlage schwierig zu beurteilen, dennoch ist dies ein interessanter Fund. Unsere Ergebnisse zeigen somit, dass illegal importierte Lebensmittel als Reservoir für multiresistente *E. coli* dienen können. Dies ist von Bedeutung, da bestimmte Resistenzgene, wie ESBL-Gene, auf Plasmiden lokalisiert sein können und durch horizontalen Gentransfer eine Übertragung und Verbreitung auf andere Bakterienstämme möglich ist (Szmolka und Nagy 2013). Eine weitere Untersuchung wäre daher zu empfehlen.

5. Zusammenfassung der Ergebnisse und übergreifende Diskussion

Tabelle 8: Darstellung der genotypischen und phänotypischen Charakteristika der in dieser Arbeit untersuchten ESBL-produzierenden *Enterobacterales*, kommensalen *E. coli* und STEC-Isolate

Isolat	Spezies	Matrix	Tierart	Herkunft	Resistenzphänotyp ¹	Resistenzgenotyp		Mutationen in DNA-Gyrase codierenden Genen (<i>gyrA/gyrB</i>) und in Topoisomerase IV codierenden Genen (<i>parC/parE</i>) ²	
						β-Laktamase-Gen	Weitere Resistenzgene	<i>gyrA</i> -Gen-Mutation	<i>parC</i> -Gen-Mutation
Fc10	<i>E. coli</i>	Getrocknetes Fleisch	Rind	Sudan	AMP, TET, SUL, SXT, TMP	TEM-1	<i>tet(A)</i> , <i>tet(B)</i> , <i>sul2</i> , <i>dfrA14</i>	-	-
Fc48	<i>E. coli</i>	Rohes Fleisch	Geflügel	Türkei	TET, SUL, STR, NAL	-	<i>tet(B)</i> , <i>sul2</i> , <i>strA</i> , <i>strB</i>	Ser83Leu	-
Fc53	<i>E. coli</i>	Salzlakenkäse	N.b. ³	Türkei	TET, SUL, STR	-	<i>tet(B)</i> , <i>sul2</i> , <i>strA</i> , <i>strB</i>	-	-
Fc77	<i>E. coli</i>	Salzlakenkäse	N.b.	Türkei	TET	-	<i>tet(B)</i>	-	-
Fc78	<i>E. coli</i>	Salzlakenkäse	N.b.	Türkei	TET	-	<i>tet(B)</i>	-	-
Fs24	<i>E. coli</i> (STEC)	Fett mit rohem Fleisch	Schaf	Syrien	NAL	-	-	Ser83Leu	-
Fe22	<i>E. coli</i> ⁴	Frischkäse	N.b.	Türkei	BLA, TET, SUL, SXT, TMP, STR, NAL, CIP, CHL	CTX-M-1, TEM-1	<i>tet(A)</i> , <i>tet(B)</i> , <i>sul2</i> , <i>dfrA17</i> , <i>strA</i> , <i>strB</i> , <i>catA1</i>	Ser83Leu, As87Asn	Ser80Ile, Ala56Thr
Fe45	<i>E. coli</i> ⁴	Getrocknetes	Schwein	Kasachstan	BLA, TET	CTX-M-1	<i>tet(B)</i>	-	-
Fe53	<i>E. coli</i> ⁴	Salzlakenkäse	N.b.	Türkei	BLA, TET, SUL, SXT, TMP, STR, CHL	CTX-M-3, TEM-1	<i>tet(A)</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>strA</i> , <i>strB</i> , <i>catA1</i>	-	-
Fe60	<i>K. pneumoniae</i> ⁴	Rohes Fleisch	Geflügel	Moldowien	BLA, SUL, STR	CTX-M-15, SHV-168	<i>sul2</i> , <i>strA</i> , <i>strB</i>	-	-
Fe72	<i>E. coli</i> ⁴	Salzlakenkäse	N.b.	Türkei	BLA, SUL, SXT, TMP, STR	CTX-M-15, TEM-1	<i>sul2</i> , <i>strA</i>	-	-

¹AMP = Ampicillin, BLA = β-Laktam-Antibiotika, CHL = Chloramphenicol, CIP = Ciprofloxacin, NAL = Nalixidinsäure, STR = Streptomycin, SUL = Sulfonamide, SXT = Trimethoprim/Sulfamethoxazol, TET = Tetryzyklin, TMP = Trimethoprim. ²- kein Nachweis einer *gyrA*-Gen-Mutation oder *parC*-Gen-Mutation. ³N.b. - Nicht typisierbar. ⁴Isolate wurden als ESBL-Bildner bestätigt.

5.5 Schlussfolgerung

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass legal und illegal importierte Lebensmittel tierischer Herkunft als Vektoren für lebensmittelassoziierte bakterielle Pathogene wie *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, Shigatoxin produzierende *Escherichia coli* (STEC) und *Staphylococcus aureus* dienen können. Insgesamt ist jedoch bei den legal importierten Rindfleischproben nicht von einem erhöhten Expositionsrisiko im Vergleich zu innerhalb der EU produziertem Rindfleisch mit lebensmittelassoziierten Pathogenen auszugehen. Die erhöhten Keimzahlwerte für Hygieneindikator-Keime deuten auf Mängel bezüglich der Einhaltung hygienischer Produktions- und Transportbedingungen hin. Diese Einhaltung ist jedoch von großer Relevanz, um auch nach längeren Transport-, Lager- oder Kühlzeiten ein hygienisch einwandfreies Produkt zu gewährleisten. Die bei illegal eingeführten Lebensmitteln tierischer Herkunft festgestellten Hygienemängel lassen auf nicht adäquate Produktionsbedingungen in den Herkunftsländern sowie auf eine unzureichende Kühlung während des Transports schließen, die aus lebensmittelhygienischer Sicht als kritisch zu bewerten sind.

Bei den Isolaten wurden neue bzw. bisher in der EU wenig beschriebene Genotypen nachgewiesen, wie z.B. ein STEC-Genotyp mit einer untypischen Antigensequenz (B17:H19) bei legal importiertem Rindfleisch sowie ein neu beschriebener ST8323 eines *S. aureus*-Isolates aus illegal importiertem Käse aus der Türkei. Des Weiteren konnten eine Vielzahl multiresistenter pathogener sowie kommensaler Isolate nachgewiesen werden. Darüber hinaus konnten in den STEC-Isolaten und in den *S. aureus*-Isolaten verschiedene Virulenz-assoziierte Gene identifiziert werden. Da es sich bei einem Großteil der illegal importierten Lebensmittel um verzehrfertige Produkte handelte und davon auszugehen ist, dass das legal importierte rohe Rindfleisch nicht vollständig durchgegart verzehrt wird, kann das Risiko einer Infektion mit pathogenen und/oder virulenten Bakterien erhöht sein.

Obwohl in dieser Arbeit lediglich eine geringe Anzahl an Isolaten untersucht werden konnte, wurde gezeigt, dass importierte Lebensmittel zu einer Verbreitung von pathogenen und multiresistenten Bakterienstämmen beitragen können. Dies unterstreicht die Relevanz effektiver Grenzkontrollen, um die unkontrollierte Einfuhr von Lebensmitteln in die EU einzudämmen und um das Bewusstsein für das Verbot illegaler Lebensmitteleinfuhren durch Reisende zu schärfen.

6. Zusammenfassung

Nachweis und molekulare Charakterisierung pathogener und antibiotikaresistenter Bakterien isoliert aus legal und illegal in die Europäische Union importierten Lebensmitteln tierischer Herkunft

Nicola Susan Rinn

Der Import von tierischen Lebensmitteln aus Drittländern spielt für die EU eine große Rolle. Insbesondere Rindfleisch wird jährlich in großen Mengen in die EU eingeführt. Ebenso werden illegal Lebensmittel tierischer Herkunft über den internationalen Reiseverkehr eingeführt. Über die Charakteristika von Bakterienisolaten aus tierischen Erzeugnissen, die in die EU eingeführt werden, ist dabei bisher wenig bekannt.

Diese Arbeit umfasst die Erhebung des mikrobiologischen Status von aus Drittländern in die EU importierten Rindfleischproben (n = 100) sowie von illegal über den Flugverkehr eingeführten Lebensmitteln tierischer Herkunft (n = 100) mittels einer Bewertung anhand der mikrobiologischen Grenzwerte auf EU-Ebene bzw. der Warnwerte der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM). Ein Schwerpunkt lag auf der molekularen Charakterisierung der Isolate einschließlich des Nachweises von Virulenz-assoziierten Faktoren. Um eine Aussage über das Vorkommen von Resistenzen bei den Isolaten zu treffen, wurden zudem antimikrobielle Empfindlichkeitstestungen durchgeführt und die Isolate auf das Vorliegen von Resistenzgenen untersucht. Ziel war es, zu evaluieren, inwiefern Lebensmittelimporte zur Verbreitung pathogener bzw. virulenter und/oder multiresistenter sowie in der EU für gewöhnlich nicht vorkommender Genotypen beitragen können.

Die Proben wurden auf Hygieneindikator-Keime (aerobe mesophile Gesamtkeimzahl, *Enterobacteriaceae* und *Escherichia coli*) sowie auf die Anwesenheit relevanter lebensmittelassoziierter Pathogene (Shigatoxin-produzierende *E. coli* (STEC), *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* und *Staphylococcus aureus*) untersucht. Zusätzlich erfolgte ein Screening auf das Vorkommen von ESBL/AmpC-produzierenden Enterobacterales. Die illegal importierten Lebensmittel wurden zudem auf die Anwesenheit von Methicillin-resistenten *S. aureus* (MRSA) sowie antibiotikaresistenten kommensalen *E. coli* untersucht. Zudem wurden die

Ganzgenomsequenzen von drei STEC-Isolaten, elf *S. aureus*-Isolaten sowie drei *L. monocytogenes*-Isolaten analysiert und es erfolgte eine Serotypisierung der drei *Salmonella enterica*-Isolate.

Insgesamt ließen sich erhebliche hygienische Defizite bei den importierten Rindfleischproben sowie den illegal eingeführten Lebensmitteln feststellen, die auf eine mangelnde Kühlung während des Transports, Kontaminationen während der Verarbeitung sowie fäkale Kontaminationen hindeuten.

In der Summe ließ sich bei den legal importierten Rindfleischproben eine niedrigere Nachweisrate an lebensmittelassoziierten Pathogenen feststellen, wohingegen diese bei den illegal importierten Lebensmitteln tierischer Herkunft höher lag. Anhand der molekularen Charakterisierung der Isolate konnten ungewöhnliche bzw. bisher nicht beschriebene Genotypen sowie eine Vielzahl von phänotypischen Resistenzmustern nachgewiesen werden.

Von den STEC-Isolaten wurden zwei Isolate aus den legal importierten Rindfleischproben und ein Isolat aus den illegal eingeführten tierischen Lebensmitteln isoliert. Die Analyse der Ganzgenomsequenzen erlaubte eine Zuordnung der Isolate zur phylogenetischen Hauptgruppe B1, welche besonders häufig bei tieradaptierten-Linien vorzufinden ist. Bei allen drei Isolaten ließen sich jeweils *stx1*- sowie *stx2*-Gene nachweisen, wobei kein Isolat positiv auf das *eae*-Gen getestet wurde. Die Isolate konnten drei unterschiedlichen Serotypen (O178:H7, B17:H19 und O43:H2) zugeordnet werden, wobei keines der Isolate zu den in der EU hauptsächlich in Infektionsgeschehen involvierten Serotypen zählte. Der ungewöhnliche Nachweis eines B17-STEC auf den legal importierten Rindfleischproben ist dabei in Hinblick auf die Verbreitung wenig beschriebener Genotypen hervorzuheben. Des Weiteren wurden mehrere Virulenz-assoziierte Gene wie *iss*, *ehxA* und *astA* nachgewiesen, die mit einer erhöhten STEC-Virulenz assoziiert sind.

Unter den aus den illegal importierten Lebensmitteln tierischer Herkunft gewonnenen *S. aureus*-Isolaten (n = 11) ließ sich eine große Heterogenität an Genotypen feststellen. Ein Isolat wurde als MRSA klassifiziert. Insgesamt ließen sich die *S. aureus*-Isolate zehn verschiedenen MLS-Typen sowie zehn *spa*-Typen zuordnen. Dabei konnten zwei Isolate dem gleichen Sequenztyp (ST15) zugeordnet werden und ein Isolat wurde als ein neuer Sequenztyp (ST8323) klassifiziert. Keines der Isolate gehörte dem in der EU am häufigsten beschriebenen Nutztier-assoziierten klonalen

Komplex CC398 an, wohingegen drei Isolate dem Mastitis-assoziierten CC97 angehörten, welcher zunehmend mit Infektionen beim Menschen in Verbindung gebracht wird. Die restlichen Isolate gehörten den klonalen Komplexen CC1, CC8 und CC15 an, wobei ein Isolat keinem klonalen Komplex zuzuordnen war. Des Weiteren konnten bei allen *S. aureus*-Isolaten Gene nachgewiesen werden, die hitzestabile Enterotoxine (SE) kodieren. Somit ist bei allen Isolaten davon auszugehen, dass es sich um Enterotoxin-Bildner handelt. Alle Isolate trugen mindestens ein Virulenzgen des IEC-Clusters, wodurch eher eine Kontamination humanen Ursprungs anzunehmen ist. Zusätzlich beherbergte ein Isolat das Toxic Shock Syndrome Toxin-1-Gen (*tsst1*). Insgesamt ließen sich drei Isolate als multiresistent einstufen.

Die aus den illegal importierten Lebensmitteln gewonnenen *L. monocytogenes*-Isolate (n =3) wurden alle der Linie II (Serotyp 1/2a) zugeordnet, welche vorrangig bei Lebensmitteln nachgewiesen wird. Trotz einer dominierenden Detektion von Linie I-*L. monocytogenes*, lassen sich Linie II-*L. monocytogenes* auch bei humanen Listeriosefällen nachweisen. Die drei Isolate konnten drei MLS-Typen sowie drei klonalen Komplexen (ST121/CC121, ST425/CC90 und ST8/CC8) zugeordnet werden. Demnach wurden die Isolate zwar nicht hypervirulenten klonalen Komplexen CC1, CC2, CC4 oder CC6 zugeordnet, dennoch sollte die Detektion eines *L. monocytogenes* ST8-Isolates als kritisch angesehen werden, da dieser Typ mit einem mehrere EU-Mitgliedsstaaten betreffenden Listerioseausbruch assoziiert ist.

Unter den *Salmonella enterica*-Isolate (n = 3), isoliert aus illegal eingeführten Lebensmitteln, konnten zwei den Serovaren *S. Altona* und *S. Uganda* zugeordnet werden. Ein *Salmonella enterica*-Isolat wurde als *S. subsp. I* Rauform klassifiziert. Keines dieser Serovare gehört zu den 20 Serovaren, die in der EU am häufigsten bei humanen Salmonellosefällen dokumentiert sind. *S. Uganda* und *S. Altona* wurden bereits mit lebensmittelassoziierten humanen Salmonellosefällen in Verbindung gebracht. In den legal eingeführten Rindfleischproben konnten keine *Salmonella* spp. nachgewiesen werden.

Aus den insgesamt 100 untersuchten illegal eingeführten Lebensmitteln wurden fünf Proben positiv auf das Vorkommen von ESBL-produzierenden Enterobacterales getestet, wohingegen in den untersuchten 50 legal importierten Rindfleischproben kein Nachweis erfolgte. Unter den ESBL-bildenden Enterobacterales-Isolaten (n = 5) ließen sich vier Isolate als *E. coli* und ein Isolat als *Klebsiella pneumoniae* klassifizieren. Bei allen fünf Isolaten ließ sich mindestens ein ESBL-Gen der CTX-M-1-Gruppe

nachweisen. In der EU werden bei Nutztier-assoziierten ESBL-Bildnern überwiegend *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{TEM-52} und/oder *bla*_{SHV-12} nachgewiesen, wohingegen in den hier untersuchten Isolaten die beiden Letzteren nicht nachzuweisen waren. Interessanterweise ließ sich ein in der EU selten vorkommender SHV-186- β -Laktamase Subtyp nachweisen.

Zusätzlich konnte unter den ESBL-produzierenden *Enterobacterales* eine Vielzahl weiterer Resistenzen gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen festgestellt werden. Unter den 23 isolierten präsumtiv kommensalen *E. coli*-Isolaten, gewonnen aus den illegal importierten Lebensmitteln, ließen sich drei Isolate als multiresistent klassifizieren.

Insgesamt ist von den legal importierten Rindfleischproben in Bezug auf den Nachweis lebensmittelassoziierter Pathogene von keinem erhöhten Risiko im Vergleich zu in der EU produziertem Rindfleisch auszugehen. Dennoch zeigen die erhobenen Daten, dass legal und illegal importierte Lebensmittel als Vektoren für pathogene sowie multiresistente Bakterien dienen können und neu beschriebene bzw. in der EU für gewöhnlich nicht vorkommende Genotypen beherbergen können. Dies sollte insbesondere im Kontext des stetig steigenden globalen Handels sowie des hohen internationalen Reiseaufkommens berücksichtigt werden.

7. Summary

Detection and molecular characterization of pathogenic and antibiotic resistant bacteria isolated from food of animal origin legally and illegally introduced into the European Union

Nicola Susan Rinn

The legal import of food of animal origin from third countries is of great concern for the EU. In particular, large quantities of beef are imported into the EU each year. In addition, products of animal origin were also imported illegally through international travel. To date, data on characteristics of bacterial isolates, recovered from imported products of animal origin, are limited.

In this work, the microbiological status of beef samples (n = 100) legally introduced into the EU and of food products of animal origin illegally imported (n = 100) was evaluated according to the microbiological limit values set by EU and the critical values defined by the German Society for Hygiene and Microbiology (DGHM), respectively.

Of particular interest was the molecular characterization of the bacterial isolates including the detection of resistance determinants and virulence-associated genes. To determine the occurrence of antibiotic resistance, the isolates were subjected to antimicrobial susceptibility testing and were screened for the presence of resistance genes. The aim was to assess the potential impact that products of animal origin introduced into the EU may have on the spread of pathogenic, virulent and/or multiresistant genotypes not commonly occurring in the EU.

Samples were examined for hygienic indicator bacteria (aerobic mesophilic colony count, *Enterobacteriaceae* and *Escherichia coli*) and for the presence of relevant pathogens (Shigatoxin producing *E. coli* (STEC), *Salmonella* spp, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*). In addition, samples were screened for the occurrence of ESBL-/AmpC producing Enterobacterales. The illegally imported food products of animal origin were also investigated for the presence of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) and resistant commensal *E. coli*. In addition, STEC isolates (n = 3), *S. aureus* isolates (n = 11) and *L. monocytogenes* isolates (n = 3) were subjected to whole genome sequencing. Serotyping of *Salmonella enterica* isolates (n = 3) was also performed.

Overall, the hygienic status of the legally imported beef samples and the illegally imported products of animal origin was poor, indicating inadequate refrigeration during transport, contamination during processing, and fecal contamination. Furthermore, three of the 23 *E. coli* isolates obtained from illegally imported foods were classified as multiresistant.

Overall, the prevalence of foodborne pathogens in legally imported beef was low, while illegally imported food of animal origin showed a moderately higher occurrence. Molecular characterization revealed uncommon or newly assigned genotypes and a variety of phenotypic resistance patterns in tested isolates.

Among the STEC isolates, two isolates were obtained from the legally imported beef samples and one isolate was isolated from the illegally imported food of animal origin. Whole genome sequence analysis revealed that isolates belonged to phylogenetic group B1, which is commonly found in animal-adapted lineages. All isolates harbored *stx1* and *stx2* genes, while none were tested positive for the *eae* gene. The isolates were assigned to three different serotypes (O178:H7, B17:H9, and O43:H2), with none of the isolates belonging to serotypes mainly involved in STEC-infections in the EU. In view of the distribution of previously rarely described genotypes, the detection of a B17-STEC in the legally imported beef samples is of particular concern. In addition, several virulence-associated genes such as *iss*, *ehxA*, and *astA* were detected in the isolates, which are associated with increased pathogenicity of STEC.

Among the *S. aureus* isolates, obtained from the illegally imported food products of animal origin (n = 11), a wide heterogeneity of genotypes was detected, while one isolate could be classified as MRSA. Overall, *S. aureus*-isolates belonged to ten different MLS-types and ten different *spa*-types. Among them, two isolates were assigned to ST15 and one isolate was classified as new ST8323. None of the isolates belonged to the livestock-associated clonal complex CC398, which is very frequently detected in the EU, whereas three isolates were assigned to the mastitis-associated CC97, which is increasingly associated with human infections. The remaining isolates belonged to CC1, CC8, and CC15, with one isolate assigned as a singleton. In addition, heat-stable enterotoxin (SE) genes were detected in all *S. aureus* isolates, suggesting that all isolates were enterotoxin producers. Furthermore, all isolates carried at least one virulence gene of the IEC cluster, indicating contamination of human sources of

our samples. Moreover, one isolate carried the toxic shock syndrome toxin 1 (*tsst1*) gene. A total of three isolates were classified as multiresistant.

Listeria monocytogenes isolates (n = 3) obtained from the illegally imported food of animal origin were all assigned to lineage II (serotype 1/2a), which is predominantly detected in food. Despite the predominance of lineage I *L. monocytogenes*, lineage II is also detected in human listeriosis cases. None of the isolates belonged to the hypervirulent clonal complexes CC1, CC2, CC4 or CC6, but to three different MLS-types and three clonal complexes (ST121/CC121, ST425CC90, and ST8/CC8). The detection of the ST8 clone should be taken into account, as ST8-*L. monocytogenes* are associated with a listeriosis outbreak affecting several EU Member States.

Based on serotyping, *Salmonella enterica* isolates (n = 3), recovered from illegally imported products of animal origin, were assigned to three different serovars (*S. Altona*, *S. Uganda*, and *S. subsp. I Rauform*). None of the isolates belonged to the 20 serovars most frequently documented in human salmonellosis cases in the EU. However, *S. Uganda* and *S. Altona* have been associated with human cases of salmonellosis. No *Salmonella* spp. was detected in the legally imported beef samples. Of the 100 illegally imported food of animal origin samples examined, five samples tested positive for the occurrence of ESBL-producing *Enterobacteriaceae*, while none were found in the 50 legally imported beef samples. Among the isolates (n = 5), four isolates were classified as *E. coli* and one was classified as *Klebsiella pneumoniae*. At least one ESBL gene of the CTX-M-1 group was detected in all five isolates. In the EU, *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{TEM-52} or *bla*_{SHV-12} are predominantly found in livestock-associated ESBL producers, however, the latter two were not detected in the isolates tested. Interestingly, a SHV-186- β -lactamase subtype, which is rarely found in the EU, was detected in one isolate.

In addition, among the ESBL-producing *Enterobacteriaceae*, a variety of resistances to antimicrobial agents were detected. Among the 23 presumptive commensal *E. coli* isolates, recovered from illegally imported food, three isolates were classified as multiresistant.

Overall, due to the low detection frequency of foodborne pathogens, no increased risk for consumers is expected from raw beef imported into the EU from third countries compared to beef produced in the EU. In contrast, illegally imported products of animal origin showed a higher prevalence of foodborne pathogens. Nevertheless, obtained data indicate that legally and illegally imported foodstuffs can serve as vectors for

7. Summary

pathogenic and multi-resistant bacteria and can harbor newly described genotypes or genotypes not commonly found in the EU. This should be considered especially in the context of increasing global trade and frequent international travel.

8. Literaturverzeichnis

Al-Holy, M. A.; Al-Nabulsi, A.; Osaili, T. M.; Ayyash, M. M.; Shaker, R. R. (2012): Inactivation of *Listeria innocua* in brined white cheese by a combination of nisin and heat. *Food Control* 23 (1), S. 48–53.

Al-Nabulsi, A. A.; Osaili, T. M.; AbuNaser, R. A.; Olaimat, A.N.; Ayyash, M.; Al-Holy, M. A. et al. (2020): Factors affecting the viability of *Staphylococcus aureus* and production of enterotoxin during processing and storage of white-brined cheese. *Journal of Dairy Science* 103 (8), S. 6869–6881.

Alonso, C. A.; Michael, G. B.; Li, J.; Somalo, S.; Simón, C.; Wang, Y. et al. (2017): Analysis of *blaSHV-12*-carrying *Escherichia coli* clones and plasmids from human, animal and food sources. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 72 (6), S. 1589–1596.

Althaus, D.; Jermini, M.; Giannini, P.; Martinetti, G.; Reinholz, D.; Nüesch-Inderbinen, M. et al. (2017): Local outbreak of *Listeria monocytogenes* serotype 4b sequence type 6 due to contaminated Meat Pâté. *Foodborne Pathogens and Disease* 14 (4), S. 219–222.

Argudín, M. Á.; Mendoza, M. C.; Rodicio, M. R. (2010): Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. *Toxins* 2 (7), S. 1751–1773.

Arslan, S.; Özdemir, F. (2008): Extended spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* strains isolated from homemade white cheeses: prevalence and antibiotic susceptibility. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24 (10), S. 2361–2364.

Asadollahi, P.; Farahani, N. No.; Mirzaii, M.; Khoramrooz, S. S.; van Belkum, A.; Asadollahi, K. et al. (2018): Distribution of the Most Prevalent *spa* types among clinical isolates of Methicillin-resistant and -susceptible *Staphylococcus aureus* around the World: A Review. *Frontiers in Microbiology* 9, S. 163.

Astashkin, E. I.; Alekseeva, E. A.; Borzenkov, V. N.; Kislichkina, A. A.; Mukhina, T. N.; Platonov, M. E. et al. (2021): Molecular-genetic characteristics of polyresistant *Listeria monocytogenes* strains and identification of new sequence types. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*. 36 (4), S. 159–169.

- Aworh, M. K.; Kwaga, J.K. P.; Hendriksen, R. S.; Okolocha, E. C.; Harrell, E.; Thakur, S. (2023): Quinolone-resistant *Escherichia coli* at the interface between humans, poultry and their shared environment - a potential public health risk. *One Health outlook* 5 (1), S. 2.
- Bai, X.; Scheutz, F.; Dahlgren, H M.; Hedenström, I.; Jernberg, C. (2021): Characterization of clinical *Escherichia coli* strains producing a novel Shiga Toxin 2 Subtype in Sweden and Denmark. *Microorganisms* 9 (11), 2374.
- Bai, X.; Zhao, Ailan; L., Ruiting; Xin, Y.; Xie, H.; Meng, Q. et al. (2013): Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in yaks (*Bos grunniens*) from the Qinghai-Tibetan Plateau, China. *PLOS One* 8 (6), e65537.
- Balaban, N.; Rasooly, A. (2000): Staphylococcal enterotoxins. *International Journal of Food Microbiology* 61 (1), S. 1–10.
- Banerjee, R.; Johnston, B.; Lohse, C.; Chattopadhyay, S.; Tchesnokova, V.; Sokurenko, E. V.; Johnson, J. R. (2013): The clonal distribution and diversity of extraintestinal *Escherichia coli* isolates vary according to patient characteristics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 57 (12), S. 5912–5917.
- Barbosa, W. B.; Sofos, J. N.; Schmidt, G. R.; Smith, G. C. (1995): Growth potential of individual strains of *Listeria monocytogenes* in fresh vacuum-packaged refrigerated ground top rounds of beef. *Journal of Food Protection* 58 (4), S. 398–403.
- Bassetti, M.; Peghin, M.; Vena, A.; Giacobbe, D. R. (2019): Treatment of infections due to MDR gram-negative bacteria. *Frontiers in Medicine* 6, S. 74.
- Benito, D.; Gómez, P.; Lozano, C.; Estepa, V.; Gómez-Sanz, E.; Zarazaga, M.; Torres, C. (2014): Genetic lineages, antimicrobial resistance, and virulence in *Staphylococcus aureus* of meat samples in Spain: analysis of immune evasion cluster (IEC) genes. *Foodborne Pathogens and Disease* 11 (5), S. 354–356.
- Benkerroum, N. (2018): Staphylococcal enterotoxins and enterotoxin-like toxins with special reference to dairy products: An overview. *Critical reviews. Food Science and Nutrition* 58 (12), S. 1943–1970.
- Beutlich, J.; Hammerl, J. A.; Appel, B.; Nöckler, K.; Helmuth, R.; Jöst, Kristine et al. (2015): Characterization of illegal food items and identification of foodborne pathogens brought into the European Union via two major German airports. *International Journal of Food Microbiology* 209, S. 13–19.

Bevan, E. R.; Jones, A. M.; Hawkey, P. M. (2017): Global epidemiology of CTX-M β -lactamases: temporal and geographical shifts in genotype. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 72 (8), S. 2145–2155.

Bhatta, D. R.; Cavaco, L. M.; Nath, G.; Kumar, K.; Gaur, A.; Gokhale, S.; Bhatta, D. R. (2016): Association of Panton Valentine Leukocidin (PVL) genes with Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Western Nepal: a matter of concern for community infections (a hospital based prospective study). *BMC Infectious Diseases* 16, S. 199.

Biran, D.; Sura, T.; Otto, A.; Yair, Y.; Becher, D.; Ron, E. Z. (2021): Surviving serum: The *Escherichia coli* *iss* gene of extraintestinal pathogenic *E. coli* is required for the synthesis of group 4 capsule. *Infection and Immunity* 89 (10), e0031621.

BLE (2019): Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung. Bericht zur Markt- und Versorgungslage Fleisch 2019. Bonn, 2019. Online verfügbar unter: https://www.ble.de/SharedDocs/Downloads/DE/BZL/Daten-Berichte/Fleisch/2019BerichtFleisch.pdf?__blob=publicationFile.

BLE (2022): Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung. Bericht zur Markt- und Versorgungslage Fleisch 2022. Bonn, 2022. Online verfügbar unter: https://www.ble.de/SharedDocs/Downloads/DE/BZL/Daten-Berichte/Fleisch/2022BerichtFleisch.pdf;jsessionid=A03E62201EB50F904154206311125F44.internet942?__blob=publicationFile&v=2.

BMWK (2023): Bundesministerium für Wirtschaft und Klimaschutz. Der EU-Binnenmarkt ist der größte gemeinsame Wirtschaftsraum der Welt. Online verfügbar unter: https://www.bmwk.de/Redaktion/DE/Downloads/E/eu-groesster-binnenmarkt-der-welt.pdf?__blob=publicationFile&v=1.

Bok, E.; Mazurek, J.; Myc, A.; Stosik, M.; Wojciech, M.; Baldy-Chudzik, K. (2018): Comparison of commensal *Escherichia coli* isolates from adults and young children in Lubuskie Province, Poland: Virulence potential, phylogeny and antimicrobial resistance. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 15 (4).

Borg, M. A.; Camilleri, L. (2021): What is driving the epidemiology of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in Europe? *Microbial Drug Resistance* 27 (7), S. 889–894.

- Bosilevac, J. M.; Guerini, M. N.; Brichta-Harhay, D. M.; Arthur, T. M.; Koohmaraie, M. (2007): Microbiological characterization of imported and domestic boneless beef trim used for ground beef. *Journal of Food Protection* 70 (2), S. 440–449.
- Bouiller, K.; Hocquet, D.; Sauget, M.; Bertrand, X.; Chirouze, C. (2020): Epidemiology and risk factors of *Staphylococcus aureus* CC398 bone and joint infections. *BMC Infectious Diseases* 20 (1), S. 384.
- Bover-Cid, S.; Miguelez-Arrizado, M. J.; Luz Latorre Moratalla, L.; Vidal Carou, M. C. (2006): Freezing of meat raw materials affects tyramine and diamine accumulation in spontaneously fermented sausages. *Meat Science* 72 (1), S. 62–68.
- Bowen, A. C.; Carapetis, J. R.; Currie, B. J.; Fowler, V.; Chambers, H.F.; Tong, S. Y. C. (2017): Sulfamethoxazole-Trimethoprim (Cotrimoxazole) for skin and soft tissue infections including impetigo, cellulitis, and abscess. *Open Forum Infectious Diseases* 4 (4), S. 232.
- Brown, E.W.; Bell, R.; Zhang, G.; Timme, R.; Zheng, J.; Hammack, T. S.; Allard, M. W. (2021): *Salmonella* genomics in public health and food safety. *EcoSal Plus* 9 (2), eESP00082020.
- Bruce, S. A.; Smith, J. T.; Mydosh, J. L.; Ball, J.; Needle, D. B.; Gibson, R.; Andam, C. P. (2022): Shared antibiotic resistance and virulence genes in *Staphylococcus aureus* from diverse animal hosts. *Scientific Reports* 12 (1), S. 4413.
- Brusa, V.; Restovich, V.; Galli, L.; Teitelbaum, D.; Signorini, M.; Brascesco, H. et al. (2017): Isolation and characterization of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from beef carcasses, cuts and trimmings of abattoirs in Argentina. *PLOS One* 12 (8), e0183248.
- Buchanan, R. L. (2000): Acquisition of microbiological data to enhance food safety. *Journal of Food Protection* 63 (6), S. 832–838.
- Burnett, S. L.; Mertz, E. L.; Bennie, B.; Ford, T.; Starobin, A. (2005): Growth or survival of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat meat products and combination deli salads during refrigerated storage. *Journal of Food Science* 70 (6).
- BVL (2021): Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL). BVL-Report 17.3. Berichte zur Lebensmittelsicherheit Zoonosen-Monitoring 2021. Braunschweig, 2022. Online verfügbar unter: https://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/01_Lebensmittel/04_Zoonosen_Mo

onitoring/Zoonosen_Monitoring_Bericht_2021.pdf?__blob=publicationFile&v=3, zuletzt geprüft am 05.10.2021.

Cabal, A.; Pietzka, A.; Huhulescu, S.; Allerberger, F.; Ruppitsch, W.; Schmid, D. (2019): Isolate-based surveillance of *Listeria monocytogenes* by Whole Genome Sequencing in Austria. *Frontiers in Microbiology* 10, S. 2282.

Cabanes, D.; Sousa, S.; Cebriá, A.; Lecuit, M.; García-del Portillo, F.; Cossart, P. (2005): Gp96 is a receptor for a novel *Listeria monocytogenes* virulence factor, Vip, a surface protein. *The EMBO journal* 24 (15), S. 2827–2838.

Cantinelli, T.; Chenal-Francisque, V.; Diancourt, L.; Frezal, L.; Leclercq, A.; Wirth, T. et al. (2013): „Epidemic clones“ of *Listeria monocytogenes* are widespread and ancient clonal groups. *Journal of Clinical Microbiology* 51 (11), S. 3770–3779.

Cantón, R.; González-Alba, J. M.; Galán, Juan C. (2012): CTX-M Enzymes: Origin and diffusion. *Frontiers in Microbiology* 3, S. 110.

Capita, R.; Felices-Mercado, A.; García-Fernández, C.; Alonso-Calleja, C. (2019): Characterization of *Listeria monocytogenes* originating from the Spanish meat-processing chain. *Foods* 8 (11).

Carlos, C.; Pires, M. M.; Stoppe, N. C.; Hachich, E. M.; Sato, M. I. Z.; Gomes, T. A. T. et al. (2010): *Escherichia coli* phylogenetic group determination and its application in the identification of the major animal source of fecal contamination. *BMC Microbiology* 10, S. 161.

Carrel, M.; Perencevich, E. N.; David, M. Z. (2015): USA300 Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, United States, 2000-2013. *Emerging Infectious Diseases* 21 (11), S. 1973–1980.

Caruso, M.; Fraccalvieri, R.; Pasquali, F.; Santagada, G.; Latorre, L. M.; Difato, L. M. et al. (2020): Antimicrobial susceptibility and multilocus sequence typing of *Listeria monocytogenes* isolated over 11 years from food, humans, and the environment in Italy. *Foodborne Pathogens and Disease* 17 (4), S. 284–294.

Carvalho, P. L. N., Carvalho, P. R., Hofer, E., Reis, C., Veiga, S. (2009). Research about *Listeria* Sp., *Salmonella* Sp. and others contamination indicators to milk's and cheese's samples Sale in the South of Minas Gerais State. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 3(4): 4422-4431, 2009.

- Castañeda-Salazar, R.; Del Pulido-Villamarín, A. P.; Ángel-Rodríguez, G. L.; Zafra-Alba, C. A.; Oliver-Espinosa, O. J. (2021): Isolation and identification of *Salmonella* spp. in raw milk from dairy herds in Colombia. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science* 58, e172805.
- CDC (2023): Center for Disease Control and Prevention. Staphylococcal Food Poisoning. Online verfügbar unter: <https://www.cdc.gov/foodsafety/diseases/staphylococcal.html>.
- CDC (2019a): Center for Disease Control and Prevention. Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2019. Atlanta, GA, Online verfügbar unter: <https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/threats-report/2019-ar-threats-report-508.pdf>.
- CDC (2019b): Centers for Disease Control and Prevention. Outbreak of *Salmonella* infections linked to cavi brand whole, fresh papayas. Juni, 2019. Online verfügbar unter: <https://www.cdc.gov/salmonella/uganda-06-19/index.html>.
- Ceballos, S.; Lozano, C.; Aspiroz, C.; Ruiz-Ripa, L.; Eguizábal, P.; Campaña-Burguet, A. et al. (2022): Beyond CC398: Characterisation of other Tetracycline and Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* genetic lineages circulating in Spanish hospitals. *Pathogens* 11 (3), S. 307. DOI: 10.3390/pathogens11030307.
- Ceccarelli, D.; Kant, A.; van Essen-Zandbergen, A.; Dierikx, C.; Hordijk, J.; Wit, B. et al. (2019): Diversity of plasmids and genes encoding resistance to Extended spectrum Cephalosporins in commensal *Escherichia coli* from Dutch livestock in 2007-2017. *Frontiers in Microbiology* 10, S. 76.
- Cervený, J., Meyer, J.D., Hall, P.A. (2009). Microbiological spoilage of meat and poultry products. *Food Microbiology and Food Safety*.
- Çetin; Becker, A.; Abdulmawjood, A. (2018): Microbiological quality assessment of meat and dairy products from small-scale factories in european side of Turkey. *Journal of Food Safety and Food Quality*. 2018, 69(1), 14–18.
- Chadi., Z. D.; Arcangioli, M.-A. (2023): Pulsed-Field Gel Electrophoresis analysis of bovine associated *Staphylococcus aureus*: A Review. *Pathogens* 12 (7).
- Chatellier, V. (2021): Review: International trade in animal products and the place of the European Union: main trends over the last 20 years. *Animal* 15, 1, S. 100289.

- Chelaghma, W.; Loucif, L.; Bendjama, E.; Cherak, Z.; Bendahou, M.; Rolain, J.-M. (2022): Occurrence of Extended spectrum Cephalosporin-, Carbapenem- and Colistin-resistant gram-negative bacteria in fresh vegetables, an increasing human health concern in Algeria. *Antibiotics* 11 (8), S. 988.
- Chen, Y.; Luo, Y.; Curry, P.; Timme, R.; Melka, D.; Doyle, M. et al. (2017): Assessing the genome level diversity of *Listeria monocytogenes* from contaminated ice cream and environmental samples linked to a listeriosis outbreak in the United States. *PLOS One* 12 (2), e0171389.
- Chenal-Francisque, V.; Lopez, J.; Cantinelli, T.; Caro, V.; Tran, C.; Leclercq, A. et al. (2011): Worldwide distribution of major clones of *Listeria monocytogenes*. *Emerging Infectious Diseases* 17 (6), S. 1110–1112.
- Ciolacu, L.; Stessl, B.; Bolocan, A. S.; Oniciuc, E. A.; Wagner, M.; Rychli, K.; Nicolau, A. I. (2016): Tracking foodborne pathogenic bacteria in raw and ready-to-eat food illegally sold at the Eastern EU Border. *Foodborne Pathogens and Disease* 13 (3), S. 148–155.
- Clermont, O.; Bonacorsi, S.; Bingen, E. (2000): Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Applied and Environmental Microbiology* 66 (10), S. 4555–4558.
- Clermont, O.; Christenson, J. K.; Denamur, E.; Gordon, D. M. (2013): The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environmental Microbiology Reports* 5 (1), S. 58–65.
- CLSI (2020). Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests. CLSI M100, 30th edition. Wayne, PA.
- Colello, R.; Krüger, A.; Velez, M. V.; Del Canto, F.; Etcheverría, A. I.; Vidal, R.; Padola, N. L. (2019): Identification and detection of iha subtypes in LEE-negative Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains isolated from humans, cattle and food. *Heliyon* 5 (12), e03015.
- Comery, R.; Thanabalasuriar, A.; Garneau, P.; Portt, A.; Boerlin, P.; Reid-Smith, R. J. et al. (2013): Identification of potentially diarrheagenic atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains present in Canadian food animals at slaughter and in retail meats. *Applied and Environmental Microbiology* 79 (12), S. 3892–3896.

- Cotter, P. D.; Draper, L. A.; Lawton, E. M.; Daly, K. M.; Groeger, D. S.; Casey, P. G. et al. (2008): Listeriolysin S, a novel peptide haemolysin associated with a subset of lineage I *Listeria monocytogenes*. PLOS Pathogens 4 (9), e1000144.
- Crago, B.; Ferrato, C.; Drews, S. J.; Svenson, L. W.; Tyrrell, G.; Louie, M. (2012): Prevalence of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) in food samples associated with foodborne illness in Alberta, Canada from 2007 to 2010. Food Microbiology 32 (1), S. 202–205.
- Cunningham, S. A.; Chia, N.; Jeraldo, P. R.; Quest, D. J.; Johnson, J. A.; Boxrud, D. J. et al. (2017): Comparison of Whole-Genome Sequencing methods for analysis of three Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* outbreaks. Journal of Clinical Microbiology 55 (6), S. 1946–1953.
- Dabasso, B. G.; Makokha, A. O.; Onyango, A. N.; Mathara, J. M.; Badake, Q. D. (2021): Effect of temperature, storage containers and improved hygiene on microbial safety and chemical quality of traditional ceat products. European Journal of Agriculture and Food Science 3 (4), S. 71–77.
- David, M. Z.; Daum, R. S. (2010): Community-associated Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic. Clinical microbiology reviews 23 (3), S. 616–687.
- Davis, M. A.; Besser, T. E.; Orfe, L. H.; Baker, K.N. K.; Lanier, A. S.; Broschat, S. L. et al. (2011): Genotypic-phenotypic discrepancies between antibiotic resistance characteristics of *Escherichia coli* isolates from calves in management settings with high and low antibiotic use. Applied and Environmental Microbiology 77 (10), S. 3293–3299.
- DeLeo, F. R.; Chambers, H. F. (2009): Reemergence of antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* in the genomics era. The Journal of Clinical Investigation 119 (9), S. 2464–2474.
- Denisuik, A. J.; L.-W., Philippe R. S.; Pitout, J. D.; Mulvey, M. R.; Simner, P. J.; Taylor, F. et al. (2013): Molecular epidemiology of extended-spectrum β -lactamase-, AmpC β -lactamase- and carbapenemase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from Canadian hospitals over a 5 year period: CANWARD 2007-11. The Journal of antimicrobial chemotherapy 68 Suppl 1, S. 57-65.

DGHM (2021): Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie. Empfehlungen für Richt- und Warnwerte. Fleisch (roh). Online verfügbar unter: <https://www.dghm-richt-warnwerte.de/de/dokumente/fleisch-roh>.

DGHM (2023): Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie. Einleitung. Online verfügbar unter: <https://www.dghm-richt-warnwerte.de/de/einleitung>.

DGHM (2018): Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie. Präambel. Online verfügbar unter: <https://www.dghm-richt-warnwerte.de/de/praeambel>.

Díaz-Jiménez, D.; García-Meniño, I.; Fernández, J.; García, V.; Mora, A. (2020): Chicken and turkey meat: Consumer exposure to multidrug-resistant *Enterobacteriaceae* including mcr-carriers, uropathogenic *E. coli* and high-risk lineages such as ST131. *International Journal of Food Microbiology* 331, S. 108750.

Diep, B.; Perdreau-Remington, F.; Sensabaugh, G. F. (2003): Clonal characterization of *Staphylococcus aureus* by multilocus restriction fragment typing, a rapid screening approach for molecular epidemiology. *Journal of Clinical Microbiology* 41 (10), S. 4559–4564.

Do Nascimento, V.; Day, M. R.; Doumith, M. Hopkins, K. L.; Woodford, N.; Godbole, G.; Jenkins, C. (2017): Comparison of phenotypic and WGS-derived antimicrobial resistance profiles of enteroaggregative *Escherichia coli* isolated from cases of diarrhoeal disease in England, 2015-16. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 72 (12), S. 3288–3297.

Dobrindt, U. (2005): (Patho-)Genomics of *Escherichia coli*. *International Journal of Medical Microbiology*. 295 (6-7), S. 357–371.

Donnenberg, M. S.; Tzipori, S.; McKee, M. L.; O'Brien, A. D.; Alroy, J.; Kaper, J. B. (1993): The role of the *eae* gene of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in intimate attachment in vitro and in a porcine model. *The Journal of Clinical Investigation* 92 (3), S. 1418–1424.

Doumith, M.; Day, M.; Ciesielczuk, H.; Hope, R.; Underwood, A.; Reynolds, R. et al. (2015): Rapid identification of major *Escherichia coli* sequence types causing urinary tract and bloodstream infections. *Journal of Clinical Microbiology* 53 (1), S. 160–166.

Dulguer, M. V.; Fabbriotti, S. H.; Bando, S. Y.; Moreira-Filho, C. A.; Fagundes-Neto, U.; Scaletsky, I.C. A. (2003): Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains: phenotypic and genetic profiling reveals a strong association between

enteroaggregative *E. coli* heat-stable enterotoxin and diarrhea. The Journal of Infectious Diseases 188 (11), S. 1685–1694.

EC (2021): European Commission. Trade History Beef EN. Online verfügbar unter: https://agriculture.ec.europa.eu/system/files/2021-07/trade-history-beef_en_0.pdf. Eingesehen am 02.05.2023.

EC (2021a): European Commission. EU baut Führung im weltweiten Agrar- und Lebensmittelhandel aus. Online verfügbar unter: https://ec.europa.eu/commission/presscorner/detail/de/IP_21_4584.

EC (2021b): European Commission. The Rapid Alert System for Food and Feed Annual Report 2020. Online verfügbar unter: https://food.ec.europa.eu/safety/acn/reports-and-publications_en.

EC (2023): European Commission. Beef Trade. Online verfügbar unter: <https://agridata.ec.europa.eu/extensions/DashboardBeef/BeefTrade.html>. Eingesehen am 01.05.2023.

EC (2023d): European Commission. Beef & Veal market situation. Online verfügbar unter: https://agriculture.ec.europa.eu/system/files/2023-10/beef-veal-market-situation_en.pdf, Eingesehen am 01.05.2023.

EC (2023e): European Commission. Agri-food trade statistical factsheet. European Union - Extra EU27. Online verfügbar unter: https://agriculture.ec.europa.eu/system/files/2023-05/agrifood-extra-eu27_en.pdf. Eingesehen am 01.05.2023.

ECDC (2022): European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2022-2020 data. Online verfügbar unter: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/antimicrobial-resistance-surveillance-europe-2022-2020-data>.

ECDC (2023): Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2023. Online verfügbar unter <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/Antimicrobial%20resistance%20surveillance%20in%20Europe%202023%20-%202021%20data.pdf>.

ECDC und EFSA (2019): European Centre for Disease Prevention and Control, European Food Safety Authority. Multi-country outbreak of *Listeria monocytogenes*

sequence type 6 infections linked to ready-to-eat products. Online verfügbar unter: <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/sp.efsa.2019.EN-1745>.

EFSA (2011): European Food Safety Authority. Scientific Opinion on the public health risks of bacterial strains producing extended-spectrum β -lactamases and/or AmpC β -lactamases in food and food-producing animals. EFSA Journal 9 (8), S. 2322.

EFSA (2018a): Multi-country outbreak of *Listeria monocytogenes* sequence type 8 infections linked to consumption of salmon products. EFS3, 15 (10).

EFSA (2018b): *Listeria monocytogenes* contamination of ready-to-eat foods and the risk for human health in the EU, 24.01.2018. Online verfügbar unter <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/5134>, Eingesehen am 10.05.2023.

EFSA (2022a): The European Union One Health 2021 Zoonoses Report. EFSA journal. European Food Safety Authority 20 (12), e07666.

EFSA (2022b): European Food Safety Authority. The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2019–2020. Online verfügbar: <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/7209>, Eingesehen am 10.05.2023.

EFSA (2022c): European Food Safety Authority. Guidelines for reporting Whole Genome Sequencing-based typing data through the EFSA One Health WGS System. Online verfügbar unter: <https://www.efsa.europa.eu/en/supporting/pub/en-7413>, 29.06.2022, Eingesehen am 10.05.2023.

EFSA (2019a): Multi-country outbreak of *Listeria monocytogenes* sequence type 6 infections linked to ready-to-eat meat products – 25 November 2019. EFS3 16 (12).

EFSA (2019b): Multi-country outbreak of *Listeria monocytogenes* clonal complex 8 infections linked to consumption of cold-smoked fish products. EFS3 16 (6), 1665E.

EFSA (2020): EFSA BIOHAZ Panel (EFSA Panel on Biological Hazards), Koutsoumanis K.; Allende A.; Alvarez-Ordóñez A.; Bover-Cid S.; Chemaly M.; Davies R.; De Cesare, A.; Herman, L.; Hilbert, F.; Lindqvist R.; Nauta, M.; Peixe, L.; Ru, G.; Simmons, M.; Skandamis, P.; Suffredini, E.; Jenkins, C.; Monteiro, P. S.; Morabito, S.; Niskanen, T.; Scheut, F., da Silva, F. M.T, Messens, W. und Bolton, D. Pathogenicity assessment of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and the

- public health risk posed by contamination of food with STEC. *EFSA Journal* 2020;18(1). e05967.
- EFSA (2021): European Food Safety Authority. Update on Salmonella in the EU, based on EU One Health 2019 Zoonoses report. Heruntergeladen am 20.04.2023: <https://www.eurilsalmonella.eu/sites/default/files/2021-05/2%20Frank%20EUOHZ%202019%20EFSA.pdf>.
- EFSA (2023): The European Union One Health 2022 Zoonoses Report. *EFS2 21* (12), e8442.
- EFSA (2024): The European Union One Health 2023 Zoonoses report. *EFS2 22* (12), e9106.
- EFSA (2024a): The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2021-2022. *EFS2 22* (2), e8583.
- EFSA und ECDC (2023): The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2020/2021. *EFS2 21* (3), e07867.
- Egervärn, M.; Börjesson, S.; Byfors, S.; Finn, M.; Kaipe, C.; Englund, S.; Lindblad, M. (2014): *Escherichia coli* with extended-spectrum beta-lactamases or transferable AmpC beta-lactamases and *Salmonella* on meat imported into Sweden. *International Journal of Food Microbiology* 171, S. 8–14.
- Eissa, F.; Alfifi, A.; Saad, A. M.; SaadEldin, W. F.; Baz, H. A.; Darwish, W. S. (2025): Analysis of the hazards associated with poultry meat and its products using European rapid alert system for food and feed notifications from 2000 to 2022. *Open Veterinary Journal* 15 (2), S. 983–993.
- Eklund, M.; Leino, K.; Siitonen, A. (2002): Clinical *Escherichia coli* strains carrying stx genes: stx variants and stx-positive virulence profiles. *Journal of Clinical Microbiology* 40 (12), S. 4585–4593.
- Ellington, M.J.; Yearwood, Lianne; Ganner, Mark; East, Claire; Kearns, Angela M. (2008): Distribution of the ACME-arcA gene among Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from England and Wales. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 61 (1), S. 73–77.

- Enright, M. C.; Day, N. P.; Davies, C. E.; Peacock, S. J.; Spratt, B. G. (2000): Multilocus sequence typing for characterization of Methicillin-resistant and Methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology* 38 (3), S. 1008–1015.
- Esteve-Palau, E.; Solande, G.; Sánchez, F.; Sorlí, L.; Montero, M.; Güerri, R. et al. (2015): Clinical and economic impact of urinary tract infections caused by ESBL-producing *Escherichia coli* requiring hospitalization: A matched cohort study. *The Journal of Infection* 71 (6), S. 667–674.
- Etcheverría, A. I.; Padola, N. L.; Sanz, M. E.; Polifroni, R.; Krüger, A.; Passucci, J. et al. (2010): Occurrence of Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) on carcasses and retail beef cuts in the marketing chain of beef in Argentina. *Meat Science* 86 (2), S. 418–421.
- Etter, Andrea J.; West, Alyssa M.; Burnett, John L.; Wu, Sophie Tongyu; Veenhuizen, Deklin R.; Ogas, Raeya A.; Oliver, Haley F. (2019): *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Serovar Heidelberg food isolates associated with a salmonellosis outbreak have enhanced stress tolerance capabilities. *Applied and Environmental Microbiology* 85 (16).
- EURL (2021): European Union Reference Laboratory for *Listeria monocytogenes*. Lm technical guidance document on challenge tests and durability studies for assessing shelf-life of ready-to-eat foods related to *Listeria monocytogenes*. Online verfügbar unter: https://food.ec.europa.eu/system/files/2021-07/biosafety_fh_mc_tech-guide-doc_listeria-in-rte-foods_en_0.pdf.
- Falgenhauer, L.; Waezsada, S.-E.; Gwozdinski, K.; Ghosh, H.; Doijad, S.; Bunk, B. et al. (2016): Chromosomal Locations of *mcr-1* and *bla* CTX-M-15 in Fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* ST410. *Emerging Infectious Disease* 22 (9), S. 1689–1691.
- Falk, H.; Dürr, S.; Hauser, R.; Wood, K.; Tenger, B.; Lörtscher, M.; Schüpbach-Regula, G. (2013): Illegal import of bushmeat and other meat products into Switzerland on commercial passenger flights. *Revue Scientifique et Technique* 32 (3), S. 727–739.
- FAO und WHO (2018): Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization. ShigaToxin-producing *Escherichia Coli* (STEC) and food:

Attribution, characterization and monitoring. Online verfügbar unter:

<https://www.fao.org/documents/card/en/c/CA0032EN>.

Faria, N. A.; Miragaia, M.; Lencastre, H. d. (2013): Massive dissemination of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in bloodstream infections in a high MRSA prevalence country: Establishment and diversification of EMRSA-15. *Microbial Drug Resistance* 19 (6), S. 483–490.

Félix, B.; Feurer, C.; Maillet, A.; Guillier, L. t; Boscher, E.; Kerouanton, A. et al. (2018): Population Genetic Structure of *Listeria monocytogenes* strains isolated from the pig and pork production chain in France. *Frontiers in Microbiology* 9, S. 684.

Fessler, A. T.; Kadlec, K.; Hassel, M.; Hauschild, T.; Eidam, C.; Ehricht, R. et al. (2011): Characterization of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from food and food products of poultry origin in Germany. *Applied and Environmental Microbiology* 77 (20), S. 7151–7157.

Fluit, A. C. (2012): Livestock-associated *Staphylococcus aureus*. *Clinical microbiology and infection: The official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 18 (8), S. 735–744.

Forshey, D. V.M.; Beverly A. Byrum, D. V.M.; Kimberly D. Machesky, M. P.H.; C. Stephen Roney, DVM, Thomas M. Gomez, DVM; Jennifer R. Mitchell, M. P.H.; Casey Barton Behravesh, DVM, Leslie B. Hausman, MPH; Katherine A. O'Connor, M. P.H. (2012): Notes From the Field: Multistate Outbreak of *Salmonella* Altona and Johannesburg Infections Linked to Chicks and Ducklings From a Mail-Order Hatchery. *Medscape*. Online verfügbar unter <https://www.medscape.com/viewarticle/761200?form=fpf>

Franco, A.; Hasman, H.; Iurescia, M.; Lorenzetti, R.; Stegger, M.; Pantosti, A. et al. (2011): Molecular characterization of *spa* type t127, sequence type 1 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from pigs. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 66 (6), S. 1231–1235.

Gagliotti, C.; Högberg, L. Diaz; Billström, H.; Eckmanns, T.; Giske, C. G.; Heuer, Ole E. et al. (2021): *Staphylococcus aureus* bloodstream infections: diverging trends of Methicillin-resistant and Methicillin-susceptible isolates, EU/EEA, 2005 to 2018. *Eurosurveillance* 26 (46).

Ghafir, Y.; China, B.; Dierick, K.; Zutter, L. de; Daube, G. (2008): Hygiene indicator microorganisms for selected pathogens on beef, pork, and poultry meats in Belgium. *Journal of Food Protection* 71 (1), S. 35–45.

Gillesberg Lassen, S.; Ethelberg, S.; Björkman, J. T.; Jensen, T.; Sørensen, G.; Kvistholm Jensen, A. et al. (2016): Two listeria outbreaks caused by smoked fish consumption-using whole-genome sequencing for outbreak investigations. *Clinical microbiology and infection: The official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 22 (7), S. 620–624.

Glass, K. A.; Doyle, M. P. (1989): Fate of *Listeria monocytogenes* in processed meat products during refrigerated storage. *Applied and Environmental Microbiology* 55 (6), S. 1565–1569.

Goering, R. V.; Larsen, A. R.; Skov, R.; Tenover, F. C.; Anderson, K. L.; Dunman, P. M. (2009): Comparative genomic analysis of European and Middle Eastern community-associated Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CC80:ST80-IV) isolates by high-density microarray. *Clinical microbiology and infection: The official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 15 (8), S. 748–755.

González-Gutiérrez, M.; García-Fernández, C.; Alonso-Calleja, C.; Capita, R. (2020): Microbial load and antibiotic resistance in raw beef preparations from northwest Spain. *Food Science and Nutrition* 8 (2), S. 777–785.

González-Machado, C.; Alonso-Calleja, C.; Capita, R. (2024): Prevalence and types of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in meat and meat products from retail outlets and in samples of animal origin collected in farms, slaughterhouses and meat processing facilities. A review. *Food Microbiology* 123, S. 104580.

Gözel, B.; Monney, C.; Aguilar-Bultet, L.; Rupp, S.; Frey, J.; Oevermann, A. (2019): Hyperinvasiveness of *Listeria monocytogenes* sequence type 1 is independent of lineage I-specific genes encoding internalin-like proteins. *MicrobiologyOpen* 8 (7), e00790.

Grau, F. H.; Vanderlinde, P. B. (1990): Growth of *Listeria monocytogenes* on vacuum-packaged beef. *Journal of Food Protection* 53 (9), S. 739–741.

Gray, J. A.; Chandry, P. S.; Kaur, M.; Kocharunchitt, C.; Bowman, J. P.; Fox, E. M. (2021): Characterisation of *Listeria monocytogenes* food-associated isolates to

assess environmental fitness and virulence potential. *International Journal of Food Microbiology* 350, S. 109247.

Gray, M. J.; Zadoks, R. N.; Fortes, E.D.; Dogan, B.; Cai, S.; Chen, Y. et al. (2004): *Listeria monocytogenes* isolates from foods and humans form distinct but overlapping populations. *Applied and Environmental Microbiology* 70 (10), S. 5833–5841.

Grimont (2008): *Antigenic Formulae of the Salmonella serovars*, (9th ed.) Paris: WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. Online verfügbar unter https://www.academia.edu/20495783/Antigenic_Formulae_of_the_Salmonella_serovars_9th_ed_Paris_WHO_Collaborating_Centre_for_Reference_and_Research_on_Salmonella.

Grundmann, H.; Aanensen, D. M.; van den Wijngaard, C.C.; Spratt, B. G.; Harmsen, D.; Friedrich, A. W. (2010): Geographic distribution of *Staphylococcus aureus* causing invasive infections in Europe: a molecular-epidemiological analysis. *PLOS Medicine* 7 (1), e1000215.

Guidi, F.; Chiaverini, A.; Repetto, A.; Lorenzetti, C.; Centorotola, G.; Bazzucchi, V. et al. (2021): Hyper-Virulent *Listeria monocytogenes* Strains associated with respiratory infections in central Italy. *Frontiers in Cellular and Infectious Microbiology* 11, S. 765540.

Guillard, T.; Jong, A. de; Limelette, A.; Lebreil, A. L.; Madoux, J.; Champs, C. de (2016): Characterization of quinolone resistance mechanisms in *Enterobacteriaceae* recovered from diseased companion animals in Europe. *Veterinary Microbiology* 194, S. 23–29.

Gundogan, N.; Avci, E. (2014): Occurrence and antibiotic resistance of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus* in raw milk and dairy products in Turkey. *International Journal of Dairy Technology* 67 (4), S. 562–569.

Gyles, C. L. (2007): Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: An overview. *Journal of Animal Science* 85 (13 Suppl), E45-62.

Halbedel, S.; Wilking, H.; Holzer, A.; Kleta, S.; Fischer, M. A.; Lüth, S. et al. (2020): Large nationwide outbreak of invasive Listeriosis associated with blood sausage, Germany, 2018-2019. *Emerging Infectious Diseases* 26 (7), S. 1456–1464.

- Halkman, H.B.D.; Halkman, A. K. (2014): Indicator Organisms. Carl A. Batt und Mary Lou Tortorello (Hg.): Encyclopedia of Food microbiology. 2nd edition. S. 358–363.
- Handley, J. A.; Hanning, I.; Ricke, S. C.; Johnson, M. G.; Jones, F. T.; Apple, R. O. (2010): Temperature and bacterial profile of post chill poultry carcasses stored in processing combo held at room temperature. Journal of Food Science 75 (8), S. 515-20.
- Hasman et. al (2015): Laboratory protocol: Isolation of ESBL-, AmpC- and carbapenemase-producing *E. coli* from fresh meat. National Food Institute, Lyngby, Denmark. Online verfügbar unter: https://www.eurl-ar.eu/CustomerData/Files/Folders/21-protocols/529_esbl-ampc-cpeprotocol-version-meat-v7-09-12-19.pdf.
- Hau, S. J.; Sun, J.; Davies, P. R.; Frana, T. S.; Nicholson, T. L. (2015): Comparative prevalence of Immune Evasion complex genes associated with β -hemolysin converting bacteriophages in MRSA ST5 isolates from swine, swine facilities, humans with swine contact, and humans with no swine contact. PLOS One 10 (11), e0142832.
- Haubert, L.; Mendonça, M.; Lopes, G. V.; Itapema Cardoso, M. R. de; da Silva, W. P. (2016): *Listeria monocytogenes* isolates from food and food environment harbouring *tetM* and *ermB* resistance genes. Letters in Applied Microbiology 62 (1), S. 23–29.
- Hedberg, C. W.; Savarino, S. J.; Besser, J. M.; Paulus, C. J.; Thelen, V. M.; Myers, L. J. et al. (1997): An outbreak of foodborne illness caused by *Escherichia coli* O39:NM, an agent not fitting into the existing scheme for classifying diarrheogenic *E. coli*. The Journal of Infectious Diseases 176 (6), S. 1625–1628.
- Hennekinne, J.-A.; Ostyn, Annick; G., F.; Herbin, S.; Pruger, A.-L.; Dragacci, S. (2010): How should staphylococcal food poisoning outbreaks be characterized? Toxins 2 (8), S. 2106–2116.
- Henri, C.; Félix, B.; Guillier, L.; Leekitcharoenphon, P.; Michelon, D.; Mariet, J.-F. et al. (2016): Population genetic structure of *Listeria monocytogenes* strains as determined by Pulsed-Field Gel Electrophoresis and Multilocus Sequence Typing. Applied and Environmental Microbiology 82 (18), S. 5720–5728.

- Hernandes, R. T.; Elias, W. P.; Vieira, M. A. M.; Gomes, T. A. T. (2009): An overview of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. FEMS Microbiology Letters 297 (2), S. 137–149.
- Herzer, P. J.; Inouye, S.; Inouye, M.; Whittam, T. S. (1990): Phylogenetic distribution of branched RNA-linked multicopy single-stranded DNA among natural isolates of *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology 172 (11), S. 6175–6181.
- Higgins, J.; Hohn, C.; Hornor, S.; Frana, M.; Denver, M.; Joerger, R. (2007): Genotyping of *Escherichia coli* from environmental and animal samples. Journal of Microbiological Methods 70 (2), S. 227–235.
- Hoekstra, J.; Zomer, A. L.; Rutten, V. P. M. G.; Benedictus, L.; Stegeman, A.; Spaninks, M. P. et al. (2020): Genomic analysis of European bovine *Staphylococcus aureus* from clinical versus subclinical mastitis. Scientific Reports 10 (1), S. 18172.
- Hopkins, K. L.; Davies, R. H.; Threlfall, E. J. (2005): Mechanisms of quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella*: recent developments. International Journal of Antimicrobial Agents 25 (5), S. 358–373.
- Hua, Y.; Bai, X.; Zhang, J.; Jernberg, C.; Chromek, M.; Hansson, S. et al. (2020): Molecular characteristics of eae-positive clinical Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Sweden. Emerging Microbes and Infections 9 (1), S. 2562–2570.
- Hua, Y.; Chromek, M.; Frykman, A.; Jernberg, C.; Georgieva, V.; Hansson, S. et al. (2021a): Whole-genome characterization of hemolytic uremic syndrome-causing Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Sweden. Virulence 12 (1), S. 1296–1305.
- Hua, Y.; Zhang, J.; Jernberg, C.; Chromek, M.; Hansson, S.; Frykman, A. et al. (2021b): Molecular Characterization of the Enterohemolysin Gene (*ehxA*) in Clinical Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolates. Toxins 13 (1):.
- ICAO (2021): International Civil Aviation Organization. The World of Air Transport in 2019. Online verfügbar unter: <https://www.icao.int/sustainability/WorldofAirTransport/Pages/the-world-of-air-transport-in-2021.aspx>.
- Irrgang, A.; Hammerl, J. A.; Falgenhauer, L.; Guiral, E.; Schmogger, S.; Imirzalioglu, Can et al. (2018): Diversity of CTX-M-1-producing *E. coli* from German food samples and genetic diversity of the *bla*_{CTX-M-1} region on IncI1 ST3 plasmids. Veterinary Microbiology 221, S. 98–104.

- Jaja, I. F.; Green, E.; Muchenje, V. (2018): Aerobic Mesophilic, coliform, *Escherichia coli*, and *Staphylococcus aureus* counts of raw meat from the formal and informal meat sectors in South Africa. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 15 (4).
- Jansen, W.; Grabowski, N.; Gerulat, B.; Klein, G. (2016): Food Safety Hazards and microbiological zoonoses in European meat imports detected in border inspection in the period 2008-2013. *Zoonoses and Public Health* 63 (1), S. 53–61.
- Jansen, W.; Müller, A.; Grabowski, N. T.; Kehrenberg, C.; Muylkens, B.; Al Dahouk, S. (2019): Foodborne diseases do not respect borders: Zoonotic pathogens and antimicrobial resistant bacteria in food products of animal origin illegally imported into the European Union. *Veterinary Journal* (1997) 244, S. 75–82.
- Jansen, W.; Woudstra, S.; Müller, A.; Grabowski, N.; Schoo, G.; Gerulat, B. et al. (2018): The safety and quality of pork and poultry meat imports for the common European market received at border inspection post Hamburg Harbour between 2014 and 2015. *PLoS One* 13 (2), e0192550.
- Jauregui, F.; Landraud, L.; Passet, V.; Diancourt, L.; Frapy, Eric; G., Ghislaine et al. (2008): Phylogenetic and genomic diversity of human bacteremic *Escherichia coli* strains. *BMC Genomics* 9, S. 560.
- Jazmati, N.; Hein, R.; Hamprecht, A. (2016): Use of an Enrichment Broth Improves Detection of Extended-Spectrum-Beta-Lactamase-Producing *Enterobacteriaceae* in Clinical Stool Samples. *Journal of Clinical Microbiology* 54 (2), S. 467–470.
- Johura, F.-T.; Parveen, Rozina; I., Atiqul; S., Abdus; R., Md Niaz; M., Shirajum et al. (2016): Occurrence of hybrid *Escherichia coli* strains carrying Shiga Toxin and heat-stable toxin in livestock of Bangladesh. *Frontiers in Public Health* 4, S. 287.
- Jones, G. S.; D’Orazio, S. E. F. (2013): *Listeria monocytogenes*: cultivation and laboratory maintenance. *Current Protocols in Microbiology* 31, 9B.2.1-9B.2.7.
- Jones, R. C.; Reddy, V.; Kornstein, L.; Fernandez, J. R.; Stavinsky, F.; Agasan, A.; Gerber, S. I. (2004): *Salmonella enterica* serotype Uganda infection in New York City and Chicago. *Emerging Infectious Diseases* 10 (9), S. 1665–1667.
- Juneja, V. K. (2007): Thermal inactivation of *Salmonella* spp. in ground chicken breast or thigh meat. *International Journal of Food Science Technology* 42 (12), S. 1443–1448.

Jurado, C.; Paternoster, G.; Martínez-López, B.; Burton, K.; Mur, L. (2019): Could African swine fever and classical swine fever viruses enter into the United States via swine products carried in air passengers' luggage? *Transboundary and Emerging Diseases* 66 (1), S. 166–180.

Kadariya, J. Smith, T.C.; Thapaliya, D. (2014): *Staphylococcus aureus* and staphylococcal food-borne disease: an ongoing challenge in public health. *BioMed Research International* 2014, S. 827965.

Kanki, M.; Seto, K.; Harada, T.; Yonogi, S.; Kumeda, Y. (2011): Comparison of four enrichment broths for the detection of non-O157 Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* O91, O103, O111, O119, O121, O145 and O165 from pure culture and food samples. *Letters in Applied Microbiology* 53 (2), S. 167–173.

Karmali, M. A. (2004): Infection by Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. *Molecular biotechnology* 26 (2), S. 117–122.

Kathariou, S. (2002): *Listeria monocytogenes* virulence and pathogenicity, a food safety perspective. *Journal of Food Protection* 65 (11), S. 1811–1829.

Khairullah, A R.; Sudjarwo, S. A.; Effendi, M. H.; Ramandinianto, S. C.; Gelolodo, M. A.; Widodo, Ag. et al. (2022): Review of pork and pork products as a source for transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *International Journal of One Health*, 8 (2), S. 167–177.

Kinross, P.; Petersen, A.; Skov, R.; van Hauwermeiren, E.; Pantosti, A.; Laurent, F. et al. (2017): Livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) among human MRSA isolates, European Union/European Economic Area countries, 2013. *Euro surveillance: European Communicable Disease Bulletin* 22 (44).

Knabel, S. J.; Reimer, Aleisha; Vergheese, Bindhu; Lok, Mei; Ziegler, Jennifer; Farber, Jeffrey et al. (2012): Sequence typing confirms that a predominant *Listeria monocytogenes* clone caused human listeriosis cases and outbreaks in Canada from 1988 to 2010. *Journal of Clinical Microbiology* 50 (5), S. 1748–1751.

Kononiuk et. al. 2017: Meat and meat products – analysis of the most common threats in the years 2011-2015 in Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF). *Roczniki Panstwowego Zakladu Higieny* 68 (3), S. 289–296.

- Kraker, M. E. A. de; Wolkewitz, M.; Davey, Peter G.; Koller, Walter; Berger, Jutta; Nagler, Jan et al. (2011): Clinical impact of antimicrobial resistance in European hospitals: excess mortality and length of hospital stay related to Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bloodstream infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55 (4), S. 1598–1605.
- Kreyenschmidt et. al. (2003): Kreyenschmidt, J., Peters, N., Petersen B., Kunz, B.: Erprobung eines Temperatur-Zeit-Indikators im Rahmen von HACCP-Konzepten bei der Verpackung, Lagerung und dem Transport von Frischprodukten. Landwirtschaftliche Fakultät der Universität Bonn, Schriftenreihe des Lehr- und Forschungsschwerpunktes USL. Online verfügbar unter https://bonndoc.ulb.uni-bonn.de/xmlui/bitstream/handle/20.500.11811/1199/USL_Forschungsbericht_106.pdf?sequence=1.
- Krupa, P.; Bystroń, J.; Bania, J.; Podkowik, M.; Empel, J.; Mroczkowska, A. (2014): Genotypes and oxacillin resistance of *Staphylococcus aureus* from chicken and chicken meat in Poland. *Poultry Science* 93 (12), S. 3179–3186.
- Kürekci, Cemil; Arkadaş, Müge; Avşar, Yahya Kemal (2016): Occurrence, genetic characterization and antimicrobial resistance of extended spectrum β -lactamase producing *Escherichia coli* isolated from Sürk samples, a traditional turkish cheese. *Food Measure* 10 (3), S. 709–714.
- Lacher, D. W.; Gangiredla, J.; Patel, I.; Elkins, C. A.; Feng, P. C. H. (2016): Use of the *Escherichia coli* Identification Microarray for Characterizing the Health Risks of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolated from Foods. *Journal of Food Protection* 79 (10), S. 1656–1662.
- Lade, H.; Joo, H.-S.; Kim, Jae-Seok (2022): Molecular Basis of Non- β -Lactam Antibiotics Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antibiotics* 11 (10).
- Lang, C.; Behnke, H.; Bittersohl, J.; Eberhart, L.; Walthers, E.; Sommer, F. et al. (2003): Intensivmedizinische Besonderheiten beim toxischen Schocksyndrom („toxic-shock-syndrome“, TSS). Übersichtspublikation und Fallbericht zu einem TSST-1-assoziierten Toxic-Shock-Syndrome mit ARDS und Multiorganversagen nach staphylogenem Panaritium. *Der Anaesthetist* 52 (9), S. 805–813.
- Larsen, A. R.; Böcher, S.; Stegger, M.; Goering, R.; Pallesen, L. V.; Skov, R. (2008): Epidemiology of European community-associated methicillin-resistant

Staphylococcus aureus clonal complex 80 type IV strains isolated in Denmark from 1993 to 2004. *Journal of Clinical Microbiology* 46 (1), S. 62–68.

Larsen, J.; Petersen, A.; Larsen, A. R.; Sieber, R. N.; Stegger, M.; Koch, A. et al. (2017): Emergence of Livestock-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Bloodstream Infections in Denmark. *Clinical Infectious Diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 65 (7), S. 1072–1076.

Larsen, J.; Stegger, M.; Andersen, P. S.; Petersen, A.; Larsen, A. R.; Westh, Henrik et al. (2016): Evidence for Human Adaptation and Foodborne Transmission of Livestock-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 63 (10), S. 1349–1352.

Larsen, M. V.; Cosentino, S.; Rasmussen, S.; Friis, C.; Hasman, H.; Marvig, R. L. et al. (2012): Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacteria. *Journal of Clinical Microbiology* 50 (4), S. 1355–1361.

Laumay, F.; Benchetrit, H.; Corvaglia, A.-R.; van der Mee-Marquet, N.; François, P. (2021): The *Staphylococcus aureus* CC398 Lineage: An Evolution Driven by the Acquisition of Prophages and Other Mobile Genetic Elements. *Genes* 12 (11).

Lee, K. T.; Yoon, C. S. (2001): Quality changes and shelf life of imported vacuum-packaged beef chuck during storage at 0°C. *Meat Science* 59 (1), S. 71–77.

Li, H.; Andersen, P. S.; Stegger, M.; Sieber, R. N.; Ingmer, H.; Staubrand, N. et al. (2019): Antimicrobial resistance and virulence gene profiles of Methicillin-resistant and -susceptible *Staphylococcus aureus* from food products in Denmark. *Frontiers in Microbiology* 10, S. 2681.

Lisboa, L. F.; Szelewicki, J.; Lin, A.; Latonas, S.; Li, V.; Zhi, S. et al. (2019): Epidemiology of Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* O157 in the province of Alberta, Canada, 2009-2016. *Toxins* 11 (10), S. 613.

Liu, C.; Ma, X.; Jia, B.; Qian, R.; Gao, S.; Liu, L. et al. (2025): Function analysis of LIPI-4 in *Listeria monocytogenes* reveals a key role of flagella formation in the regulation of virulence. *Virulence* 16 (1), S. 2543144.

Liu, C. M.; Stegger, M.; Aziz, M.; Johnson, T. J.; Waits, K.; Nordstrom, L. et al. (2018): *Escherichia coli* ST131-H22 as a foodborne propathogen. *mBio* 9 (4).

- Livermore, D. M.; Canton, R.; Gniadkowski, M.; Nordmann, P.; Rossolini, G. M.; Arlet, G. et al. (2007): CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 59 (2), S. 165–174.
- Lomonaco, S.; Nucera, D.; Filipello, V. (2015): The evolution and epidemiology of *Listeria monocytogenes* in Europe and the United States. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases* 35, S. 172–183.
- López-Cerero, L.; Egea, P.; Serrano, L.; Navarro, D.; Mora, A.; Blanco, J. et al. (2011): Characterisation of clinical and food animal *Escherichia coli* isolates producing CTX-M-15 extended-spectrum β -lactamase belonging to ST410 phylogroup A. *International Journal of Antimicrobial Agents* 37 (4), S. 365–367.
- Lopez-Valladares, G.; Danielsson-Tham, M.-L.; Goering, R. V.; Tham, W. (2017): Lineage II (Serovar 1/2a and 1/2c) Human *Listeria monocytogenes* Pulsed-Field Gel Electrophoresis types divided into PFGE groups using the band patterns below 145.5 kb. *Foodborne Pathogens and Disease* 14 (1), S. 8–16.
- Lowder, B. V.; Guinane, C. M.; Ben Zakour, N. L.; Weinert, L. A.; Conway-Morris, A.; Cartwright, R. A. et al. (2009): Recent human-to-poultry host jump, adaptation, and pandemic spread of *Staphylococcus aureus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (46), S. 19545–19550.
- Lues, J.F.R.; van Tonder, I. (2007): The occurrence of indicator bacteria on hands and aprons of food handlers in the delicatessen sections of a retail group. *Food Control* 18 (4), S. 326–332.
- Luini, M.; Cremonesi, P.; Magro, G.; Bianchini, V.; Minozzi, G.; Castiglioni, B.; Piccinini, R. (2015): Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is associated with low within-herd prevalence of intra-mammary infections in dairy cows: Genotyping of isolates. *Veterinary Microbiology* 178 (3-4), S. 270–274.
- Lungu, B.; O'Bryan, C. A.; Muthaiyan, A.; Milillo, R.; Johnson, M. G.; Crandall, Philip, G.; Ricke, S. C. (2011): *Listeria monocytogenes*: antibiotic resistance in food production. *Foodborne Pathogens and Disease* 8 (5), S. 569–578.
- Luque-Sastre, L.; Arroyo, C.; Fox, E. M.; McMahon, B. J.; Bai, L.; Li, F.; Fanning, S. S. (2018): Antimicrobial Resistance in *Listeria* Species. *Microbiology Spectrum* 6 (4).

- Lv, G.; Jiang, R.; Zhang, H.; Wang, L.; Li, L.; Gao, W. et al. (2021): Molecular Characteristics of *Staphylococcus aureus* From Food Samples and Food Poisoning Outbreaks in Shijiazhuang, China. *Frontiers in Microbiology* 12, S. 652276.
- Madjunkov, M.; Chaudhry, S.; Ito, S. (2017): Listeriosis during pregnancy. *Archives of Gynecology and Obstetrics* 296 (2), S. 143–152.
- Mafuna, T.; Matle, I.; Magwedere, K.; Pierneef, R. E.; Reva, O. N. (2021): Whole Genome-based characterization of *Listeria monocytogenes* isolates recovered from the food chain in South Africa. *Frontiers in Microbiology* 12, S. 669287.
- Mag, T.; Nógrády, N.; Herpay, M.; Tóth, I.; Rozgonyi, F. (2010): Characterisation of verotoxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from human patients in Hungary over a 7-year period. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology* 29 (2), S. 249–252.
- Malahlela, M. N.; Cenci-Goga, B. T.; Marufu, M. C.; Fonkui, T. Y.; Grispoldi, Luca; Etter, E. et al. (2022): Occurrence, serotypes and virulence characteristics of Shiga-Toxin-producing *Escherichia coli* isolates from goats on communal rangeland in South Africa. *Toxins* 14 (5), S. 353.
- Maluta, R. P.; Leite, J. L.; Rojas, T. C. G.; Scaletsky, I. C. A.; Guastalli, E. A. L.; Ramos, M. d. C.; Da Dias Silveira, W. (2017): Variants of *astA* gene among extra-intestinal *Escherichia coli* of human and avian origin. *FEMS Microbiology Letters* 364 (6).
- Mancini, R. A.; Hunt, M. C. (2005): Current research in meat color. *Meat Science* 71 (1), S. 100–121.
- Martikainen, O.; Kagambèga, A.; Bonkougou, I. J.; Barro, N.; Siitonen, A.; Haukka, K. (2012): Characterization of Shigatoxigenic *Escherichia coli* strains from Burkina Faso. *Foodborne Pathogens and Disease* 9 (11), S. 1015–1021.
- Masana, M. O.; D’Astek, B. A.; Palladino, P. M.; Galli, L.; Del Castillo, L. L.; Carbonari, C. et al. (2011): Genotypic characterization of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef abattoirs of Argentina. *Journal of Food Protection* 74 (12), S. 2008–2017.

- Mathers, A. J.; Peirano, G.; Pitout, J. D.D. (2015): Chapter Four - *Escherichia coli* ST131: The quintessential example of an international multiresistant high-risk clone. *Advances in Applied Microbiology*, 90. S. 109–154.
- Maury, M. M.; Bracq-Dieye, H.; Huang, L. Vales, Guillaume; L., Morgane; T., Pierre et al. (2019): Hypervirulent *Listeria monocytogenes* clones adaption to mammalian gut accounts for their association with dairy products. *Nature Communications* 10 (1), S. 2488.
- Maury, M. M.; Tsai, Yu-Huan; Charlier, C.; Touchon, M.; Chenal-Francisque, V.; Leclercq, A. et al. (2016): Uncovering *Listeria monocytogenes* hypervirulence by harnessing its biodiversity. *Nature Genetics* 48 (3), S. 308–313.
- McCain; P.T.T Vu; N.T. Mai; V.V. Le; T.T.N Dhu (2015): Influence of market setting and time of purchase on counts of aerobic bacteria, *Escherichia coli*, and coliform and prevalence of *Salmonella* and *Listeria* in beef in Vietnam. Theses and Dissertations. 2713. <https://scholarsjunction.msstate.edu/td/2713>
- McCarthy (2013): *Staphylococcus aureus* innate immune evasion is lineage-specific: a bioinformatics study. *Infection, genetics and evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases* 19, S. 7–14.
- Medeiros, A. A. (1997): Evolution and dissemination of beta-lactamases accelerated by generations of beta-lactam antibiotics. *Clinical Infectious Disease* 24 (1), S. 19-45.
- Medić, H.; Djurkin Kušec, I.; Pleadin, J.; Kozačinski, L.; Njari, B.; Hengl, B.; Kušec, G. (2018): The impact of frozen storage duration on physical, chemical and microbiological properties of pork. *Meat Science* 140, S. 119–127.
- Mejía, L.; Espinosa-Mata, E.; Freire, A. L.; Zapata, S.; González-Candelas, F. (2023): *Listeria monocytogenes*, a silent foodborne pathogen in Ecuador. *Frontiers in Microbiology*. 14, S. 1278860.
- Melles, D. C.; van Leeuwen, W. B.; Boelens, H. A. M.; Peeters, J. K.; Verbrugh, H. A.; van Belkum, A. (2006): Panton-Valentine leukocidin genes in *Staphylococcus aureus*. *Emerging Infectious Diseases* 12 (7), S. 1174–1175.
- Melton-Celsa, A. R. (2014): Shiga Toxin (*Stx*) Classification, structure, and function. *Microbiology Spectrum* 2 (4), EHEC-0024-2013.

- Miko, A.; Rivas, M.; Bentancor, A.; Delannoy, S.; Fach, P.; Beutin, L. (2014): Emerging types of Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) O178 present in cattle, deer, and humans from Argentina and Germany. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 4 (4), S. 78.
- Miko, B. A.; Hafer, C. A.; Lee, C. J.; Sullivan, S. B.; Hackel, M. A. M.; Johnson, B. M. et al. (2013): Molecular characterization of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* clinical isolates in the United States, 2004 to 2010. *Journal of Clinical Microbiology* 51 (3), S. 874–879.
- Minh, S.; Kimura, E.; Hoang Minh, D.; Honjoh, K.; Miyamoto, T. (2015): Virulence characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from raw meats and clinical samples. *Microbiology and Immunology* 59 (3), S. 114–122.
- Mladenović, K. G.; Grujović, M. Ž.; Kiš, M.; Furmeg, S.; Tkalec, V. Jaki; Stefanović, O. D.; Kocić-Tanackov, S. D. (2021): *Enterobacteriaceae* in food safety with an emphasis on raw milk and meat. *Applied Microbiology and Biotechnology* 105 (23), S. 8615–8627.
- Moellering, R. C. (2012): MRSA: the first half century. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 67 (1), S. 4–11.
- Møller, E.; Björkman, J. T.; Kiil, K.; Grant, K.; Dallman, T. Painset, A. et al. (2017): Closing gaps for performing a risk assessment on *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat (RTE) foods: activity 3, the comparison of isolates from different compartments along the food chain, and from humans using whole genome sequencing (WGS) analysis. *EFS3* 14 (2), 1151E.
- Monaghan, Á.; Byrne, B.; Fanning, S.; Sweeney, T.; McDowell, D.; Bolton, D. J. (2013): Serotypes and virulence profiles of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) isolated from bovine farms and abattoirs. *Journal of Applied Microbiology* 114 (2), S. 595–603.
- Monecke, S.; Coombs, G. Shore, A. C.; Coleman, D. C.; Akpaka, P.; Borg, M. et al. (2011): A field guide to pandemic, epidemic and sporadic clones of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *PLOS One* 6 (4), e17936.
- Moran, R. A.; Anantham, S.; Holt, K. E.; Hall, R. M. (2017): Prediction of antibiotic resistance from antibiotic resistance genes detected in antibiotic-resistant

- commensal *Escherichia coli* using PCR or WGS. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 72 (3), S. 700–704.
- Mörlein, D. (2019): Sensory evaluation of meat and meat products: fundamentals and applications. *Environmental Earth Sciences*. 333 (1), 012007.
- Moura, A.; Criscuolo, A.; Pouseele, H.; Maury, M. M.; Leclercq, A.; Tarr, C. et al. (2016): Whole genome-based population biology and epidemiological surveillance of *Listeria monocytogenes*. *Nature Microbiology* 2 (2), S. 16185.
- Moura, A.; Lefrancq, N.; Wirth, T.; Leclercq, A. B., Vítor; Gilpin, B. et al. (2021): Emergence and global spread of *Listeria monocytogenes* main clinical clonal complex. *Science Advances* 7 (49), eabj9805.
- Müller, A.; Jansen, W.; Grabowski, N. T.; Kehrenberg, C. (2018a): Characterization of *Salmonella enterica* serovars recovered from meat products legally and illegally imported into the EU reveals the presence of multiresistant and AmpC-producing isolates. *Gut Pathogens* 10 (40).
- Müller, A.; Jansen, W.; Grabowski, N. T.; Monecke, S.; Ehricht, R.; Kehrenberg, C. (2018b): ESBL- and AmpC-producing *Escherichia coli* from legally and illegally imported meat: Characterization of isolates brought into the EU from third countries. *International Journal of Food Microbiology* 283, S. 52–58.
- Müller, A.; Seinige, D.; Jansen, W.; Klein, G.; Ehricht, R.; Monecke, S.; Kehrenberg, C. (2016): Variety of antimicrobial resistances and virulence factors in *Staphylococcus aureus* isolates from meat products legally and illegally introduced to Germany. *PLOS One* 11 (12), e0167864.
- Murray, C. J. L. et al. (2022): Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet* 399 (10325), S. 629 - 665.
- Musher, D. M.; Dowell, M. E.; Shortridge, V. D.; Flamm, R. K.; Jorgensen, J. H.; Le Magueres, P.; Krause, K. L. (2002): Emergence of macrolide resistance during treatment of pneumococcal pneumonia. *The New England Journal of Medicine* 346 (8), S. 630–631.
- Nagy, B.; Szmolka, A.; Smole Možina, S.; Kovač, J.; Strauss, A.; Schlager, S. et al. (2015): Virulence and antimicrobial resistance determinants of verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) and of multidrug-resistant *E. coli* from foods of animal origin

- illegally imported to the EU by flight passengers. *International Journal of Food Microbiology* 209, S. 52–59.
- Naseer, U.; Løbersli, I.; Hindrum, M.; Bruvik, T.; Brandal, L. T. (2017): Virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and the risk of developing haemolytic uraemic syndrome in Norway, 1992-2013. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 36 (9), S. 1613–1620.
- Nepal, R.; Houtak, G.; Shaghayegh, G.; Bouras, G.; Shearwin, K.; Psaltis, A. J. et al. (2021): Prophages encoding human immune evasion cluster genes are enriched in *Staphylococcus aureus* isolated from chronic rhinosinusitis patients with nasal polyps. *Microbial Genomics* 7 (12), S. 726.
- Nightingale, K. K.; Ivy, R. A.; Ho, A. J.; Fortes, E. D.; Njaa, B. L.; Peters, R. M.; Wiedmann, M. (2008): inlA premature stop codons are common among *Listeria monocytogenes* isolates from foods and yield virulence-attenuated strains that confer protection against fully virulent strains. *Applied and Environmental Microbiology* 74 (21), S. 6570–6583.
- Nightingale, K. K.; Windham, K.; Martin, K. E.; Yeung, M.; Wiedmann, M. (2005): Select *Listeria monocytogenes* subtypes commonly found in foods carry distinct nonsense mutations in inlA, leading to expression of truncated and secreted internalin A, and are associated with a reduced invasion phenotype for human intestinal epithelial cells. *Applied and Environmental Microbiology* 71 (12), S. 8764–8772.
- Noll, M.; Kleta, S.; Al Dahouk, S. (2018): Antibiotic susceptibility of 259 *Listeria monocytogenes* strains isolated from food, food-processing plants and human samples in Germany. *Journal of Infection and Public Health* 11 (4), S. 572–577.
- Ochoa, T. J.; Contreras, C. A. (2011): Enteropathogenic *Escherichia coli* infection in children. *Current Opinion in Infectious Diseases* 24 (5), S. 478–483.
- Orsi, R. H.; den Bakker, H. C.; Wiedmann, M. (2011): *Listeria monocytogenes* lineages: Genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics. *International Journal of Medical Microbiology* 301 (2), S. 79–96.
- Orsi, R. H.; Liao, J.; Carlin, C. R.; Wiedmann, M. (2024): Taxonomy, ecology, and relevance to food safety of the genus *Listeria* with a particular consideration of new *Listeria* species described between 2010 and 2022. *mBio* 15 (2), e0093823.

- Painset, A.; Björkman, J. T.; Kiil, K.; Guillier, L.; Mariet, J.-F.; Félix, B. et al. (2019): LiSEQ - whole-genome sequencing of a cross-sectional survey of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods and human clinical cases in Europe. *Microbial Genomics* 5 (2).
- Parisi, A.; Caruso, M.; Normanno, G.; Latorre, L.; Sottili, R.; Miccolupo, A. et al. (2016): Prevalence, antimicrobial susceptibility and molecular typing of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in bulk tank milk from southern Italy. *Food Microbiology* 58, S. 36–42.
- Peacock, S. J.; Paterson, G. K. (2015): Mechanisms of Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Annual Review of Biochemistry* 84, S. 577–601.
- Pearce, R. A.; Bolton, D. J. (2005): Excision vs sponge swabbing - a comparison of methods for the microbiological sampling of beef, pork and lamb carcasses. *Journal of Applied Microbiology* 98 (4), S. 896–900.
- Peirano, G.; van der Bij, A.K.; Gregson, D. B.; Pitout, J. D. D. (2012): Molecular epidemiology over an 11-year period (2000 to 2010) of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* causing bacteremia in a centralized Canadian region. *Journal of Clinical Microbiology* 50 (2), S. 294–299.
- Pérez-Trallero, E.; Zigorraga, C.; Artieda, J.; Alkorta, M.; Marimón, J. M. (2014): Two outbreaks of *Listeria monocytogenes* infection, Northern Spain. *Emerging Infectious Diseases* 20 (12), S. 2155–2157.
- Picard, B.; Garcia, J. S.; Gouriou, S.; Duriez, P.; Brahimi, N.; Bingen, E. et al. (1999): The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection. *Infection and Immunity* 67 (2), S. 546–553.
- Pietsch, M.; Eller, C.; Wendt, C.; Holfelder, M.; Falgenhauer, L.; Fruth, A. et al. (2017): Molecular characterisation of extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* isolates from hospital and ambulatory patients in Germany. *Veterinary Microbiology* 200, S. 130–137.
- Porwollik, S.; Boyd, E. F.; Choy, C.; Cheng, P.; Florea, L.; Proctor, E.; McClelland, M. (2004): Characterization of *Salmonella enterica* subspecies I genovars by use of microarrays. *Journal of Bacteriology* 186 (17), S. 5883–5898.

Ramamurthy, T.; Ghosh, A.; Pazhani, G.P.; Shinoda, S. (2014): Current Perspectives on Viable but Non-Culturable (VBNC) Pathogenic Bacteria. *Frontiers in Public Health* 2, S. 103.

Ramos, G. L.de P. A.; Silva, G. M. M.; Ribeiro, W. A.; Nascimento, J. S. (2021): *Salmonella* spp. em productos lacteos no brasil e seu impacto na saude do consumidor. Silvani Verruck (Hg.): *Avanços em Ciência e Tecnologia de Alimentos - Volume 4: Editora Científica Digital*, S. 254–266.

Riley, L. W. (2014): Pandemic lineages of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 20 (5), S. 380–390.

Rivas, M.; Chinen, I.; Guth, B. E. C. (2016): Enterohemorrhagic (Shiga Toxin-Producing). *Escherichia coli* in the Americas. Springer Nature. Online verfügbar unter https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-45092-6_5.

RKI (2010): Robert Koch-Institut. Listeriose - RKI-Ratgeber. Online verfügbar unter: https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Listeriose.html

RKI (2011): Robert Koch-Institut. EHEC-Erkrankung - RKI-Ratgeber. Online verfügbar unter: https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_EHEC.html.

RKI (2016a): Robert Koch-Institut. Salmonellose - RKI-Ratgeber. Online verfügbar unter: https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Salmonellose.html.

RKI (2021): Robert Koch-Institut. Infektionsepidemiologisches Jahrbuch - Infektionsepidemiologisches Jahrbuch für 2020. Online verfügbar unter: https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Jahrbuch/Jahrbuch_2020.html?nn=2374622

RKI 2016: Robert Koch-Institut. Staphylokokken-Erkrankungen, insbesondere Infektionen durch MRSA - RKI-Ratgeber. Online verfügbar unter: https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Staphylokokken_MRSA.html.

RKI 2022: Epidemiologisches Bulletin 2022. Online verfügbar unter https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2022/Ausgaben/50_22.pdf?__blob=publicationFile.

- Robins-Browne, R. M.; Holt, Kathryn E.; Ingle, D. J.; Hocking, D. M.; Yang, Ji; Tauschek, M. (2016): Are *Escherichia coli* pathotypes still relevant in the era of Whole-Genome Sequencing? *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 6, S. 141.
- Rocha, F. R.; Pinto, V. P.T.; Barbosa, F. C. B. (2016): The spread of CTX-M-type Extended-spectrum β -Lactamases in Brazil: A systematic review. *Microbial Drug resistance* 22 (4), S. 301–311.
- Rodríguez-Lázaro, D.; Ariza-Miguel, J.; Diez-Valcarce, M.; Stessl, B.; Beutlich, J.; Fernández-Natal, I. et al. (2015): Identification and molecular characterization of pathogenic bacteria in foods confiscated from non-EU flights passengers at one Spanish airport. *International Journal of Food Microbiology* 209, S. 20–25.
- Rodríguez-Lázaro, D.; Oniciuc, E.-A.; García, P. G.; Gallego, D.; Fernández-Natal, I.; Dominguez-Gil, M. et al. (2017): Detection and characterization of *Staphylococcus aureus* and Methicillin-resistant *S. aureus* in foods confiscated in EU Borders. *Frontiers in Microbiology* 8, S. 1344.
- Roer, L.; Overballe-Petersen, S.; Hansen, F.; Johannesen, T. B.; Stegger, M.; Bortolaia, V. et al. (2019): ST131 fimH22 *Escherichia coli* isolate with a *bla*_{CMY-2}/Incl1/ST12 plasmid obtained from a patient with bloodstream infection: highly similar to *E. coli* isolates of broiler origin. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 74 (3), S. 557–560.
- Rosengren, A.; Fabricius, A.; Guss, B.; Sylvén, S.; Lindqvist, R. (2010): Occurrence of foodborne pathogens and characterization of *Staphylococcus aureus* in cheese produced on farm-dairies. *International Journal of Food Microbiology* 144 (2), S. 263–269.
- Ross, J. I.; Eady, E. A.; Cove, J. H.; Cunliffe, W. J.; Baumberg, S.; Wootton, J. C. (1990): Inducible erythromycin resistance in staphylococci is encoded by a member of the ATP-binding transport super-gene family. *Molecular microbiology* 4 (7), S. 1207–1214.
- Rothrock, M. J.; Micciche, A. C.; Bodie, A. R.; Ricke, S. C. (2019): *Listeria* Occurrence and potential control strategies in alternative and conventional poultry processing and retail. *Frontiers in Sustainable Food Systems* 3, Artikel 33.

- Ruimy, R.; Armand-Lefevre, L.; Barbier, F.; Ruppé, E.; Coccojaru, R.; Mesli, Y. et al. (2009): Comparisons between geographically diverse samples of carried *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology* 191 (18), S. 5577–5583.
- Rychli, K.; Stessl, B.; Szakmary-Brändle, K.; Strauß, A.; Wagner, M.; Schoder, D. (2018): *Listeria monocytogenes* isolated from illegally imported food products into the European Union harbor different virulence factor variants. *Genes* 9 (9), S. 428.
- Sancak, Y. C.; Sancak, H.; Isleyici, O. (2015): Presence of *Escherichia coli* O157 and O157:H7 in raw milk and van herby cheese. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy* 59 (4), S. 511–514.
- Sarowska, J.; Futoma-Koloch, B.; Jama-Kmiecik, A.; Frej-Madrzak, M.; Ksiazczyk, M.; Bugla-Ploskonska, G.; Choroszy-Krol, I. (2019): Virulence factors, prevalence and potential transmission of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from different sources: recent reports. *Gut Pathogens* 11 (1), S. 10.
- Sato, T.; Usui, M.; Konishi, N.; Kai, Akemi; M. H.; Hanaki, H.; Tamura, Y. (2017): Closely related methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from retail meat, cows with mastitis, and humans in Japan. *PLOS One* 12 (10), e0187319.
- Scheutz, F.; Teel, L. D.; Beutin, L.; Piérard, D.; Buvens, G.; Karch, H. et al. (2012): Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping Shiga toxins and standardizing *stx* nomenclature. *Journal of Clinical Microbiology* 50 (9), S. 2951–2963.
- Schoder, D.; Strauß, A.; Szakmary-Brändle, K.; Stessl, B.; Schlager, S.; Wagner, M. (2015): Prevalence of major foodborne pathogens in food confiscated from air passenger luggage. *International Journal of Food Microbiology* 209, S. 3–12.
- Šeputienė, V.; Povilonis, J.; Ružauskas, M.; Pavilonis, A.; Sužiedėlienė, E. (2010): Prevalence of trimethoprim resistance genes in *Escherichia coli* isolates of human and animal origin in Lithuania. *Journal of Medical Microbiology* 59 (Pt 3), S. 315–322.
- Sergelidis, D.; Angelidis, A. S. (2017): Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a controversial food-borne pathogen. *Letters in Applied Microbiology* 64 (6), S. 409–418.
- Serra-Burriel, M.; Keys, M.; Campillo-Artero, C.; Agodi, A.; Barchitta, M.; Gikas, A. et al. (2020): Impact of multi-drug resistant bacteria on economic and clinical outcomes

of healthcare-associated infections in adults: Systematic review and meta-analysis. *PLOS One* 15 (1), e0227139.

Shamloo, E.; Hosseini, H.; Abdi Moghadam, Z.; Halberg Larsen, M.; Haslberger, A.; Alebouyeh, M. (2019a): Importance of *Listeria monocytogenes* in food safety: a review of its prevalence, detection, and antibiotic resistance. *Iranian Journal of Veterinary Research* 20 (4), S. 241–254.

Shopsin, B.; Gomez, M.; Montgomery, S. O.; Smith, D. H.; Waddington, M.; Dodge, D. E. et al. (1999): Evaluation of protein A gene polymorphic region DNA sequencing for typing of *Staphylococcus aureus* strains. *Journal of Clinical Microbiology* 37 (11), S. 3556–3563.

Silva, V.; Hermenegildo, S.; Ferreira, C.; Manaia, C.M.; Capita, R.; Alonso-Calleja, C. et al. (2020): Genetic characterization of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from human bloodstream infections: Detection of MLSB Resistance. *Antibiotics* 9 (7), 375

Silva, V.; Ribeiro, J.; Rocha, J.; Manaia, C. M.; Silva, A.; Pereira, J. E. et al. (2022): High frequency of the EMRSA-15 clone (ST22-MRSA-IV) in hospital wastewater. *Microorganisms* 10 (1).

Smith, E. M.; Green, L. E.; Medley, G. F.; Bird, H. E.; Fox, L. K.; Schukken, Y. H. et al. (2005): Multilocus sequence typing of intercontinental bovine *Staphylococcus aureus* isolates. *Journal of Clinical Microbiology* 43 (9), S. 4737–4743.

Smith, T. C.; Wardyn, S.E. (2015): Human Infections with *Staphylococcus aureus* CC398. *Current Environmental Health Reports* 2 (1), S. 41–51.

Smyth, D. S.; Feil, E. J.; Meaney, W. J.; Hartigan, P. J.; Tollersrud, T.; Fitzgerald, J. R. et al. (2009): Molecular genetic typing reveals further insights into the diversity of animal-associated *Staphylococcus aureus*. *Journal of Medical Microbiology* 58 (Pt 10), S. 1343–1353.

Spies, L. A. (2008): Traveler's diarrhea: an update on prevention and treatment. *Journal of Midwifery and Women's Health* 53 (3), S. 251–254.

Spoor, L. E.; McAdam, P. R.; Weinert, L. A.; Rambaut, A.; Hasman, H.; Aarestrup, F. M. et al. (2013): Livestock origin for a human pandemic clone of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *mBio* 4 (4).

- Stefani, S.; Goglio, A. (2010): Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: related infections and antibiotic resistance. *International Journal of Infectious Diseases*, 14 (4), S19-22.
- Stella, S.; Ripamonti, B.; Vandoni, S.; Bernardi, C.; Sgoifo Rossi, C. A. (2013): Microbiological and physicochemical quality evaluation of vacuum-packed Argentine beef imported into Italy. *Journal of Food Quality* 36 (4), S. 253–262.
- Struelens, M. J.; Deplano, A.; Godard, C.; Maes, N.; Serruys, E. (1992): Epidemiologic typing and delineation of genetic relatedness of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by macrorestriction analysis of genomic DNA by using pulsed-field gel electrophoresis. *Journal of Clinical Microbiology* 30 (10), S. 2599–2605.
- Szmolka, A.; Nagy, B. (2013): Multidrug resistant commensal *Escherichia coli* in animals and its impact for public health. *Frontiers in Microbiology* 4, S. 258.
- Tartof, S. Y.; Solberg, O. D.; Manges, A. R.; Riley, L. W. (2005): Analysis of a uropathogenic *Escherichia coli* clonal group by multilocus sequence typing. *Journal of Clinical Microbiology* 43 (12), S. 5860–5864.
- Tegegne, H. A.; Koláčková, I.; Karpíšková, R. (2017): Diversity of livestock associated Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 10 (9), S. 929–931.
- Teixeira, L. A. C.; Carvalho, F. T.; Vallim, D. C.; Pereira, R. C. L.; Cunha Neto, A.; Vieira, B. S. et al. (2019): *Listeria monocytogenes* in export-approved beef from Mato Grosso, Brazil: Prevalence, molecular characterization and resistance to antibiotics and disinfectants. *Microorganisms* 8 (1), S. 18.
- Tekiner, İ. H.; Özpinar, H. (2016): Occurrence and characteristics of extended spectrum beta-lactamases-producing *Enterobacteriaceae* from foods of animal origin. *Brazilian Journal of Microbiology*. 47 (2), S. 444–451.
- Tenover, F. C.; Arbeit, R. D.; Goering, R. V.; Mickelsen, P. A.; Murray, B. E.; Persing, D. H.; Swaminathan, B. (1995): Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *Journal of Clinical Microbiology* 33 (9), S. 2233–2239.
- Thiermann, A. B. (2005): Globalization, international trade and animal health: the new roles of OIE. *Preventive Veterinary Medicine* 67 (2-3), S. 101–108.

- Thomas, D.; Chou, S.; Dauwalder, O.; Lina, G. (2007): Diversity in *Staphylococcus aureus* enterotoxins. *Chemical Immunology and Allergy* 93, S. 24–41.
- Toledo, V.; Bakker, H.C. d.; Hormazábal, J. C.; González-Rocha, G.; Bello-Toledo, H.; Toro, M.; Moreno-Switt, A. I. (2018): Genomic diversity of *Listeria monocytogenes* isolated from clinical and non-clinical samples in Chile. *Genes* 9 (8).
- Townsend, A.; Strawn, L. K.; Chapman, B. J.; Dunn, L. L. (2021): A systematic review of *Listeria* Species and *Listeria monocytogenes* prevalence, persistence, and diversity throughout the fresh produce supply chain. *Foods* 10 (6).
- Troxler, R.; Graevenitz, A. von; Funke, G.; Wiedemann, B.; Stock, I. (2000): Natural antibiotic susceptibility of *Listeria* species: *L. grayi*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. monocytogenes*, *L. seeligeri* and *L. welshimeri* strains. *Clinical Microbiology and Infection* 6 (10), S. 525–535.
- Tsergouli, K.; Karampatakis, T.; Kontopoulou, K.; Pappa, S.; Kampouridou, P.; Kallasidou, G. et al. (2022): Spa diversity and genetic characterization of t127 Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a tertiary Greek hospital. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 69 (3), S. 185–192.
- Ullah, N.; Nasir, S.; Ishaq, Z.; Anwer, F.; Raza, T.; Rahman, M. et al. (2022): Comparative genomic analysis of a Panton-Valentine Leukocidin-positive ST22 community-acquired Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from Pakistan. *Antibiotics* 11 (4).
- Valentin, L.; Sharp, H.; Hille, K.; Seibt, U.; Fischer, J.; Pfeifer, Y. et al. (2014): Subgrouping of ESBL-producing *Escherichia coli* from animal and human sources: an approach to quantify the distribution of ESBL types between different reservoirs. *International Journal of Medical Microbiology* 304 (7), S. 805–816.
- van Wamel, W. J. B.; Rooijackers, S. H. M.; Ruyken, M.; van Kessel, K. P. M.; van Strijp, J. A. G. (2006): The innate immune modulators staphylococcal complement inhibitor and chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus* are located on beta-hemolysin-converting bacteriophages. *Journal of Bacteriology* 188 (4), S. 1310–1315.
- Vázquez-Boland, J. A.; Wagner, M.; Scotti, M. (2020): Why Are Some *Listeria monocytogenes* Genotypes More Likely To Cause Invasive (Brain, Placental) Infection? *mBio* 11 (6).

- Venter, P.; Shale, K.; Lues, J.F.R.; Buys, E. M. (2006): Microbial proliferation and mathematical indices of vacuum-packed bovine meat. *Journal of Food Processing Preservation* 30 (4), S. 433–448.
- Verkaik, N. J.; Benard, M.; Boelens, H. A.; Vogel, C. P. de; Nouwen, J. L.; Verbrugh, H. A. et al. (2011): Immune evasion cluster-positive bacteriophages are highly prevalent among human *Staphylococcus aureus* strains, but they are not essential in the first stages of nasal colonization. *Clinical microbiology and infection: The official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 17 (3), S. 343–348.
- Vestergaard, M.; Frees, D.; Ingmer, H. (2019): Antibiotic resistance and the MRSA Problem. *Microbiology Spectrum* 7 (2).
- Vieira, C.; Diaz, M. T.; Martínez, B.; García-Cachán, M. D. (2009): Effect of frozen storage conditions (temperature and length of storage) on microbiological and sensory quality of rustic crossbred beef at different states of ageing. *Meat Science* 83 (3), S. 398–404.
- Vimont, A.; Vernozy-Rozand, C.; Montet, M. P.; Bavai, C.; Fremaux, B.; Delignette-Muller, M-L (2007): Growth of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* (STEC) and bovine feces background microflora in various enrichment protocols. *Veterinary Microbiology* 123 (1-3), S. 274–281.
- Vingadassalon, N.; Merda, D.; Felten, A.; Chesnais, V.; Kourtis, C.; van Nieuwenhuysen, T. et al. (2025): Epidemiology of *Staphylococcus aureus* food isolates: Comparison of conventional methods with Whole Genome sequencing typing methods. *Food Microbiology* 125, S. 104625.
- Voronina, O. L.; Kunda, M. S.; Ryzhova, N. N.; Aksenova, E. I.; Kutuzova, A. V.; Tikulmina, A. N. et al. (2023): Genomic characteristics of *Listeria* that caused invasive listeriosis during the COVID-19 pandemic. *London Journal of Resarch in Science: Natural and Formal* 23 (5). S. 33-62
- Vossenkuhl, B.; Brandt, J.; Fetsch, A.; Käsbohrer, A.; Kraushaar, B.; Alt, K.; Tenhagen, B.-A. (2014): Comparison of spa types, SCCmec types and antimicrobial resistance profiles of MRSA isolated from turkeys at farm, slaughter and from retail meat indicates transmission along the production chain. *PLOS On* 9 (5), e96308.

- Wang, L.; Bai, X.; Ylinen, E.; Zhang, J.; Saxén, H.; Matussek, A. (2023): Genetic characterization of Intimin gene (*eae*) in clinical Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* strains from pediatric patients in Finland. *Toxins* 15 (12).
- Wang, Y.; Zhao, A.; Zhu, R.; Lan, R.; Jin, D.; Cui, Z. et al. (2012): Genetic diversity and molecular typing of *Listeria monocytogenes* in China. *BMC Microbiology* 12, S. 119.
- Wesolek, J. L.; Wu, J. Y.; Smalley, C. M.; Wang, L.; Campbell, M. J. (2022): Risk factors for Trimethoprim and Sulfamethoxazole-resistant *Escherichia Coli* in ED patients with urinary tract infections. *The American Journal of Emergency Medicine* 56, S. 178–182.
- Wetzel und Fieseler (2020): Risk evaluation of *E. coli* ST 131 as a foodborne pathogen in Switzerland. Institut für Lebensmittel- und Getränkeinnovation (ILGI). Online verfügbar unter: <https://digitalcollection.zhaw.ch/items/8f3ff031-80f5-4c37-b0a3-9506812c2d69>.
- WHO (2019): World Health Organization. Critically important antimicrobials for human medicine: 2018, (6). Online verfügbar unter: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241515528>.
- Xia, F.; Cheng, J. Jiang, M.; Wang, Z.; Wen, Z.; Wang, M. et al. (2022): Genomics analysis to identify multiple genetic determinants that drive the global transmission of the pandemic ST95 lineage of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC). *Pathogens* 11 (12), S. 1489.
- Xu, S.X.; McCormick, J. K. (2012): Staphylococcal superantigens in colonization and disease. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2, S. 52.
- Yatsuyanagi, J.; Saito, S.; Miyajima, Y.; Amano, K.-I.; Enomoto, K. (2003): Characterization of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains harboring the *astA* gene that were associated with a waterborne outbreak of diarrhea in Japan. *Journal of Clinical Microbiology* 41 (5), S. 2033–2039.
- Yin, Y.; Tan, W.; Wang, G.; Kong, S.; Zhou, X.; Zhao, D. et al. (2015): Geographical and longitudinal analysis of *Listeria monocytogenes* genetic diversity reveals its correlation with virulence and unique evolution. *Microbiological Research* 175, S. 84–92.

Zadoks, R. N.; Middleton, J. R.; McDougall, S.; Katholm, J.; Schukken, Y. H. (2011): Molecular epidemiology of mastitis pathogens of dairy cattle and comparative relevance to humans. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 16 (4), S. 357–372.

8.1 EU-Verordnungen

Verordnung (EG) Nr. 178/2002 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 28. Januar 2002 zur Festlegung der allgemeinen Grundsätze und Anforderungen des Lebensmittelrechts, zur Errichtung der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit und zur Festlegung von Verfahren zur Lebensmittelsicherheit. Amtsblatt der Europäischen Union L 31 vom 1.2.2002, S. 1–24.

Verordnung (EG) Nr. 852/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 29. April 2004 über Lebensmittelhygiene.
Amtsblatt der Europäischen Union L 139 vom 30.4.2004, S. 1–54.

Verordnung (EG) Nr. 853/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 29. April 2004 mit spezifischen Hygienevorschriften für Lebensmittel tierischen Ursprungs. Amtsblatt der Europäischen Union L 139 vom 30.4.2004, S. 55–205.

Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 der Kommission vom 15. November 2005 über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel (Text von Bedeutung für den EWR).
Amtsblatt der Europäischen Union L 338 vom 22.12.2005, S. 1–26

Verordnung (EU) 2017/625 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 15. März 2017 über amtliche Kontrollen und andere amtliche Tätigkeiten zur Gewährleistung der Anwendung des Lebens- und Futtermittelrechts und der Vorschriften über Tiergesundheit und Tierschutz, Pflanzengesundheit und Pflanzenschutzmittel, zur Änderung der Verordnungen (EG) Nr. 999/2001, (EG) Nr. 396/2005, (EG) Nr. 1069/2009, (EG) Nr. 1107/2009, (EU) Nr. 1151/2012, (EU) Nr. 652/2014, (EU) 2016/429 und (EU) 2016/2031 des Europäischen Parlaments und des Rates, der Verordnungen (EG) Nr. 1/2005 und (EG) Nr. 1099/2009 des Rates sowie der Richtlinien 98/58/EG, 1999/74/EG, 2007/43/EG, 2008/119/EG und 2008/120/EG des Rates und zur Aufhebung der Verordnungen (EG) Nr. 854/2004 und (EG) Nr. 882/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates, der Richtlinien 89/608/EWG, 89/662/EWG, 90/425/EWG, 91/496/EEG, 96/23/EG, 96/93/EG und 97/78/EG des Rates und des Beschlusses 92/438/EWG des Rates (Verordnung über amtliche Kontrollen). Text von Bedeutung für den EWR.

Amtsblatt der Europäischen Union L 95 vom 7.4.2017, S. 1–142.

Durchführungsverordnung (EU) 2019/627 der Kommission vom 15. März 2019 zur Festlegung einheitlicher praktischer Modalitäten für die Durchführung der amtlichen Kontrollen in Bezug auf für den menschlichen Verzehr bestimmte Erzeugnisse tierischen Ursprungs gemäß der Verordnung (EU) 2017/625 des Europäischen Parlaments und des Rates und zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 2074/2005 der Kommission in Bezug auf amtliche Kontrollen (Text von Bedeutung für den EWR.)

Amtsblatt der Europäischen Union L131 vom 17.05.2019, S. 51

Durchführungsverordnung (EU) 2021/405 der Kommission vom 24. März 2021 zur Festlegung der Listen der Drittländer oder Drittlandsgebiete, aus denen gemäß der Verordnung (EU) 2017/625 des Europäischen Parlaments und des Rates der Eingang bestimmter für den menschlichen Verzehr bestimmter Tiere und Waren in die Union zulässig ist (Text von Bedeutung für den EWR)

Amtsblatt der Europäischen Union L114 vom 31.03.2021, S. 118

Durchführungsverordnung (EU) 2019/2130 der Kommission vom 25. November 2019 zur Festlegung ausführlicher Vorschriften über die während und nach Dokumentenprüfungen, Nämlichkeitskontrollen und Warenuntersuchungen bei Tieren und Waren, die amtlichen Kontrollen an den Grenzkontrollstellen unterliegen, vorzunehmenden Handlungen (Text von Bedeutung für den EWR)

Amtsblatt der Europäischen Union L 321 vom 12.12.2019, S. 128–138

Durchführungsverordnung (EU) 2019/2129 der Kommission vom 25. November 2019 zur Festlegung von Bestimmungen für die einheitliche Anwendung der Häufigkeitsraten für Nämlichkeitskontrollen und Warenuntersuchungen bei bestimmten Sendungen von Tieren und Waren, die in die Union verbracht werden (Text von Bedeutung für den EWR)

Amtsblatt der Europäischen Union L321 vom 12.12.2019, S. 12

9. Anhang

Tabelle 9: Legal importierte rohe Rindfleischproben (Publikation 1)

Proben-Nr.	Herkunftsland	Gewicht in g	Probenahme
H1	Argentinien	548	02.11.2021
H2	Argentinien	508	02.11.2021
H3	Brasilien	232	02.11.2021
H4	Uruguay	217	02.11.2021
H5	Uruguay	137	03.11.2021
H6	Brasilien	114	03.11.2021
H7	Brasilien	129	03.11.2021
H8	Brasilien	132	03.11.2021
H9	Argentinien	191	17.11.2021
H10	Uruguay	260	17.11.2021
H11	Brasilien	247	15.11.2021
H12	Brasilien	266	17.11.2021
H13	Uruguay	331	17.11.2021
H14	Brasilien	172	17.11.2021
H15	Argentinien	163	17.11.2021
H16	Argentinien	127	17.11.2021
H17	Argentinien	337	12.11.2021
H18	Argentinien	346	17.11.2021
H19	Brasilien	172	17.11.2021
H20	Brasilien	196	15.11.2021
H21	Brasilien	158	15.11.2021
H22	Argentinien	225	15.11.2021
H23	Uruguay	174	17.11.2021
H24	Argentinien	242	29.11.2021
H25	Uruguay	163	29.11.2021
H26	Argentinien	172	29.11.2021
H27	Argentinien	266	29.11.2021
H28	Argentinien	322	29.11.2021
H29	Brasilien	106	07.12.2021
H30	Brasilien	265	07.12.2021
H31	Brasilien	602	02.12.2021
H32	Argentinien	160	02.12.2021
H33	Brasilien	150	02.12.2021
H34	Brasilien	182	02.12.2021
H35	Argentinien	345	10.01.2022
H36	Brasilien	156	10.01.2022
H37	Brasilien	165	10.01.2022
H38	Brasilien	235	11.01.2022
H39	Brasilien	236	11.01.2022
H40	Brasilien	441	11.01.2022
H41	Brasilien	340	10.01.2022
H42	Argentinien	177	19.01.2022
H43	Argentinien	271	19.01.2022
H44	Brasilien	163	18.01.2022
H45	Uruguay	221	17.01.2022
H46	Uruguay	221	25.02.2022
H47	Brasilien	159	26.01.2022
H48	Brasilien	238	26.01.2022
H49	Argentinien	184	25.01.2022
H50	Brasilien	227	26.01.2022
H51	Argentinien	195	03.02.2022
H52	Brasilien	230	03.02.2022
H53	Argentinien	185	03.02.2022
H54	Brasilien	196	03.02.2022

9. Anhang

H55	Brasilien	190	02.02.2022
H56	Brasilien	545	09.02.2022
H57	Brasilien	227	01.02.2022
H58	Brasilien	144	27.01.2022
H59	Paraguay	186	01.02.2022
H60	Brasilien	264	08.02.2022
H61	Argentinien	218	09.02.2022
H62	Brasilien	185	07.02.2022
H63	Argentinien	144	09.02.2022
H64	Argentinien	217	16.02.2022
H65	Argentinien	300	14.02.2022
H66	Brasilien	317	16.02.2022
H67	Argentinien	348	14.02.2022
H68	Brasilien	170	09.03.2022
H69	Brasilien	240	09.03.2022
H70	Uruguay	130	08.03.2022
H71	Paraguay	107	03.03.2022
H72	Brasilien	126	10.03.2022
H73	Brasilien	180	09.03.2022
H74	Brasilien	243	15.03.2022
H75	Uruguay	140	14.03.2022
H76	Argentinien	203	23.03.2022
H77	Argentinien	190	24.03.2022
H78	Brasilien	127	23.03.2022
H79	Argentinien	232	23.03.2022
H80	Brasilien	186	24.03.2022
H81	Uruguay	233	23.03.2022
H82	Brasilien	216	23.03.2022
H83	Brasilien	205	23.03.2022
H84	Argentinien	138	21.03.2022
H85	Brasilien	363	23.03.2022
H86	Argentinien	202	23.03.2022
H87	Brasilien	156	21.03.2022
H88	Argentinien	184	23.03.2022
H89	Brasilien	424	23.03.2022
H90	Brasilien	241	23.03.2022
H91	Argentinien	178	23.03.2022
H92	Brasilien	276	28.03.2022
H93	Brasilien	97,6	28.03.2022
H94	Brasilien	101	29.03.2022
H95	Brasilien	100	24.03.2022
H96	Brasilien	151	24.03.2022
H97	Uruguay	165	24.03.2022
H98	Argentinien	219	24.03.2022
H99	Brasilien	160	28.03.2022
H100	Argentinien	240	25.03.2022

Tabelle 10.: Illegal importierte Lebensmittel tierischer Herkunft (Publikation 2)

Proben-Nr.	Herkunft	Produktart	Tierart	Verarbeitungs-zustabd	Gewicht in g	Verpackungs-art	Probenahme
F1	Türkei	Lammfleisch, gekocht	Lamm	Verzehrfertig	595	Individuell ^a	03.08.2021
F2	Türkei	Butter	Rind	Verzehrfertig	280	Individuell	03.08.2021
F3	Türkei	Frischkäse	NT ^b	Verzehrfertig	792	Individuell	03.08.2021
F4	Sudan	Butter	Rind	Verzehrfertig	1000	Individuell	03.08.2021
F5	Libanon	Schmand	Rind	Verzehrfertig	850	Industriell ^c	05.08.2021
F6	Libanon	Fett mit Fleischstücken	Schaf	verzehrfertig	830	Individuell	12.08.2021
F7	Türkei	Butter	Rind	Verzehrfertig	1010	Individuell	07.09.2021
F8	Türkei	Salzlakenkäse	NT	Verzehrfertig	1505	Individuell	07.09.2021
F9	Türkei	Käse ^d , in Scheiben	Rind	Verzehrfertig	375	Individuell	08.09.2021
F10	Sudan	Fleisch, getrocknet	Rind	Verzehrfertig	1320	Individuell	29.09.2021
F11	Türkei	Salzlakenkäse	Schaf	Verzehrfertig	1800	Individuell	05.10.2021
F12	Türkei	Fett	Schaf	verzehrfertig Roh / Nicht	237	Individuell	05.10.2021
F13	Türkei	Fleisch	Rind	verzehrfertig	925	Individuell	05.10.2021
F14	Türkei	Brühwurst	Rind	Verzehrfertig	120	Industriell	15.10.2021
F15	Libanon	Fleisch, gekocht	Rind	Verzehrfertig	1510	Individuell	15.10.2021
F16	Türkei	Käse	NT	Verzehrfertig	400	Individuell	15.10.2021
F17	Türkei	Butter	Rind	Verzehrfertig	1470	Individuell	15.10.2021
F18	Korea	Fleisch, gekocht, mariniert	Geflügel	Verzehrfertig	346	Individuell	24.04.2022
F19	Thailand	Rohwurst	Schwein	Verzehrfertig	199	Industriell	24.04.2022
F20	Thailand	Rohwurst	Schwein	Verzehrfertig	400	Individuell	29.04.2022
F21	Äthiopien	Fleisch	Geflügel	verzehrfertig Roh / Nicht	1200	Individuell	09.05.2022
F22	Türkei	Käse	NT	Verzehrfertig	800	Individuell	09.05.2022
F23	Türkei	Frischkäse	Rind	Verzehrfertig	800	Individuell	09.05.2022
F24	Syrien	Fett mit Fleischstücken	Schaf	verzehrfertig Roh / Nicht	3100	Individuell	14.07.2022
F25	Syrien	Fett	Lamm	verzehrfertig Roh / Nicht	1200	Individuell	14.07.2022
F26	Iran	Milchpulver	Rind	verzehrfertig	1530	Individuell	24.07.2022
F27	Indien	Butter	Rind	Verzehrfertig	898	Industriell	24.07.2022
F28	Türkei	Rohwurst	Rind	Verzehrfertig	300	Individuell	03.08.2022
F29	Türkei	Käse	Rind	Verzehrfertig	500	Industriell	03.08.2022
F30	Türkei	Rohwurst	Rind	Verzehrfertig	1240	Individuell	06.08.2022
F31	Türkei	Käse	NT	Verzehrfertig	470	Individuell	06.08.2022
F32	Moldawien	Käse	NT	Verzehrfertig	2000	Individuell	12.08.2022
F33	Türkei	Butter	Rind	Verzehrfertig	600	Individuell	19.08.2022
F34	Uganda	Butter	Rind	Verzehrfertig	1500	Individuell	19.08.2022
F35	Türkei	Käse	Rind	Verzehrfertig	370	Industriell	19.08.2022
F36	Marokko	Brühwurst	Geflügel	Verzehrfertig	590	Industriell	19.08.2022
F37	Marokko	Fleisch, getrocknet	Geflügel	Verzehrfertig	300	Individuell	19.08.2022
F38	Moldawien	Rohwurst mit rohen Fleischstücken	Schwein	Roh / Nicht verzehrfertig	400	Individuell	19.08.2022

9. Anhang

F39	Türkei	Brühwurst Fleisch, getrocknet, gewürzt	Rind	Verzehrfertig	200	Industriell	19.08.2022
F40	Uganda		Geflügel	Verzehrfertig Roh / Nicht	750	Individuell	19.08.2022
F41	Armenien	Fleisch	Rind	verzehrfertig	800	Individuell	19.08.2022
F42	Armenien	Käse Fleisch, getrocknet	Rind	Verzehrfertig	500	Individuell	19.08.2022
F43	Taiwan	Wurst Fleisch, getrocknet	Schwein	Verzehrfertig	480	Individuell	05.09.2022
F44	Kasachstan	Rohwurst	Schwein	Verzehrfertig	715	Individuell	02.10.2022
F45	Kasachstan	Käse	Schwein	Verzehrfertig	285	Individuell	02.10.2022
F46	Kasachstan	Rind	Schwein	Verzehrfertig	675	Individuell	02.10.2022
F47	Kasachstan	Käse	Rind	Verzehrfertig Roh / Nicht	990	Individuell	02.10.2022
F48	Türkei	Fleisch	Geflügel	verzehrfertig	2000	Individuell	10.11.2022
F49	Türkei	Fleisch, gekocht	Rind	Verzehrfertig	335	Individuell	10.11.2022
F50	Türkei	Butter	Rind	Verzehrfertig	1015	Individuell	10.11.2022
F51	Türkei	Salzlakenkäse Käse, in Scheiben	Rind	Verzehrfertig	720	Individuell	10.11.2022
F52	Türkei	NT	NT	Verzehrfertig	1500	Individuell	10.11.2022
F53	Türkei	Salzlakenkäse	NT	Verzehrfertig	850	Individuell	10.11.2022
F54	Türkei	Butter	Rind	Verzehrfertig	1000	Industriell	10.11.2022
F55	Türkei	Käse	Schaf	Verzehrfertig	580	Industriell	10.11.2022
F56	Türkei	Salzlakenkäse	Schaf	Verzehrfertig	740	Industriell	10.11.2022
F57	Türkei	Käse	Rind	Verzehrfertig	315	Industriell	10.11.2022
F58	Türkei	Salzlakenkäse	Schaf	Verzehrfertig	630	Industriell	10.11.2022
F59	Türkei	Wurst	Rind	Verzehrfertig Roh / Nicht	780	Industriell	10.11.2022
F60	Moldawien	Fleisch	Geflügel	verzehrfertig	980	Individuell	14.11.2022
F61	Moldawien	Fleisch, gekocht	Geflügel	Verzehrfertig Roh / Nicht	400	Individuell	14.11.2022
F62	Moldawien	Fleisch	Geflügel	verzehrfertig Roh / Nicht	1200	Individuell	14.11.2022
F63	Kasachstan	Fleisch	Geflügel	verzehrfertig	663	Individuell	14.11.2022
F64	Moldawien	Fleisch, gekocht	Schwein	Verzehrfertig	420	Individuell	14.11.2022
F65	Kasachstan	Brühwurst	NT	Verzehrfertig Roh / Nicht	1500	Individuell	15.11.2022
F66	Kasachstan	Fleisch	NT	verzehrfertig	630	Individuell	15.11.2022
F67	Moldawien	Salzlakenkäse	Schaf	Verzehrfertig Roh / Nicht	720	Individuell	14.11.2022
F68	Kasachstan	Fleisch	Geflügel	verzehrfertig Roh / Nicht	4000	Individuell	15.11.2022
F69	Kasachstan	Fleisch	Rind	verzehrfertig	1200	Individuell	15.11.2022
F70	Thailand	Rohwurst	NT	Verzehrfertig	1600	Individuell	15.11.2022
F71	Thailand	Rohwurst	NT	Verzehrfertig	1060	Individuell	15.11.2022
F72	Türkei	Salzlakenkäse	NT	Verzehrfertig	1070	Individuell	13.11.2022
F73	Türkei	Käse	NT	Verzehrfertig	1700	Individuell	13.11.2022
F74	Moldawien	Käse	Schaf	Verzehrfertig	590	Individuell	14.11.2022
F75	Türkei	Käse	NT	Verzehrfertig	416	Individuell	15.11.2022
F76	Türkei	Salzlakenkäse	NT	Verzehrfertig	1100	Individuell	15.11.2022
F77	Türkei	Salzlakenkäse	NT	Verzehrfertig	960	Individuell	15.11.2022
F78	Türkei	Salzlakenkäse	NT	Verzehrfertig	685	Individuell	15.11.2022
F79	Moldawien	Wurst mit rohem Fleischanteil	Schwein	verzehrfertig Roh / Nicht	677	Individuell	15.11.2022
F80	Kasachstan	Fleisch	NT	verzehrfertig	200	Individuell	15.11.2022

9. Anhang

F81	Vietnam	Rohwurst	Schwein	Verzehrfertig	200	Industriell	15.11.2022
F82	Vietnam	Rohwurst	Schwein	Verzehrfertig	200	Industriell	15.11.2022
F83	Vietnam	Rohwurst	Schwein	Verzehrfertig	200	Industriell	15.11.2022
F84	Vietnam	Rohwurst	Schwein	Verzehrfertig	200	Industriell	15.11.2022
F85	Thailand	Brühwurst	Schwein	Verzehrfertig	1000	Industriell	15.11.2022
F86	Vietnam	Brühwurst	Schwein	Verzehrfertig	200	Industriell	15.11.2022
F87	Vietnam	Fleisch, gekocht	Schwein	Verzehrfertig	800	Industriell	15.11.2022
F88	Vietnam	Fleisch, getrocknet	Geflügel	Verzehrfertig	400	Industriell	15.11.2022
F89	Thailand	Fleisch, eingelegt	NT	Verzehrfertig	205	Industriell	15.11.2022
F90	Thailand	Fleisch, getrocknet	Geflügel	Verzehrfertig Roh / Nicht	308	Individuell	15.11.2022
F91	Kasachstan	Fleisch	Geflügel	verzehrfertig Roh / Nicht	650	Individuell	20.11.2022
F92	Kasachstan	Fleisch	Geflügel	verzehrfertig Roh / Nicht	835	Individuell	20.11.2022
F93	Kasachstan	Fleisch, Fleisch,	Geflügel	verzehrfertig	620	Individuell	20.11.2022
F94	Kasachstan	eingelegt	Rind	Verzehrfertig	840	Individuell	20.11.2022
F95	Moldawien	Wurst	Rind	Verzehrfertig	328	Individuell	05.12.2022
F96	Moldawien	Rohwurst	Schwein	Verzehrfertig	340	Industriell	05.12.2022
F97	Moldawien	Rohwurst	Schwein	Verzehrfertig	365	Industriell	05.12.2022
F98	Moldawien	Rohwurst	Schwein	Verzehrfertig	350	Industriell	05.12.2022
F99	Moldawien	Rohwurst	Schwein	Verzehrfertig	810	Industriell	05.12.2022
F100	Moldawien	Käse	Rind	Verzehrfertig	500	Industriell	05.12.2022

^aVerpackungsform, die auf eine Herstellung im Privathaushalt schließen lässt. ^bNT = nicht typisierbar, Tierart nicht angegeben bzw. nicht auf Probenbegleitschein vermerkt. ^cVerpackungsform lässt auf eine industrielle Herstellung schließen, Verpackung mit Informationen bezüglich der Produktart, der Tierart, Zutaten/Inhalt sowie des Mindesthaltbarkeitsdatum. ^dKäse, bei dem es sich nicht um Salzlakenkäse handelt.

Tabelle 11.: Hygieneparameter der untersuchten legal importierten Rindfleischproben (Publikation 1)

Proben-Nr.	AKZ ^a	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>E. coli</i>
(Werte in log ₁₀ KbE/g)			
H1	8,00	5,97	-
H2	5,08	4,90	-
H3	6,20	-	-
H4	6,89	4,32	-
H5	8,46	4,28	-
H6	8,30	4,11	-
H7	9,26	8,69	5,94
H8	7,26	3,96	-
H9	7,66	3,95	-
H10	8,54	4,82	-
H11	8,23	5,00	-
H12	8,98	4,28	-
H13	7,59	6,04	-
H14	7,18	6,08	-
H15	8,08	4,99	-
H16	8,18	-	-
H17	8,00	3,70	-
H18	8,11	6,23	-
H19	8,00	5,52	-
H20	8,38	5,89	-
H21	8,36	4,91	-
H22	8,08	4,97	-
H23	8,08	5,18	-
H24	6,32	3,28	-
H25	8,99	6,30	-
H26	7,20	6,41	-
H27	7,28	3,41	-
H28	7,04	-	-
H29	7,45	4,23	-
H30	8,40	5,97	-
H31	8,41	5,36	-
H32	9,63	5,85	-
H33	9,49	5,43	-
H34	9,46	6,61	-
H35	5,15	-	-
H36	9,00	2,32	-
H37	7,00	4,26	-
H38	5,32	3,63	-
H39	8,15	5,00	-
H40	8,26	4,34	-
H41	8,77	4,04	-
H42	6,40	-	-
H43	6,34	4,18	-
H44	4,18	-	-
H45	7,78	4,80	-
H46	8,04	6,81	-
H47	5,18	3,61	-
H48	8,00	6,81	-
H49	7,11	6,87	-
H50	8,00	6,08	2,00
H51	8,15	5,54	1,90
H52	7,87	4,97	-
H53	8,36	-	-
H54	5,52	6,04	-
H55	5,36	-	-
H56	8,08	5,45	-
H57	7,89	6,77	-
H58	7,59	5,08	-
H59	8,36	-	-
H60	8,38	6,30	-
H61	8,30	7,11	-
H62	9,32	5,11	-

9. Anhang

H63	7,95	6,11	-
H64	6,11	5,79	-
H65	8,11	6,56	-
H66	7,79	-	-
H67	5,97	5,91	-
H68	7,28	-	-
H69	8,36	3,59	-
H70	8,15	2,83	-
H71	8,66	4,71	-
H72	4,28	-	-
H73	5,23	1,73	-
H74	6,20	5,15	-
H75	8,08	6,11	-
H76	8,11	5,68	-
H77	6,20	6,04	-
H78	7,95	-	-
H79	6,28	-	-
H80	10,04	4,23	-
H81	7,26	3,04	-
H82	5,48	4,34	-
H83	6,26	1,70	-
H84	9,26	5,38	-
H85	9,73	3,67	-
H86	7,11	3,51	-
H87	8,28	4,88	-
H88	7,83	-	-
H89	8,32	6,08	-
H90	8,36	5,28	-
H91	8,38	-	-
H92	7,86	3,36	-
H93	8,04	-	-
H94	8,94	5,20	-
H95	8,08	4,34	-
H96	8,04	1,72	-
H97	7,81	3,58	-
H98	8,79	5,15	-
H99	8,41	4,11	-
H100	8,65	2,83	-

^aAKZ = Aerobe mesophile Gesamtkeimzahl

Tabelle 12.: Hygieneparameter der illegal importierten Lebensmittel tierischer Herkunft (Publikation 2).

Proben-Nr.	Produktart	Tierart	AKZ ^a <i>Enterobacteriaceae</i> <i>E. coli</i>		
			(Werte in log ₁₀ KbE/g)		
F1	Lammfleisch, gekocht	Lamm	7,46	-	-
F2	Butter	Rind	6,38	6,20	-
F3	Frischkäse	NT ^b	5,20	2,90	-
F4	Butter	Rind	6,38	-	-
F5	Schmand	Rind	7,38	-	-
F6	Fett mit Fleischstücken	Schaf	8,73	5,18	3,57
F7	Butter	Rind	6,26	-	-
F8	Salzlakenkäse	NT	8,49	6,51	4,60
F9	Käse ^c , in Scheiben	Rind	4,51	2,92	-
F10	Fleisch, getrocknet	Rind	6,94	5,75	4,97
F11	Salzlakenkäse	Schaf	5,00	5,30	3,56
F12	Fett	Schaf	8,94	6,26	3,48
F13	Fleisch	Rind	4,43	-	-
F14	Brühwurst	Rind	7,08	-	-
F15	Fleisch, gekocht	Rind	7,18	-	-
F16	Käse	NT	7,15	2,52	1,85
F17	Butter	Rind	6,84	-	-
F18	Fleisch, gekocht, mariniert	Geflügel	5,23	-	-
F19	Rohwurst	Schwein	1,86	-	-
F20	Rohwurst	Schwein	2,00	-	-
F21	Fleisch	Geflügel	8,46	6,81	4,18
F22	Käse	NT	4,30	4,81	3,04
F23	Frischkäse	Rind	7,15	-	-
F24	Fett mit rohen Fleischstücken	Schaf	8,15	-	4,61
F25	Fett	Lamm	5,85	5,18	-
F26	Milchpulver	Rind	1,95	-	-
F27	Butter	Rind	1,48	-	-
F28	Rohwurst	Rind	7,21	-	-
F29	Käse	Rind	5,60	-	-
F30	Rohwurst	Rind	8,34	4,40	2,82
F31	Käse	NT	3,40	-	-
F32	Käse	NT	8,99	3,04	2,97
F33	Butter	Rind	3,04	-	-
F34	Butter	Rind	5,15	-	-
F35	Käse	Rind	5,58	-	-
F36	Brühwurst	Geflügel	2,46	-	-
F37	Fleisch, getrocknet	Geflügel	2,93	7,15	-
F38	Rohwurst mit rohen Fleischstücken	Schwein	8,97	7,08	2,77
F39	Brühwurst	Rind	8,38	5,34	-
F40	Fleisch, getrocknet, gewürzt	Geflügel	7,41	7,15	4,80
F41	Fleisch	Rind	8,92	2,77	-
F42	Käse	Rind	7,40	2,77	1,73
F43	Fleisch, getrocknet	Schwein	4,78	-	-
F44	Wurst	Schwein	8,79	-	-

9. Anhang

F45	Fleisch, getrocknet	Schwein	7,15	-	-
F46	Rohwurst	Schwein	3,18	-	-
F47	Käse	Rind	1,86	-	-
F48	Fleisch	Geflügel	7,41	6,18	3,54
F49	Fleisch, gekocht	Rind	9,76	7,46	-
F50	Butter	Rind	2,08	-	-
F51	Salzlakenkäse	Rind	5,04	-	2,36
F52	Käse, in Scheiben	NT	8,46	2,90	-
F53	Salzlakenkäse	NT	9,08	7,20	4,69
F54	Butter	Rind	4,59	-	1,73
F55	Käse	Schaf	6,41	3,51	-
F56	Salzlakenkäse	Schaf	5,93	-	-
F57	Käse	Rind	4,59	-	-
F58	Salzlakenkäse	Schaf	5,28	-	-
F59	Wurst	Rind	6,76	-	-
F60	Fleisch	Geflügel	8,00	5,72	-
F61	Fleisch, gekocht	Geflügel	9,23	6,15	-
F62	Fleisch	Geflügel	9,00	5,79	3,41
F63	Fleisch	Geflügel	8,64	4,51	-
F64	Fleisch, gekocht	Schwein	8,15	-	-
F65	Brühwurst	NT	7,26	-	-
F66	Fleisch	NT	8,80	4,26	-
F67	Salzlakenkäse	Schaf	7,08	2,94	3,11
F68	Fleisch	Geflügel	8,11	-	-
F69	Fleisch	Rind	7,26	4,65	-
F70	Rohwurst	NT	6,08	3,84	-
F71	Rohwurst	NT	6,90	-	-
F72	Salzlakenkäse	NT	6,83	-	-
F73	Käse	NT	5,51	-	-
F74	Käse	Schaf	6,88	-	-
F75	Käse	NT	6,46	-	-
F76	Salzlakenkäse	NT	7,04	6,68	5,23
F77	Salzlakenkäse	NT	6,59	6,23	4,64
F78	Salzlakenkäse	NT	7,99	3,08	2,11
F79	Wurst mit rohem Fleischanteil	Schwein	8,00	-	-
F80	Fleisch	NT	4,65	-	-
F81	Rohwurst	Schwein	2,18	-	-
F82	Rohwurst	Schwein	2,32	-	-
F83	Rohwurst	Schwein	1,26	-	-
F84	Rohwurst	Schwein	2,62	-	-
F85	Brühwurst	Schwein	3,32	-	-
F86	Brühwurst	Schwein	3,86	-	-
F87	Fleisch, gekocht	Schwein	3,80	-	-
F88	Fleisch, getrocknet	Geflügel	3,73	-	-
F89	Fleisch, eingelegt	NT	6,91	-	-
F90	Fleisch, getrocknet	Geflügel	7,83	-	-
F91	Fleisch	Geflügel	8,90	-	-
F92	Fleisch	Geflügel	8,58	-	-
F93	Fleisch	Geflügel	8,34	-	-

9. Anhang

F94	Fleisch, eingelegt	Rind	8,72	-	-
F95	Wurst	Rind	7,34	-	-
F96	Rohwurst	Schwein	6,96	-	-
F97	Rohwurst	Schwein	2,65	-	-
F98	Rohwurst	Schwein	2,65	-	-
F99	Rohwurst	Schwein	6,11	-	-
F100	Käse	Rind	2,65	-	-

^aAKZ = Aerobe mesophile Gesamtkeimzahl. ^bNT = nicht typisierbar, Tierart nicht angegeben bzw. nicht auf Probenbegleitschein vermerkt. ^cKäse, bei dem es sich nicht um Salzlakenkäse handelt.

Tabelle 13.: Phylogenetische Gruppen der untersuchten *E. coli*-Isolate, isoliert aus illegal importierten Lebensmitteln tierischer Herkunft.

Isolat-Nr.	Phylogenetische Gruppe ^a
<u>Präsumtiv kommensale <i>E. coli</i></u>	
Fc6	D
Fc8	B1
Fc10	B1
Fc11	B1
Fc12	A
Fc38	A
Fc16	A
Fc21	A
Fc22	A
Fc24	A
Fc30	A
Fc32	B1
Fc38	A
Fc40	A
Fc42	B1
Fc48	B1
Fc51	A
Fc53	A
Fc54	A
Fc62	A
Fc67	A
Fc76	A
Fc77	A
Fc78	A
<u>STEC</u>	
Fs24	B1
<u>ESBL-bildende <i>E. coli</i></u>	
Fe22	A
Fe45	B1
Fe53	A
Fe72	A

^aEinteilung in phylogenetische Gruppen (A, B1, B2, D) anhand der An- bzw. Abwesenheit drei bestimmter Gen-Abschnitte (*chuA*, *yjaA* und TspE4.C2) (Clermont et al. 2000).

Danksagung

Vielen Dank an Frau Prof. Corinna Kehrenberg für die Möglichkeit am Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde zu promovieren, die Bereitstellung meines überaus interessanten Dissertationsthemas und der fachlichen Unterstützung. Ich habe in dieser Zeit sehr viel lernen dürfen.

Ich bedanke mich zudem für die großartige Zusammenarbeit mit dem Veterinär- und Einfuhramt des Hamburger Hafens. Namentlich möchte ich mich insbesondere bei Dr. Katharina Wadepohl bedanken für ihren persönlichen Einsatz und die großartigen Einblicke in die Arbeit an der Grenzkontrollstelle des Hafen Hamburgs. In diesem Sinne danke ich auch Dr. Bettina Gerulat.

Zudem danke ich Dr. Gabriel Greif für die Unterstützung während meines Promotionsvorhabens und der fachlichen und persönlichen Beratung sowie allen Mitarbeitenden des Landesbetriebes Hessisches Landeslabors sowie explizit des Perishable Center des Flughafens Frankfurt am Main. In diesem Sinne gilt ein besonderer Dank auch Frau Dagmar Stiefel. Ihr/Euer Einsatz war keinesfalls selbstverständlich und ich wusste ihn sehr zu schätzen.

Herzlichen Dank an Dr. Anja Müller und Prof. Ann-Sophie Braun, die mich fachlich unterstützt und gefördert haben. Eure Fachkenntnisse sowie Eure präzise und sorgfältige Arbeitsweise sind bewundernswert.

Mein großer Dank gilt allen Kollegen und Kolleginnen am Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde. Insbesondere bedanke ich mich bei Claudia Walter, Cornelia Dürrschmidt, Karin Simon, Ulla Fränzle und Jan Paulus, meinem privaten Labormanager. Danke für die professionelle Unterstützung im Labor und vor allem die angenehme, herzliche Arbeitsatmosphäre. Ihr habt meine Zeit am Institut zu etwas sehr Besonderem gemacht. Louisa Giebler, ein besonderer Dank gilt Dir. Diese Freundschaft wird weit über die Doktorarbeitszeit hinausgehen.

Danke an die Praxis Pöppel GmbH, meinem jetzigen Arbeitgeber. Eine Fertigstellung der Doktorarbeit ohne Eure Unterstützung und Flexibilität wäre nicht möglich gewesen. Ihr seid ein großartiges Team und ich bin stolz darauf, dass ich zu Euch gehören darf.

Ein weiterer riesiger Dank gilt meinen wunderbaren Freunden für die liebevolle Unterstützung während dieser Zeit und, dass ihr immer an mich geglaubt habt.

Der größte Dank gilt meiner gesamten Familie. Es gibt keine Worte, die meine Liebe zu Euch beschreiben könnten. Deswegen ist diese Arbeit Euch gewidmet. Meine kleine Familie mit meinem Ehemann Dome und Lia, Mama und Dirk, Katha, Fabio, Philip und Henri. Ihr seid mein Zuhause. Danke an meinen Papa, der ein Aufgeben niemals zugelassen hätte, an Petra, an meine lieben Omis, die in vielerlei Hinsicht ein großes Vorbild für mich sind und an meinen bewundernswerten Opa. Opa, ich weiß, dass du bei mir bist. Danke an meinen Onkel Peter, an Mira und Basti für das Vorleben von Mut und Neugier. Ein großes Dankeschön zudem an meine liebenswerte Leipzig-Familie. Ich bin unendlich reich, denn ich habe Euch.