

**Aus dem Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde  
der Justus-Liebig-Universität Gießen**



**Vergleichende Untersuchungen zum Salmonellen-  
Nachweis aus Lebensmitteln mit der revidierten  
ISO-Methode (ISO 6579:2002) unter besonderer  
Berücksichtigung  
chromogener Nährmedien**

**INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Doktorgrades beim  
Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen**

**Eingereicht von  
JANA VANESSA SCHÖNENBRÜCHER**

**Gießen 2006**

Aus dem Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. M. Bülte

Vergleichende Untersuchungen zum Salmonellen-Nachweis  
aus Lebensmitteln mit der revidierten ISO-Methode (ISO  
6579:2002) unter besonderer Berücksichtigung  
chromogener Nährmedien

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Doktorgrades beim  
Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von  
JANA VANESSA SCHÖNENBRÜCHER  
Tierärztin aus Bochum

Gießen 2006

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

Dekan: Prof. Dr. M. Reinacher

---

1. Berichterstatter: Prof. Dr. M. Bülte

2. Berichterstatter: Prof. Dr. R. Bauerfeind

Tag der mündlichen Prüfung: 27.11.2006

**Holger, Alrun und meinen Eltern**

Einige Ergebnisse dieser wissenschaftlichen Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

SCHÖNENBRÜCHER, V., P. HATTENDORF und M. BÜLTE (2002):

Neue Nährmedien zum Salmonellen-Nachweis.

Poster, 4. Fachsymposium der Fachgruppe Lebensmittelmikrobiologie und -hygiene der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Medizin (DGHM) und der Vereinigung für allgemeine und angewandte Mikrobiologie (VAAM), 21.-22.03.2002, Karlsruhe

SCHÖNENBRÜCHER, V., P. HATTENDORF und M. BÜLTE (2002):

Neue chromogene Nährmedien zum Nachweis von Salmonellen.

Vortrag, Proceed. 43. Arbeitstagung des „Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene“ der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG), 24.09.–27.09.2002, Garmisch-Partenkirchen, DVG Service GmbH Gießen, 267-272

HATTENDORF, P., V. SCHÖNENBRÜCHER und M. BÜLTE (2002):

Methodischer Vergleich der neuen ISO 6579:2002 mit dem geltenden horizontalen Verfahren zum Nachweis von Salmonellen aus Lebensmitteln.

Vortrag, Proceed. 43. Arbeitstagung des „Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene“ der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG), 24.09.–27.09.2002, Garmisch-Partenkirchen, DVG Service GmbH Gießen, 261-266

SCHÖNENBRÜCHER, V., P. HATTENDORF, P. SIMON, H. SCHÖNENBRÜCHER und M. BÜLTE (2003):

Erfahrungen zum Einsatz neuerer chromogener Nährmedien in der lebensmittelmikrobiologischen Diagnostik von Salmonellen und Listerien.

Poster, 5. Fachsymposium der Fachgruppe Lebensmittelmikrobiologie und -hygiene der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Medizin (DGHM) und der Vereinigung für allgemeine und angewandte Mikrobiologie (VAAM), 08.05.-10.05.2003, Kloster Seeon

SCHÖNENBRÜCHER, V. und M. BÜLTE (2004):

Neue Nährmedien in der lebensmittelmikrobiologischen Diagnostik von Salmonellen.

Poster, 4. Symposium „Schnellmethoden und Automatisierung in der Lebensmittelmikrobiologie“, Tagung der Fachgruppe Lebensmittelmikrobiologie und -hygiene der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Medizin (DGHM) und der Vereinigung für allgemeine und angewandte Mikrobiologie (VAAM), der TZL-MiTec GmbH a.d. FH Lippe und des Fachbereichs Lebensmitteltechnologie der Fachhochschule Lippe, 14.07.-16.07.2004, Lemgo

SCHÖNENBRÜCHER, V., P. HATTENDORF und M. BÜLTE (2004):

Neue chromogene Nährmedien zum Nachweis von Salmonellen.

Fleischwirtsch. 84, 218-220

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Literaturübersicht</b>	<b>2</b>
2.1	Charakteristische Eigenschaften von Salmonellen	2
2.2	Taxonomie und Nomenklatur	2
2.3	Geschichte	7
2.4	Virulenz	8
2.5	Verbreitung und Reservoir bei Lebensmittel-liefernden Tieren	9
2.6	Bedeutung der humanen Salmonellose	12
2.7	Infektionsdosis und Erkrankungsbild	13
2.8	Lebensmittel als Infektionsquelle	14
2.9	Mikrobiologische Kriterien für Salmonellen in Lebensmitteln	21
2.9.1	Lebensmittelsicherheitskriterien	24
2.9.2	Prozesshygienekriterien	25
2.10	Kulturelle Verfahren zum Nachweis von Salmonellen aus Lebensmitteln	26
2.10.1	Referenzverfahren	26
2.10.1.1	Neues Referenzverfahren nach ASUV § 64 LFGB	29
2.10.1.2	Altes Referenzverfahren nach ASUV § 64 LFGB	32
2.10.1.3	Alternatives Verfahren zur Untersuchung von Milch und Milchprodukten	36
2.10.2	Herkömmliche flüssige Nährmedien zur Voranreicherung	37
2.10.3	Herkömmliche flüssige Nährmedien zur Selektivanreicherung	40
2.10.4	Herkömmliche feste Nährmedien zur Subkultivierung	43
2.10.5	Chromogene Nährmedien	46
2.11	Polymerasekettenreaktion zum Nachweis von Salmonellen aus Lebensmitteln	53
<b>3</b>	<b>Eigene Untersuchungen</b>	<b>55</b>
3.1	Ziel der Untersuchungen	55
3.2	Material	56
3.2.1	Bakterienkulturen	56
3.2.2	Probenmatrix	59
3.2.3	Nährmedien	61
3.2.3.1	Anreicherungsmedien und Probenvorbereitung	61
3.2.3.2	Subkultivierungsmedien	62
3.2.4	Reagenzien	66
3.2.4.1	Kolorimetrischer Schnelltest	66
3.2.5	Laborgeräte und Verbrauchsmaterial	67
3.3	Methoden	69
3.3.1	Aufbewahrung und Anzüchtung von Prüfstämmen	69
3.3.2	Teilversuch 1: Leistungsprüfung der <i>Salmonella</i> -Selektivnährmedien	69
3.3.3	Kulturelle Referenzverfahren zum Nachweis von Salmonellen aus Lebensmitteln	71
3.3.3.1	Teilversuch 2: Einmischversuche	71
3.3.3.2	Teilversuch 3: Untersuchung nativer Proben	74
3.3.4	Statistische Methoden	76

<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>78</b>
4.1	Teilversuch 1: Produktivität und Selektivität	78
4.2	Teilversuch 1: Kolonimorphologische Charakterisierung	81
4.2.1	Typisch erscheinende <i>Salmonella</i> -Stämme	81
4.2.2	Atypisch erscheinende <i>Salmonella</i> -Stämme	82
4.2.3	Non- <i>Salmonella</i> -Prüfstämme	87
4.3	Teilversuch 2: Artifiziiell kontaminierte Lebensmittelproben	97
4.3.1	Vergleichende Untersuchungen zur Verlängerung der Inkubationsdauer um weitere 24 Stunden	97
4.3.2	Selenit-Cystin-Medium	101
4.3.3	Tetrathionat-Anreicherung nach Muller Kauffmann mit Novobiocin	102
4.3.4	Rappaport-Vassiliadis-Anreicherung mit Sojamehlpepton	102
4.3.5	Vergleichende Untersuchungen zu den Referenznährböden	103
4.4	Teilversuch 3: Untersuchungen anhand nativer Lebensmittelproben	103
4.4.1	Aerobe mesophile Keimzahl der Hackfleisch- und Geflügelfleischproben	104
4.4.2	Anteil <i>Salmonella</i> -positiver Hackfleisch- und Geflügelfleischproben	107
4.4.3	<i>Salmonella</i> -Nachweishäufigkeit in Abhängigkeit von Kultivierungsdauer und -nährmedium	109
4.4.4	Vergleich der kulturellen Referenzmethoden: Statistischer Test auf Unterlegenheit	119
4.4.5	Sensitivität, Spezifität und Produktivität der Selektivnährmedien	121
4.4.6	Anzahl und Verteilung der isolierten <i>Salmonella</i> -Serovare	122
4.4.7	Kolorimetrische Bestätigung mit O.B.I.S.	125
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>126</b>
5.1	Methodische Aspekte	126
5.1.1	Zusammensetzung der Nährmedien	126
5.1.2	Neues horizontales Referenzverfahren	127
5.1.3	Optimale Inkubationstemperaturen für die Tetrathionat-Anreicherung	129
5.1.4	Verschiedene Methoden zur artifiziiellen Kontamination von Lebensmittelmatrizes	130
5.1.5	Probenahmeverfahren am Geflügelschlachttierkörper: „Broiler Carcass Rinsing“	131
5.1.6	Berechnung der Ergebnisse	132
5.2	Diskussion der Ergebnisse	133
5.2.1	Fehlerhafte Detektion einzelner Serovaren	133
5.2.2	Ergebnisse aus dem Modellversuch	137
5.2.3	Nachuntersuchung tiefgefrorener Proben	138
5.2.4	Methodischer Vergleich kultureller Nachweisverfahren von Salmonellen in frischem Fleisch und Innereien	138
5.2.5	Eignung flüssiger Anreicherungsmedien	140
5.2.6	Eignung fester Subkultivierungsmedien	143
5.2.7	Verlängerung der Anreicherungszeiten um weitere 24 Stunden	144
5.2.8	Serovar- und Resistenzspektrum der Isolate	146

<b>6</b>	<b>Schlussfolgerungen</b>	<b>148</b>
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>149</b>
<b>8</b>	<b>Summary</b>	<b>150</b>
<b>9</b>	<b>Anhang</b>	<b>151</b>
<b>10</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>156</b>

## Verzeichnis häufig verwendeter Einheiten und Abkürzungen

°C	Grad Celsius
§	Paragraph
%	Prozent
Abb.	Abbildung
ASAP	AES-Salmonellen-Agar-Platte
ASUV	Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren
Aqua dest.	Aqua destillata
bzw.	beziehungsweise
Bp	Basenpaar
BPLS	Brillantgrün-Phenolrot-Laktose-Saccharose-Agar
BPW	„Buffered Peptone Water“ (Gepuffertes Peptonwasser)
d. h.	das heisst
DIN	Deutsches Institut für Normung e. V.
DNA	„Deoxyribonucleic Acid“ (Desoxyribonukleinsäure)
EN	Europäische Norm
engl.	Englisch
et al.	„et alii“ (und andere)
g	Gramm
h	Stunde(n)
Hrsg.	Herausgeber
IDF	International Dairy Federation
ISO	International Organization for Standardization
KbE	Kolonie-bildende Einheiten
l	Liter
LMBG	Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetz
LFGB	Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch
ml	Milliliter
MKTTn	Tetrathionat-Anreicherung nach Muller Kauffmann mit Novobiocin
MM	Miller-Mallinson-Agar
n	Anzahl
OSCM	Oxid <i>Salmonella</i> Chromogen-Medium
PCR	„Polymerase Chain Reaction“ (Polymerasekettenreaktion)

$p$	Wahrscheinlichkeit
pH	Wasserstoffionenkonzentration
RVS	Rappaport-Vassiliadis-Anreicherung mit Sojamehlpepton
$s$	Standardabweichung
S.	<i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>enterica</i>
SC	Selenit-Cystin-Medium
sp./spp.	Spezies (Singular/Plural)
ssp.	Subspezies
Tab.	Tabelle
u. z.	und zwar
$\bar{x}$	Arithmetischer Mittelwert
XLD	Xylose-Lysin-Desoxycholat-Agar
XLT4	Xylose-Lysin-Tergitol 4-Agar
z. B.	zum Beispiel

**Tabellenverzeichnis**

Tabelle 2-1: Nomenklatur und Taxonomie des Genus <i>Salmonella</i> (nach LE MINOR und POPOFF, 1987; REEVES et al., 1989; JUDICIAL COMMISSION OF THE INTERNATIONAL COMMITTEE ON SYSTEMATICS OF PROKARYOTES, 2005 und TINDALL et al., 2005)	3
Tabelle 2-2: Zulässige Nomenklatur einiger <i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>enterica</i> -Serovare (nach TINDALL et al., 2005)	5
Tabelle 2-3: <i>Salmonella</i> -kontaminierte Lebensmittel-Planproben mit Befallsrate und den entsprechenden Anteilen an <i>S. Enteritidis</i> und <i>S. Typhimurium</i> für das Jahr 2004 (modifiziert nach HARTUNG, 2006)	16
Tabelle 2-4: Literatursauswahl über aktuelle lebensmittelbedingte Salmonellose-Ausbrüche in Europa	19
Tabelle 2-5: Mikrobiologische Kriterien für Salmonellen in ausgewählten Lebensmitteln (modifiziert nach KYPRIANOU, 2005)	22
Tabelle 2-6: Auswahl an kulturellen Referenzverfahren zum Nachweis von Salmonellen aus Lebensmitteln (modifiziert nach SCHMIDT-LORENZ, 1980 <sup>1</sup> ; ANDREWS, 1992 <sup>2</sup> ; BECKER ET AL., 1993 <sup>3</sup> ; TIETJEN und FUNG, 1995 <sup>4</sup> )	28
Tabelle 2-7: Rezeptur des gepufferten Peptonwassers (BPW) gemäß DIN EN 12824:1998 und DIN EN ISO 6579:2003	34
Tabelle 2-8: Rezeptur von RV(S)-Medium gemäß DIN EN 12824:1998 und DIN EN ISO 6579:2003	35
Tabelle 2-9: Flüssige Standardnährmedien für die Voranreicherung von Salmonellen (nach D'AOUST, 1981)	39
Tabelle 2-10: Identifizierung von Salmonellen und weiteren Enterobacteriaceae anhand von spezifischen chromogenen Substraten als Bestandteil verschiedener neuartiger Selektivnährmedien (modifiziert nach RUIZ et al., 1996; PEREZ et al., 2003)	50
Tabelle 3-1: Herkunft ausgewählter Prüfstämme (n = 36)	57
Tabelle 3-2: Anteile verschiedener Probenmatrizes aus Untersuchungen nativer Lebensmittelproben (n = 286)	60
Tabelle 3-3: Herkömmliche Subkultivierungsmedien zum Nachweis von Salmonellen	63
Tabelle 3-4: Chromogene Subkultivierungsmedien zum Nachweis von Salmonellen	64
Tabelle 3-5: Inkubationsbedingungen und Keimspektren verschiedener <i>Salmonella</i> -Subkultivierungsmedien	65
Tabelle 4-1: Produktivität [AGI] von <i>Salmonella</i> -Prüfstämmen (n = 27) auf sechs <i>Salmonella</i> -Selektivnährmedien	79

Tabelle 4-2: Selektivität [RGI] von neun ausgewählten Non- <i>Salmonella</i> -Prüfstämmen auf sechs <i>Salmonella</i> -Selektivnährmedien	80
Tabelle 4-3: Koloniemorphologie typischer <i>Salmonella</i> spp. auf Selektivmedien	82
Tabelle 4-4: Koloniemorphologie eines <i>S. Derby</i> -Stammes (BgVV 1454/61) auf Selektivmedien	83
Tabelle 4-5: Koloniemorphologie eines <i>S. Dublin</i> -Stammes (x-O162/98) auf Selektivmedien	84
Tabelle 4-6: Koloniemorphologie eines <i>Salmonella arizonae</i> -Stammes (AES 8.1.) auf Selektivmedien	85
Tabelle 4-7: Koloniemorphologie eines <i>S. Senftenberg</i> -Stammes (DSM 10062) auf Selektivmedien	86
Tabelle 4-8: Koloniemorphologie von Non- <i>Salmonella</i> auf BPLS	88
Tabelle 4-9: Koloniemorphologie von Non- <i>Salmonella</i> auf XLD	89
Tabelle 4-10: Koloniemorphologie von Non- <i>Salmonella</i> auf XLT4	90
Tabelle 4-11: Koloniemorphologie von Non- <i>Salmonella</i> auf MM	91
Tabelle 4-12: Koloniemorphologie von Non- <i>Salmonella</i> auf ASAP	92
Tabelle 4-13: Koloniemorphologie von Non- <i>Salmonella</i> auf OSCM	93
Tabelle 4-14: Wachstumsverhalten von Non- <i>Salmonella</i> -Prüfstämmen auf sechs verschiedenen <i>Salmonella</i> -Selektivnährmedien	95
Tabelle 4-15: Fehlerhafte Detektion von <i>Salmonella</i> - und Nicht- <i>Salmonella</i> -Prüfstämmen (n = 7) auf sechs verschiedenen Selektivmedien	96
Tabelle 4-16: Teilversuch 3: <i>Salmonella</i> -positive Proben (n = 39) aus Untersuchungen nativer Lebensmittelproben	108
Tabelle 4-17: Vierfeldertafel zum Vergleich einer verlängerten Anreicherung in RVS und in SC-Medium anhand des MCNEMAR-Vorzeichentests (MCNEMAR, 1947)	112
Tabelle 4-18: Vierfeldertafel zum Vergleich einer verkürzten Anreicherung in RVS und in MKTTn anhand des MCNEMAR-Vorzeichentests (MCNEMAR, 1947)	113
Tabelle 4-19: Vierfeldertafel zum Vergleich einer verkürzten und einer verlängerten Anreicherung in SC anhand des MCNEMAR-Vorzeichentests (MCNEMAR, 1947)	114
Tabelle 4-20: Vierfeldertafel zum Vergleich einer verkürzten und einer verlängerten Anreicherung in MKTTn anhand des MCNEMAR-Vorzeichentests (MCNEMAR, 1947)	115

Tabelle 4-21: Vierfeldertafel zum Vergleich einer verkürzten und einer verlängerten Anreicherung in RVS und Subkultivierung auf XLD anhand des MCNEMAR-Vorzeichentests (MCNEMAR, 1947)	116
Tabelle 4-22: Vierfeldertafel zum Vergleich einer verkürzten und einer verlängerten Anreicherung in RVS und Subkultivierung auf XLD und BPLS anhand des MCNEMAR-Vorzeichentests (MCNEMAR, 1947)	117
Tabelle 4-23: Vierfeldertafel zum Vergleich einer verkürzten und einer verlängerten Anreicherung in RVS und Subkultivierung auf BPLS anhand des MCNEMAR-Vorzeichentests (MCNEMAR, 1947)	118
Tabelle 4-24: Vierfeldertafel zum Vergleich der <i>Salmonella</i> -Referenzmethoden anhand des MCNEMAR-Vorzeichentests (MCNEMAR, 1947)	120
Tabelle 4-25: Anzahl und Verteilung der <i>Salmonella</i> -Isolate (n = 43) aus 39 Hackfleisch- und Geflügelfleischproben	123
Tabelle 4-26: Kolorimetrische Bestätigung mit dem O.B.I.S. <i>Salmonella</i> Test	125
Tabelle 9-1: Reisolierung (n[%]) von Salmonellen aus artifiziell kontaminierten Hackfleischproben: 1-10 KbE <i>S. Typhimurium</i> /25 g Hackfleisch	151
Tabelle 9-2: Reisolierung (n[%]) von Salmonellen aus artifiziell kontaminierten Hackfleischproben: 11-50 KbE <i>S. Typhimurium</i> /25 g Hackfleisch	152
Tabelle 9-3: Reisolierung (n[%]) von Salmonellen aus artifiziell kontaminierten Hackfleischproben: 51-200 KbE <i>S. Typhimurium</i> /25 g Hackfleisch	153
Tabelle 9-4: Nachweishäufigkeit von Salmonellen aus 39 nativ kontaminierten Hackfleisch- und Geflügelfleischproben	155

**Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 2-1: Referenzverfahren zum horizontalen Nachweis von Salmonellen in Lebensmitteln und Futtermitteln gemäß L 00.00-20, ASUV § 64 LFGB (entspricht DIN EN ISO 6579:2003)	31
Abbildung 2-2: Horizontaler Nachweis von Salmonellen in Lebensmitteln bzw. Milch und Milchprodukten gemäß DIN EN 12824:1998 bzw. ISO 6785:2001 IDF 93:2001	33
Abbildung 3-1: Schema zum Drei-Ösen-Verdünnungsausstrich mit dreimaligem Ausglühen der Impföse (nach BAUMGART, 1997)	70
Abbildung 3-2: Versuchsaufbau zur Wiederfindung und kulturellen Anreicherung von <i>Salmonella</i> Typhimurium in artifiziell kontaminierten Hackfleischproben	73
Abbildung 4-1: Wiederfindungsrate (%) von Salmonellen aus artifiziell kontaminierten Hackfleischproben (n = 92) in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer und der Nährmedien: Ausgangsinokulum (n = 25) von 1-10 KbE <i>S. Typhimurium</i> /25 g Hackfleisch	98
Abbildung 4-2: Wiederfindungsrate (%) von Salmonellen aus artifiziell kontaminierten Hackfleischproben (n = 92) in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer und der Nährmedien: Ausgangsinokulum (n = 41) von 11-50 KbE <i>S. Typhimurium</i> /25 g Hackfleisch	99
Abbildung 4-3: Wiederfindungsrate (%) von Salmonellen aus artifiziell kontaminierten Hackfleischproben (n = 92) in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer und der Nährmedien: Ausgangsinokulum (n = 26) von 51-200 KbE <i>S. Typhimurium</i> /25 g Hackfleisch	100
Abbildung 4-4: Aerobe mesophile Keimzahl von frischem Hackfleisch (n = 132)	105
Abbildung 4-5: Aerobe mesophile Keimzahl von frischem Geflügelfleisch (n = 74)	106
Abbildung 4-6: Nachweisrate (%) von Salmonellen aus <i>Salmonella</i> -positiven Hackfleisch- und Geflügelfleischproben (n = 39) in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer und den Nährmedien: 1. Herkömmliche Nährmedien	110
Abbildung 4-7: Nachweisrate (%) von Salmonellen aus <i>Salmonella</i> -positiven Hackfleisch- und Geflügelfleischproben (n = 39) in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer und den Nährmedien: 2. Chromogene Nährmedien	111
Abbildung 4-8: Multiresistente <i>Salmonella</i> -Stämme (n = 8), isoliert aus 39 <i>Salmonella</i> -positiven Hackfleisch- und Geflügelfleischproben	124

## 1 Einleitung

Salmonellen zählen weltweit zu den am häufigsten vorkommenden bakteriellen Krankheitserregern Lebensmittel-assoziiierter Infektionen. Sie besitzen dementsprechend eine akute ökonomische und gesundheitspolitische Bedeutung. Aufgrund longitudinaler Bekämpfungs- und Überwachungsmaßnahmen auf allen Stufen der Lebensmittelkette sowie strengen EU-Rechtsnormen, lassen epidemiologische Studien derzeit einen steten Rückgang der Fallzahlen von Enteritis-Salmonellosen in den westlichen Industrieländern erkennen.

Die traditionellen Referenzverfahren zum Nachweis von Salmonellen gemäß der amtlichen Methode nach § 64 Lebensmittel- und Futtermittel-Gesetzbuch (LFGB), vormals § 35 Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetz (LMBG), oder der International Organization of Standardization (ISO), beruhen auf einem mehrstufigen kulturellen Nachweisverfahren, bestehend aus einer Voranreicherung, zwei parallelen Selektivanreicherungen sowie Subkultivierung auf zwei festen Selektivnährmedien und einer abschließenden vorläufigen serologischen und biochemischen Bestätigung. Diese Methodenkaskade ist sehr zeit- und materialaufwendig und wird in fünfjährigem Turnus von den Normierungskomitees überprüft und gegebenenfalls revidiert.

In der vorliegenden Arbeit sollte der seinerzeitige letzte Änderungsentwurf im Rahmen der Horizontalisierung der Norm zum Nachweis von Salmonellen aus Lebensmitteln und Futtermitteln ISO/DIS 6579:2000 (nunmehr: DIN EN ISO 6579:2003) mit dem seinerzeit noch geltenden Referenzverfahren nach § 35 LMBG (nunmehr: § 64 LFGB) kritisch verglichen werden. Gleichzeitig sollten dabei neue chromogene Selektivnährmedien, u.z. die sogenannte AES-Salmonellen-Agar-Platte (ASAP), das Oxoid *Salmonella* Chromogen-Medium (OSCM) und der Miller-Mallinson-Agar (MM) hinsichtlich ihrer Leistungsfähigkeit und Eignung als Subkultivierungsmedium geprüft werden.

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Charakteristische Eigenschaften von Salmonellen

Salmonellen sind Gram-negative, fakultativ anaerob wachsende Stäbchenbakterien mit einer Größe von 0,7-1,5 x 2-5 µm. Außer *S. Gallinarum* und *S. Pullorum* sind alle Salmonellen aufgrund ihrer peritrichen Begeißelung beweglich. Ihre charakteristischen StoffwechsellLeistungen sind die Nitratreduktion, die Gasbildung aus Glukose (ausgenommen *S. Typhi*), gemeinhin die Schwefelwasserstoffbildung auf Dreizuckereisenagar (ausgenommen *S. Choleraesuis* und *S. Paratyphi A*), eine negative Indol-Reaktion, die Nutzung von Zitrat als alleinige Kohlenstoffquelle (ausgenommen *S. Typhi* und *S. Paratyphi A*), die Lysin- (ausgenommen *S. Paratyphi A*) und Ornithin-Dekarboxylierung (ausgenommen *S. Typhi*) und eine negative Urease-Reaktion. Mit wenigen Ausnahmen sind Salmonellen nicht in der Lage, Laktose zu fermentieren (LE MINOR, 1984).

### 2.2 Taxonomie und Nomenklatur

Nach dem Bestimmungsschlüssel des „Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology“ wird die Gattung *Salmonella* LIGNIÉRES 1900 dem Stamm *Gracilicutes* GIBBONS und MURRAY 1978 aus dem Reich *Procaryotae* MURRAY 1968 zugeordnet (MURRAY, 1984). Die Gattung *Salmonella* LIGNIÉRES 1900 gehört zur Familie der Enterobacteriaceae. Der genetische Verwandtschaftsgrad innerhalb dieser Familie ist recht hoch. Die DNA-DNA-Übereinstimmung von *Citrobacter* spp. und *Salmonella* spp. beträgt beispielsweise 40-50 % (BRENNER, 1984).

TINDALL et al. (2005) kommentierten die aktuelle Entscheidung „Opinion 80“ (JUDICIAL COMMISSION OF THE INTERNATIONAL COMMITTEE ON SYSTEMATICS OF PROKARYOTES,

2005), um die bestehenden Missverhältnisse in der Nomenklatur der Salmonellen zu klären. Die Autoren schlugen den Gebrauch einer einheitlichen Nomenklatur vor, die sowohl auf der „Opinion 80“ als auch auf den taxonomischen Interpretationen von LE MINOR und POPOFF (1987) und REEVES et al. (1989) beruht (**Tabelle 2-1**).

**Tabelle 2-1:** Nomenklatur und Taxonomie des Genus *Salmonella* (nach LE MINOR und POPOFF, 1987; REEVES et al., 1989; JUDICIAL COMMISSION OF THE INTERNATIONAL COMMITTEE ON SYSTEMATICS OF PROKARYOTES, 2005 und TINDALL et al., 2005)

<b>Genus</b>	<b>Art</b>	<b>Unterart</b>
<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>enterica</i>
<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>salamae</i>
<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>arizonae</i>
<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>diarizonae</i>
<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>houtenae</i>
<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>indica</i>
<i>Salmonella</i>	<i>bongori</i>	

In der „Opinion 80“ (JUDICIAL COMMISSION OF THE INTERNATIONAL COMMITTEE ON SYSTEMATICS OF PROKARYOTES, 2005) wird das Ziel einer einheitlichen Nomenklatur befürwortet, jedoch nicht verbindlich festgelegt. Es wird eine Vereinfachung empfohlen, die die zwei Arten der Gattung *Salmonella* LIGNIÉRES 1900 als „*Salmonella enterica* (ex KAUFFMANN und EDWARDS, 1952) LE MINOR und POPOFF (1987)“ und „*Salmonella bongori* (LE MINOR et al., 1985; REEVES et al., 1989)“ bezeichnet. Das Epitheton *enterica*, eine Wortneuschöpfung nach KAUFFMANN und EDWARDS (1952), sollte in Zukunft anstatt der Speziesbezeichnung *choleraesuis* verwendet werden, weil die Speziesbezeichnung *choleraesuis* bisher synonym für den Referenzstamm LT2<sup>T</sup> (Lillengen Referenzstamm 2) und Irre führender Weise zugleich als Epitheton einer Subspezies und eines Schweine-adaptierten Serovars verwendet wurde. Aufgrund der molekularbiologischen Untersuchungen von REEVES et al. (1989) zur genetischen Divergenz von *S. enterica* ssp. *bongori* soll der Stamm international als eigene Art anerkannt werden. Die Schreibweise der sechs Unterarten der Spezies *enterica* ist in **Tabelle 2-1** wiedergegeben.

Die Vergabe von römischen Ziffern zur Benennung der ehemals sechs Subspezies (Subsp.) von *Salmonella enterica*, d.h. I für Subsp. *enterica*, II für Subsp. *salamae*, II a für Subsp. *arizonae*, III b für Subsp. *diarizonae*, IV für Subsp. *houtenae*, VI für Subsp. *indica* und V für Subsp. *bongori*, ist zwar noch verbreitet, aber als überholt anzusehen (SELBITZ et al., 1995). TINDALL et al. (2005) verwiesen auch auf die Tatsache, dass die Nomenklatur einiger Referenzstämme, die bereits vor 1987 erstbeschrieben und im Bakteriologischen Code gelistet wurden, weiterhin gültig ist. In dem Kommentar von TINDALL et al. (2005) zur „Opinion 80“ wird darauf verwiesen, dass die Nomenklatur einiger Stämme, die bereits vor 1987 erstbeschrieben und im Bakteriologischen Code gelistet wurden, weiterhin gültig ist (**Tabelle 2-2**).

**Tabelle 2-2:** Zulässige Nomenklatur einiger *Salmonella enterica* ssp. *enterica*-Serovare (nach TINDALL et al., 2005)

<b>Nomenklatur</b>	<b>Referenzstamm</b>	<b>Erstbeschreibung</b>
<i>Salmonella choleraesuis</i>	ATCC 13312	SMITH (1894)
<i>Salmonella enteritidis</i>	ATCC 13076	GÄRTNER (1888)
<i>Salmonella paratyphi</i>	NCTC 5702	KAYSER (1902)
<i>Salmonella typhi</i>	ATCC 19430	SCHRÖTER (1886)
<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC 13311	LÖFFLER (1892)

Neu entdeckte Serovare, die der Unterart *enterica* angehören, wurden früher üblicherweise nach dem geographischen Ort ihrer Erstbeschreibung benannt. Der Name des Serovars beginnt mit einem Kapitälchen und wird in nicht-kursiven lateinischen Buchstaben geschrieben. Serovare der anderen Unterarten werden mit Antigenformel und Subspeziesnamen bezeichnet. Die Antigenformeln der *Salmonella*-Serovare sind im so genannten KAUFFMANN-WHITE-Schema gelistet. Eine jährliche Aktualisierung erfolgt durch das „WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*“. Derzeit sind 2.541 *Salmonella*-Serovare beschrieben (POPOFF et al., 2004). Dabei sind im KAUFFMANN-WHITE-Schema nur die diagnostisch und epidemiologisch bedeutenden Antigene aufgeführt. Die Formeln sind nicht als vollständig anzusehen (LE MINOR, 1984). Auf Grundlage der serologischen Analysen von WHITE im Jahr 1926 und KAUFFMANN im Jahr 1966 zur antigenetischen Spezifität der Salmonellen-O-, Vi- und H-Antigene entwickelte KAUFFMANN die „Ein-Serovar-ein-Spezies“-Hypothese. Die Klassifizierung der Salmonellen-Lipopolysaccharide stellte KAUFFMANNs Lebenswerk dar (LE MINOR und POPOFF, 1987; SCHLEGEL, 2004).

Anfänglich wurden Salmonellen hinsichtlich ihrer klinischen Bedeutung, d.h. nach Wirt (z. B. *S. Abortusovis*) oder Krankheitsbild (z.B. *S. Enteritidis*), taxonomisch benannt und unterschieden. Auf Grundlage von Beobachtungen in den Jahren 1944 bis 1966 zu gattungsspezifisch-biochemischen Reaktionen wurden von BORMANN, KAUFFMANN und EDWARDS, EWING und KAUFFMANN erstmals taxonomische Einteilungen für die Salmonellen vorgenommen. Auf Basis der DNA-Vergleichsuntersuchungen von CROSA und STOLERU in den Jahren 1973 und 1976 wurden schließlich alle *Salmonella*-Serovare taxonomisch als Angehörige einer Art betrachtet (LE MINOR und POPOFF, 1987).

## 2.3 Geschichte

Der erste mikroskopische Nachweis von Salmonellen gelang CARL EBERTH im Jahr 1880 (SCHLEGEL, 2004). Zunächst wurde die neue Bakterienart als *Bacillus typhosus*, *Bacterium typhi*, *Eberthella typhi* oder *Eberthella typhosa* bezeichnet. Die Gattungsbezeichnung *Salmonella* wurde von LIGNIÈRES im Jahr 1900 eingeführt und ersetzte die Bezeichnung „hog-cholera bacillus“. LIGNIÈRES Wortschöpfung geht auf den Leiter des amerikanischen Bureau of Animal Industry DR. D. E. SALMON zurück (SELBITZ et al., 1995). 1885 wurde **S. Choleraesuis** als „hog-cholera bacillus“ aus dem Dickdarm eines an Schweineseuche („swine plague“, engl.) erkrankten Tieres von SMITH isoliert. 1886 wies SMITH „swine-plague bacteria“ in der Schweinelunge nach. 1887 und 1891 konnte SMITH jedoch beweisen, dass Hog Cholera und Schweineseuche zwei eigenständige Krankheitsbilder darstellen, deren Erreger häufig als Mischinfektion beim Schwein auftreten (SMITH, 1891). 1888 wurde von GÄRTNER erstmals **S. Enteritidis**, ein Stamm von auch heutzutage unverändert großer humanmedizinischer Bedeutung, beschrieben. GÄRTNER gelang der Nachweis von *S. Enteritidis* sowohl aus dem als genießbar beurteilten Fleisch einer notgeschlachteten Kuh, als auch aus der Milz des verstorbenen Patienten. Zuvor waren nach Verzehr von größeren Mengen rohen Fleisches in Frankenhausen/Thüringen 57 Personen erkrankt. Eine ältere Person erkrankte nach fäkal-oralen Infektion (GÄRTNER, 1888). LÖFFLER beschrieb 1891 erstmals den auch heutzutage humanmedizinisch bedeutsamen Stamm **S. Typhimurium**. In den Jahren 1890 und 1891 starben zahlreiche Labormäuse des Hygieneinstituts Greifswald an einer typhusähnlichen Erkrankung. Aufgrund dessen nannte LÖFFLER den neuartigen Erreger „*Bacillus typhi murium*“. LÖFFLER sah in dem von ihm gefundenen Erreger ein wirksames Mittel zur Bekämpfung der Feldmausplage (LÖFFLER, 1892).

## 2.4 Virulenz

Es ist derzeit nicht geklärt, warum von über 2.500 *Salmonella*-Serovaren nur einige wenige Serovare und Varianten sowie innerhalb dieser nur wenige Klone klinisch und epidemiologisch im Vordergrund stehen (FOCK, 1995). Salmonellen sind invasive, fakultativ intrazelluläre Erreger. *Salmonella enterica* kann dabei sowohl wirtsadaptierte systemische Infektionen (sog. primäre Salmonellosen wie z. B. die Krankheitsbilder Typhus, Paratyphus oder Kükenruhr) als auch lokal begrenzte Enteritiden (sog. sekundäre Salmonellosen wie z. B. die Gastroenteritis infectiosa) bei Mensch und Tier verursachen. Viele wichtige Virulenzgene von *Salmonella enterica* befinden sich innerhalb des Genoms auf sogenannten Pathogenitätsinseln („*Salmonella* Pathogenicity Island“, engl.). Bisher sind die Invasionsloci „*Salmonella* Pathogenicity Island 1“ (SPI 1) sowie SPI 2, SPI 3, SPI 4 und SPI 5 erforscht. SPI 1 und SPI 2 kodieren Typ III-Sekretionssysteme, die zum einen die Translokation von Proteinen in die eukaryontische Wirtszelle und zum anderen das Überleben in Makrophagen ermöglichen. SPI 3, SPI 4 und SPI 5 entsprechen unterschiedlichen Definitionen von Pathogenitätsinseln. Eine gemeinsame Eigenschaft von Pathogenitätsinseln von *S. enterica* ist vermutlich die genetische Stabilität, die möglicherweise auf die lange zurückliegende Integration der Elemente und deren Bedeutung für die Spezies *S. enterica* hinweist (HENSEL, 2001).

Nach MOAT et al. (2002) ist die Auffältelung der Enterozytenmembran, das so genannte „membrane ruffling“ (engl.), nach einer Fimbrien-vermittelten Adhäsion der Salmonellen für die Pathogenese charakteristisch. Dabei erfolgt innerhalb weniger Minuten über Makropinozytose eine rasche Invasion des Erregers. *Salmonella* Serovare überstehen das saure Milieu in den Phagolysosomen und gelangen schließlich über die epithelialen M-Zellen in die Makrophagen der Submukosa. Dort vermehrt sich *Salmonella enterica* und induziert zeitgleich eine Apoptose der Makrophagen. Die systemische Ausbreitung des Erregers ist somit von dessen Pathogenitätsinseln respektive Virulenzplasmiden abhängig.

Das *spv* („*Salmonella* plasmid virulence“, engl.)-Operon ist gemeinsames Merkmal aller Salmonellen-Virulenzplasmide und stellt eine hoch konservierte 7,8 kBp große Region dar. Die *spv*-vermittelte Virulenz konnte bisher nicht vollständig aufgeklärt werden. Das *pef*-Operon von *S. Typhimurium* und *S. Enteritidis* kodiert eine Fimbrien-vermittelte Adhäsion. Die Genloci *traT*, *rsk* und *rck* sind an der Serumresistenz beteiligt (BARTH und BAUERFEIND, 2005). In prozessierten Lebensmitteln wie Schokolade liegen Salmonellen in einem Ruhezustand vor, in dem sie lebensfähig (VBNC), aber nicht kultivierbar sind („*viable but not culturable*“, engl.). Die durch den Herstellungsprozess bedingten Stressfaktoren bewirken möglicherweise sogar eine erhöhte Infektiosität des Erregers (KÜHN, 1995; TSCHÄPE und BOCKEMÜHL, 2002).

## 2.5 Verbreitung und Reservoir bei Lebensmittel-liefernden Tieren

Salmonellen zählen zu den Erregern, die ein breites Spektrum an ökologischen Nischen besiedeln können (TSCHÄPE und KÜHN, 1995). Als Reservoir dienen Säugetiere, insbesondere die landwirtschaftlichen Nutztiere und der Mensch, Vögel, Reptilien, Insekten und speziell Fliegen. Bemerkenswert ist dabei die hohe Tenazität der Salmonellen in der belebten und unbelebten Umwelt, besonders in Oberflächengewässern und im Erdreich (WINFIELD und GROISMAN, 2003).

Gegenwärtig wird vor der Gefahr einer invasiven Salmonellose durch die Haltung von Heimtierreptilien gewarnt. Etwa 90 % der exotischen Reptilien sind Träger und Ausscheider von Salmonellen. Einzelne tödlich verlaufende Erkrankungsfälle bei Kleinkindern wurden bereits beschrieben (ANONYMUS, 2000a). Salmonellosen werden überwiegend durch kontaminierte Lebensmittel tierischen Ursprungs verursacht. Die Tierbestände können über Futtermittel, belebte Vektoren oder mangelnde Betriebshygiene neu oder reinfiziert werden (HARTUNG, 2004).

Im Rahmen der Zoonoseerhebung für Deutschland im Jahr 2003, basierend auf einem passiven Überwachungsstatus, ergaben sich für die Tierbestände folgende Zahlen: hohe Salmonellenraten von bis zu 16,9 % waren bei Enten und Gänsen feststellbar. In Legehuhnherden waren nur 2,59 % der untersuchten Herden Salmonellen-positiv. Bei Salmonellen-positiven Reisetauben (10,58 %) überwog die humanmedizinisch

unbedeutende Variatio „Copenhagen“ des Stamms *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. Bei Anlassproben in klinisch verdächtigen Rinderherden wurde eine Salmonellenrate von 15,35 % und in Schweineherden eine rückläufige Rate von 8,39 % ermittelt. Weiterhin galten als Reservoir Pferde, kleine Wiederkäuer, Heimtiere sowie auch Reptilien und Wildtiere. Sowohl tierische wie pflanzliche Futtermittel waren zu 7 % mit Salmonellen kontaminiert. Ebenso konnte gezeigt werden, dass ein latentes Infektionsrisiko in der Umgebung von Tierbeständen besteht (HARTUNG, 2004).

Der erste gemeinsame Zoonosentrendbericht der EU zeigte, dass im europäischen Vergleich deutsche Legehennen-Herden eine geringe Salmonellenrate von 2,3 % aufwiesen. Belgien, Spanien und Zypern konnten hingegen für das Jahr 2004 bis zu 32,2 % *Salmonella*-positive Legehennen- und Broilerherden nachweisen. In Dänemark wurde bei Gänsen eine bemerkenswerte Salmonellen-Kontaminationsrate von 57,2 % ermittelt. Die Putenherden in der Slowakei wiesen 35,6 % positive Herden auf (ANONYMUS, 2005).

Im Jahr 2003 ergaben nur 0,91 % der bakteriologischen Fleischuntersuchungen (BU) von Schlachtieren an deutschen Schlachthöfen ein *Salmonella*-positives Resultat (HARTUNG, 2004). Im Jahr 1999 wurden vom Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV) bundesweit 121 Herden in 40 deutschen großen Hähnchenmastbetrieben gezielt auf das Vorkommen von Salmonellen untersucht. In den Ställen konnte mittels Sammelkotproben eine Befallsrate von 22,3 % ermittelt werden. Anhand von Halshautproben konnte gezeigt werden, dass nach der Schlachtung 74,3 % der Tierkörper mit Salmonellen kontaminiert waren. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass insbesondere die Schlachttechnik optimiert werden sollte. Die Berücksichtigung einer logistischen Schlachtung von Herden aus Salmonellen-freien Beständen erscheint unabdingbar (WICHMANN-SCHAUER et al., 2001).

Desweiteren wurden innerhalb der gleichen Studie im Jahr 1999 bundesweit 62 Herden in 24 deutschen, direkt vermarktenden Geflügelmastbetrieben anhand von Gaze- und Halshautproben gezielt auf Salmonellen untersucht. Dabei wurden aus Halshautproben von frisch geschlachtetem Geflügel weniger Salmonellen isoliert (7,7 %) als aus Gaze- und Halshautproben (9,6 %). Nur in zwei Betrieben konnten wiederholt Salmonellen gefunden werden. Somit scheint die in der Geflügelfleischhygiene-

verordnung genannte Ausnahmeregelung für selbst schlachtende direkt vermarktende Betriebe gerechtfertigt zu sein (ELLERBROEK et al., 2001).

VON ALTROCK et al. (2000) untersuchten im Jahr 1997 innerhalb einer Woche an einem deutschen Schlachthof 1.200 Schweineschlachttierkörper und Brauchwasserproben im Rahmen des EU-Projektes „*Salmonella* in Pork (Salinpork)“. Dabei konnte gezeigt werden, dass am Tierkörper weniger die Oberflächen, sondern der Zungenbereich (5,3 %) und die Lebern (2,7 %) *Salmonellen*-positiv waren. Bei der Untersuchung von Umgebungsproben ließen sich keine *Salmonellen* im Brühwasser nachweisen. Dafür waren hauptsächlich die Knochensägenproben mit 6,7 % *Salmonella*-positiv.

Die niederländische Studie zu „Salinpork“ von SWANENBURG et al. (2001) belegt ebenso, dass der Schlachtprozess bedeutend für eine *Salmonellen*-Kontamination von Schweineschlachttierkörpern sein kann. *Salmonellen*, die in Leber, Zunge, Rektum und Mesenteriallymphknoten nachgewiesen werden konnten, entstammten von *intra vitam* infizierten Tieren. Schweine aus serologisch positiven Herden infizieren sich bereits im Ursprungsbetrieb. Tiere aus serologisch negativen Herden können sich nach der Anlieferung durch stalleigene Keime oder Exkremate von *Salmonella*-ausscheidenden Tieren im Schlachthofviehstall infizieren. Dabei ist der prämortale Belastung der Schlachttiere, wie z. B. durch Transportstress, eine besondere Bedeutung beizumessen. Je stärker der prämortale Streß, umso häufiger finden Translokationsvorgänge von Mikroorganismen aus besiedelten Körperregionen, wie z. B. dem Darm oder von infizierten, lokalen Herden, in die normalerweise keimfreien Organe und Muskulatur statt. Die prämortale Schlachttierbelastung führt offenbar zu einer verminderten Serumbakterizidie der Tiere (FEHLHABER und ALTER, 1999).

Die Europäische Lebensmittelsicherheitsbehörde EFSA („European Food Safety Authority“, engl.) empfahl für eine EU-weite Datenerhebung zur Bestimmung der *Salmonella*-Prävalenz von Schlachtschweinen Lymphknoten und Oberflächentupfer als Probenmaterial. Die Untersuchung von Lymphknoten stellt ein einfaches und sensitives Verfahren dar, um den *Salmonella*-Status im Tierbestand rückverfolgen zu können. Das Tupferverfahren gibt Auskunft über die *Salmonellen*-Kontamination des Tierkörpers nach der Herrichtung. Als Probenahmestellen ist eine Fläche von insgesamt 1.400 cm<sup>2</sup>

vorgesehen, die sowohl die Aussenseite von Rücken und Bauch sowie die Innenseiten der Keulen erfasst (ANONYMUS, 2006c).

## 2.6 Bedeutung der humanen Salmonellose

Die Salmonellose des Menschen ist aufgrund des hohen volkswirtschaftlichen Schadens von besonderer Bedeutung. Die tatsächliche Morbidität beläuft sich dabei auf eine Dunkelziffer von etwa dem 12-fachen der gemeldeten Salmonellosefälle (KRUG und REHM, 1983). Ende der 70er Jahre wurde der volkswirtschaftliche Schaden mit 240 Millionen DM beziffert. 55 % der volkswirtschaftlichen Kosten entstanden dabei im Tierproduktionsbereich. LOPALCO et al. (2000) berechneten als materielle Folgekosten pro hospitalisierten Salmonellose-Patienten eine Summe von 1.896 \$ US. In der Europäischen Union zählt die humane Salmonellose zu den bedeutendsten Lebensmittelinfektionen. Im Jahr 2004 wurden in 25 Mitgliedstaaten insgesamt 192.703 Neuerkrankungen gemeldet (ANONYMUS, 2006a).

In Deutschland wurden mit 195.400 Erkrankungsfällen im Jahr 1992 der Höhepunkt der Salmonelleninfektionen des Menschen erreicht (KÜHN, 1995). Trotz sinkender Inzidenz in den Folgejahren, war die Salmonellose die mit am häufigsten an das Robert-Koch-Institut übermittelte Erkrankung. In nur 10 % der Fälle wurden typisch europäische Urlaubsländer wie Türkei, Spanien, Griechenland oder Italien als Infektionsort angegeben (ALPERS und JANSEN, 2004). Im Jahr 2005 sank die Fallzahl weiter auf 52.245 Salmonellose-Erkrankungen und war erstmalig hinter der Fallzahl der Campylobacteriose platziert und somit die zweithäufigste gemeldete Lebensmittelinfektion (ANONYMUS, 2006b).

Die Salmonellose des Menschen gehört zu den bedeutendsten Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes, die durch Lebensmittel übertragen werden. Für eine langfristige Reduktion des Salmonellenrisikos müssen komplexe und effiziente Bekämpfungsstrategien in den Tierbeständen angestrebt werden, die Hygiene in der Schlacht- und Lebensmitteltechnologie verbessert und die Bevölkerung hinsichtlich küchenhygienischer Fehler im Privathaushalt aufgeklärt werden (TSCHÄPE und BOCKEMÜHL, 2002).

Dabei wird das epidemische Geschehen überwiegend von einzelnen Stämmen, den so genannten Epidemieklonen, beherrscht. Zwischen 1984 und 1986 entwickelte sich der *Salmonella enterica*-Stamm PT 4 des Serovars Enteritidis zum dominierenden Epidemietyp. Es ist jedoch prognostiziert worden, dass der Klon zunehmend an epidemiologischer Bedeutung verlieren wird. Seit dem Jahr 1992 ist der Epidemieklon *S. Typhimurium* DT 104 auf dem Vormarsch. *S. Typhimurium* DT 104 bildet ähnlich große Mengen an *Salmonella*-Enterotoxin (Stn) wie *S. Enteritidis* PT 4 und weist ein breites Spektrum an Antibiotika-Multiresistenzen auf (LIESEGANG et al., 1997). *S. Typhimurium* DT 104 ist sowohl in West- und Osteuropa als auch in Nord- und Mittelamerika weit verbreitet. Eine neunfache Resistenz konnte bei einzelnen Isolaten nachgewiesen werden. Häufig treten jedoch fünffache Resistenzen auf. Eine weitere Besonderheit des neuen Epidemietyps ist seine höhere Tenazität gegenüber lebensmitteltechnologischer Verfahrensschritte wie Hitzebehandlung, Tiefrieren oder Trocknen (HUMPHREY, 2001). In der Europäischen Union ließ sich die Mehrheit der durch Schweinefleisch verursachten Salmonellosen auf *S. Typhimurium* zurückzuführen (ANONYMUS, 2006a).

## 2.7 Infektionsdosis und Erkrankungsbild

Das Krankheitsbild der Salmonellose wird durch das Leitsymptom „Durchfall“ dominiert. Daneben sind Symptome wie Bauchschmerzen, Übelkeit, Erbrechen oder Fieber möglich, die in der Regel nach wenigen Stunden oder Tagen wieder abklingen. Infektionen mit Salmonellen treten häufig in den wärmeren Monaten des Jahres auf (ALPERS und JANSEN, 2004). Der Schweregrad der einzelnen Symptome einer Salmonellose hängt unmittelbar von der Immunkompetenz des Patienten und einigen weiteren Faktoren ab. Als schwerwiegende Komplikationen nach *S. Enteritidis*-Infektionen wurden akutes Nierenversagen, Osteomyelitis und Meningitis beschrieben. Insbesondere bei älteren und sehr jungen Patienten sind solche Komplikationen zu befürchten (MANSFIELD und FORSYTHE, 2000).

Im Allgemeinen werden die Menschen, die dem Risiko einer Infektion durch pathogene Mikroorganismen ausgesetzt sind, als so genannte YOPIS-Gruppe („young, old,

pregnant, immunocompromised segments of the public“; engl.) bezeichnet. Dazu zählen Kinder unter zehn, besonders unter sechs Jahren, sowie alte Menschen über 60 Jahre, Schwangere und immunsupprimierte Personen (MOSSEL und STRUIJK, 1993).

Salmonelleninfektionen treten als sporadische Fälle, als Familienerkrankungen oder als epidemische Ausbrüche im Sinne von Lebensmittelinfektionen auf. Der Kinderanteil am Patientenkollektiv beträgt dabei circa 30 %. Knapp 50 % der *Salmonella*-Infektionen treten in der Altersgruppe von 15 bis 64 Jahren auf. Der Rückgang der Salmonellose-Inzidenz seit 1993 ist auf Verbraucheraufklärung und gesetzliche Interventionen, wie beispielsweise die Hühner-Salmonellen-Verordnung oder die Hühnereier-Verordnung zurückzuführen. Etwa 5 % der enteritischen Salmonellosen können bei vorgeschädigten Patienten systemisch verlaufen (KÜHN, 1995). Eine Dauerausscheidung des Erregers, d.h. nach drei oder mehr als drei Monaten (evtl. Jahren) nach Überstehen der Krankheit, ist typisch für den Verlauf der typhösen Salmonellose. Das Auftreten von sog. Rekonvaleszenzausscheidern, d. h. die Ausscheidung des Erregers nach Überstehen der Krankheit, ist typisch für enteritische Salmonellosen (KAYSER, 1998). Beim gesunden, erwachsenen Menschen liegt die Infektionsdosis bei  $\geq 10^5$  Salmonellen, wenn der Erreger in wässrigen Lebensmitteln die Gelegenheit hatte, sich aufgrund küchenhygienischer Fehler zu vermehren. Geringere Infektionsdosen von etwa  $10^3$  Salmonellen sind z. B. bei Aufnahme des Erregers mit dem Trinkwasser oder durch protein- und fetthaltige Nahrung möglich. Vor der Magensäure durch die Fettmizellen geschützt, überstehen Salmonellen so die Magenpassage (KÜHN, 1995).

## 2.8 Lebensmittel als Infektionsquelle

Aufgrund der EU-Zoonosen-Richtlinie (92/117/EWG) und der Zoonosen-Monitoring-Richtlinie (2003/99/EC) müssen die Mitgliedstaaten einen jährlichen Trendbericht über Anzahl und Quellen von Zoonose-Infektionen verfassen. In Deutschland werden dabei auch die Mitteilungen der einzelnen Bundesländer über Planproben-Untersuchungen von im Verkehr befindlichen Lebensmitteln berücksichtigt (HARTUNG, 2006).

Bei Planproben von Fleisch - außer Geflügel - wurde im Jahr 2004 eine Kontaminationsrate von 2,95 % nachgewiesen (**Tabelle 2-3**). Der dominierende Serovartyp ist ebenfalls in **Tabelle 2-3** angegeben. Dabei betrug die Nachweisrate für Salmonellen bei Schweinefleisch 3,67 %. Rohfleisch im Sinne der Hackfleischverordnung zeigte im Vergleich zu den Vorjahren rückläufige Raten von 2,69 %. Mit 8,74 % zeigte Geflügelfleisch insgesamt einen ebenso rückläufigen Trend an Salmonellen-kontaminierten Planproben. Die höchste Kontaminationsrate lag bei Entenfleisch mit 18,82 %, gefolgt von Hühnerfleisch mit 12,98 %. Bei Konsumeiern, zu 0,44 % mit Salmonellen kontaminiert, war ebenso ein rückläufiger Trend im Vergleich zu den Vorjahren zu beobachten. In Milch und Milcherzeugnissen wurden nur geringe Salmonellenbelastungen festgestellt. Auch die sonstigen, verarbeiteten Lebensmittel wiesen kaum Salmonellenbelastungen auf (HARTUNG, 2006).

**Tabelle 2-3:** *Salmonella*-kontaminierte Lebensmittel-Planproben mit Befallsrate und den entsprechenden Anteilen an *S. Enteritidis* und *S. Typhimurium* für das Jahr 2004 (modifiziert nach HARTUNG, 2006)

Lebensmittelproben (n)	Befallsrate (%)	<i>Salmonella enterica</i> Serovare (%)		
		Enteritidis	Typhimurium	Sonstige
Fleisch außer Geflügel (2.816)	2,95	0,07	1,24	1,31
Rindfleisch (433)	0,69	-	-	0,69
Schweinefleisch (1.581)	3,67	-	1,64	1,77
Wildfleisch (351)	3,70	0,57	1,14	1,99
Rohfleisch, zerkleinert, nach Hackfleischverordnung (2.568)	2,69	0,04	1,29	1,29
Rohfleischerzeugnisse, nach Hackfleischverordnung (6.392)	1,77	0,05	0,83	0,78
Geflügelfleisch, insgesamt (2.768)	8,74	1,05	1,66	6,00
Entenfleisch (85)	18,82	1,18	4,71	12,94
Hühnerfleisch (285)	12,98	4,21	1,05	7,72
Gänsefleisch (132)	12,12	0,76	9,09	2,27
Masthähnchenfleisch (1.123)	11,04	0,71	1,07	6,06
Fleisch von Truthühnern/Puten (901)	6,33	0,22	1,22	4,88
Konsum-Eier, Huhn (10.179)	0,44	0,39	0,01	0,03
Milchprodukte, ohne Rohmilch (6.694)	0,01	0,01	-	-
Fische, Meerestiere, Erzeugnisse, gesamt (4.359)	0,09	-	0,02	0,05

In der Europäischen Union zählt Schweinefleisch neben Eiern und Geflügelfleisch zur Hauptinfektionsquelle der Lebensmittel-assoziierten Salmonellose. Spanien, Dänemark, Österreich und Deutschland bilden die Gruppe der Mitgliedstaaten mit dem höchsten Pro-Kopf-Verzehr an Schweinefleisch (ANONYMUS, 2006a). Salmonellen in Hackfleisch sind daher ein bedeutendes Problem der Lebensmittelhygiene. Dies ist insbesondere bedenklich, als dass dieses Lebensmittel aufgrund der Verzehrsgewohnheiten häufig in rohem Zustand konsumiert wird (SWANENBURG et al., 2001).

STOCK und STOLLE (2001) untersuchten in einem zugelassenen Schlacht- und Zerlegungsbetrieb 1.485 Hackfleischproben und konnten in 6,3 % der Fälle Salmonellen, davon hauptsächlich das Serovar Typhimurium zu 69,6 %, nachweisen. Es bestand ein unmittelbarer Zusammenhang zwischen der Herkunft der Schlachttiere und der Salmonellennachweishäufigkeit. Eine mögliche Salmonellen-Kreuzkontamination von verzehrfertigen Lebensmitteln durch Hackfleisch-Umverpackungen spielt dabei eine untergeordnete Rolle (BURGESS et al., 2005).

Im Jahr 2004 verzeichnete Tschechien die meisten enteritischen Salmonellose-Fälle innerhalb der EU. Zu den größten Salmonellose-Ausbrüchen kam es in Tschechien, bei denen 906 Patienten, und in Polen, bei denen 823 Patienten hospitalisiert werden mussten. Als Ursache wurde in Tschechien eine „Lebensmittelinfektion“ angegeben, in Polen der Verzehr von u. a. Majonäse, Kuchen, Eier, Fisch und auch rohem Hackfleisch (ANONYMUS, 2005).

Mit der Einführung eines generellen Erhitzungszwangs für Milch im Jahre 1983 ging die Meldezahl der durch Rohmilch verursachten Salmonellose-Ausbrüche drastisch zurück. In den Jahren zuvor, im Zeitraum 1975 bis 1982, wurden in Schottland noch 27 Rohmilch-assoziierte Salmonellose-Ausbrüche mit 2.446 Erkrankten beschrieben. Auch aus anderen Ländern lagen ähnliche Berichte hinsichtlich der Bedeutung der Wärmebehandlung von Milch vor. Ein großer Salmonelloseausbruch im US-Staat Illinois im Jahr 1985 war hingegen auf eine Rekontamination von pasteurisierter Milch zurückzuführen (BECKER et al., 1993).

**Tabelle 2-4** gibt eine Literaturliste zu Ausbrüchen Lebensmittel-assoziiierter *Salmonella*-Infektionen der letzten Jahre wieder. Dabei wurden insbesondere

Meldungen des europäischen Überwachungsprogramms („Eurosurveillance“) und auf nationaler Ebene Meldungen des Robert-Koch-Instituts („Epidemiologisches Bulletin“) berücksichtigt.

**Tabelle 2-4:** Literaturlauswahl über aktuelle lebensmittelbedingte Salmonellose-Ausbrüche in Europa

Land	Jahr	Lebensmittel	Zahl der Erkrankten	Serovaren	Quelle
Deutschland	2004	Buffet, Kreuzfahrt	86	S. Enteritidis	MACDONALD und COWDEN (2004)
Deutschland	2004	Fleischerzeugnisse	76	S. Brandenburg	ANONYMUS (2004a)
Deutschland	2004	Hackfleisch	72	S. Give	ANONYMUS (2004b)
England	2004	Convenience-Produkte	83	S. Typhimurium DT 104	WILSON (2004)
Deutschland	2003	Dönerfleisch	9	S. Hadar	ANONYMUS (2003a)
Deutschland	2003	Teigtaschen	16	S. Enteritidis	ANONYMUS (2004c)
Deutschland	2003	Kräutertee	26	S. Agona	ANONYMUS (2003b)
Niederlande	2003	Eier	540	S. Enteritidis	VAN PELT et al. (2004)
Österreich	2002	Eier	70	S. Enteritidis PT5	BERGHOLD et al. (2003)

**Fortsetzung Tabelle 2-4: Literaturauswahl über aktuelle lebensmittelbedingte Salmonellose-Ausbrüche in Europa**

<b>Land</b>	<b>Jahr</b>	<b>Lebensmittel</b>	<b>Zahl der Erkrankten</b>	<b>Serovaren</b>	<b>Quelle</b>
Deutschland	2001	Fleischerzeugnisse	38	S. Goldcoast	ANONYMUS (2002a)
Deutschland	2001	Schweinefleisch	189	S. München	BUCHHOLZ et al. (2005)
Deutschland	2001	Schokolade	373	S. Oranienburg	ANONYMUS (2002b)
Frankreich	2001	Rohmilchkäse	215	S. Enteritidis	HAEGHEBAERT et al. (2003)
Deutschland	2000	Tiramisu	57	S. Enteritidis	ANONYMUS (2000b)
Deutschland	1998	Speiseeis	28	S. Enteritidis LT4/6	ANONYMUS (1998a)
Deutschland	1998	Vanillesoße	179	S. Enteritidis	ANONYMUS (1998b)
Deutschland	1997	Hartkäse	17	S. Bareilly	ANONYMUS (1998c)
Deutschland	1997	Fleischerzeugnisse	36	S. Typhimurium	ANONYMUS (1997a)
Deutschland	1997	Speiseeis	90	S. Enteritidis	ANONYMUS (1997b)

## 2.9 Mikrobiologische Kriterien für Salmonellen in Lebensmitteln

Im Zuge der Harmonisierung des europäischen Lebensmittelrechts wurde am 15. November 2005 die Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel durch die Europäische Kommission erlassen. Die Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 gilt seit dem 01.01.2006. Der Begriff „mikrobiologisches Kriterium“ wurde dabei definiert als ein Kriterium, dass die Akzeptabilität eines Erzeugnisses, einer Partie Lebensmittel oder eines Prozesses anhand des Nichtvorhandenseins, des Vorhandenseins oder der Anzahl von Mikroorganismen und/oder anhand der Menge ihrer Toxine/Metaboliten je Einheit Masse, Volumen, Fläche oder Partie festlegt. Der Anhang I der Verordnung 2073/2005 gliedert sich in drei Kapitel. In Kapitel eins werden sog. Lebensmittelsicherheitskriterien tabellarisch gelistet. In Kapitel zwei werden Prozesshygienekriterien für herstellende Betriebe aufgelistet. In Kapitel drei werden die Art der Probenahme und –häufigkeit für Schlachthöfe und Hackfleisch herstellende Betriebe festgelegt (KYPRIANOU, 2005). In **Tabelle 2-5** werden die mikrobiologischen Kriterien für Salmonellen anhand ausgewählter Lebensmittel dargestellt.

**Tabelle 2-5:** Mikrobiologische Kriterien für Salmonellen in ausgewählten Lebensmitteln (modifiziert nach KYPRIANOU, 2005)

<b>Verordnung (EG) 2073/2005</b>	
<b>Lebensmittelkategorie</b>	<b><i>Salmonella</i>-Grenzwerte</b>
<b>Kapitel 1: Lebensmittelsicherheitskriterien</b>	
Fleischzubereitungen	<u>Rohverzehr:</u> n = 5; c = 0 <b>m = n. n. in 25 g</b> <u>Garverzehr:</u> n = 5; c = 0 <b>m = n. n. in 10 g</b>
Hackfleisch	<u>Rohverzehr:</u> n = 5; c = 0 <b>m = n. n. in 25 g</b> <u>Garverzehr:</u> n = 5; c = 0 <b>m = n. n. in 10 g</b>
Fleischerzeugnisse	<u>Rohverzehr:</u> n = 5; c = 0 <b>m = n. n. in 25 g</b>
Geflügelfleischhackfleisch, -zubereitungen, -erzeugnisse	<u>Garverzehr:</u> n = 5; c = 0 <b>m = n. n. in 10 g</b> (ab dem Jahr 2010 in 25 g)

**Legende:**            siehe unten

**Fortsetzung Tabelle 2-5:** Mikrobiologische Kriterien für Salmonellen in ausgewählten Lebensmitteln (modifiziert nach KYPRIANOU, 2005)

---

**Verordnung (EG) 2073/2005**

---

**Lebensmittelkategorie**

***Salmonella*-Grenzwerte**

---

**Kapitel 1: Lebensmittelsicherheitskriterien**

---

Rohmilch

n = 5; c = 0

**m = n. n. in 25 g**

---

**Kapitel 2: Prozesshygienekriterien**

---

Schlachttierkörper

n = 50;

Wiederkäuer und Pferd: c = 2;

Schwein: c = 5;

**m = n. n. je Schlachttierkörper**

Geflügel: c = 7

**m = n. n. in 25 g Halshaut**

---

**Legende:**

n Anzahl der Probeneinheiten je Stichprobe

c Anzahl der Probeneinheiten, deren Werte über m liegen

m Grenzwert (es gilt: m = M): Salmonellen nicht nachweisbar („n. n.“)

Rohverzehr Lebensmittel, die zum Rohverzehr bestimmt sind

Garverzehr Lebensmittel, die zum Verzehr in durcherhitztem Zustand bestimmt sind

### 2.9.1 Lebensmittelsicherheitskriterien

Gemäß Kapitel 1, Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 gilt als Lebensmittelsicherheitskriterium für die Lebensmittelkategorie „Hackfleisch/ Faschiertes, Fleischzubereitungen und Fleischerzeugnisse – in Verkehr gebracht, während der Haltbarkeitsdauer – “ eine Nulltoleranz für Salmonellen (**Tabelle 2-5**). Die Einwaagemenge hängt unmittelbar vom Verzehrstatus, roh oder durcherhitzt, ab. Als Analyseverfahren ist das Referenzverfahren DIN EN ISO 6579 zu verwenden. Gemäß Kapitel 3.2 sind Hackfleisch/Faschiertes und Fleischzubereitungen mindestens einmal wöchentlich zu untersuchen. Die Probenahmehäufigkeit kann auf eine 14-tägige Untersuchung verringert werden, wenn in 30 aufeinander folgenden Wochen befriedigende Ergebnisse erzielt wurden. Die Probenahmehäufigkeit kann noch weiter verringert werden, wenn in einem nationalen bzw. regionalen Salmonellen-Kontrollprogramm gezeigt wird, dass die Salmonellenprävalenz bei den vom Schlachthof gekauften Tieren gering ist.

Gemäß Kapitel 1, Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 gilt als Lebensmittelsicherheitskriterium für die Lebensmittelkategorie „Hackfleisch/Faschiertes, Fleischzubereitungen und Fleischerzeugnisse aus Geflügelfleisch – zum Verzehr in durcherhitztem Zustand, in Verkehr gebracht, während der Haltbarkeitsdauer – “ eine Nulltoleranz für Salmonellen (**Tabelle 2-5**). Die Analyseverfahren und Probenahmehäufigkeit sind gleich mit den Vorgaben für Hackfleisch, hergestellt aus anderen Tierarten.

Gemäß Kapitel 1, Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 gilt als Lebensmittelsicherheitskriterium für die Lebensmittelkategorie „Rohmilch und Rohmilchprodukte, Milch- und Molkepulver sowie Speiseeis – in Verkehr gebracht, während der Haltbarkeitsdauer – “ eine Nulltoleranz für Salmonellen (**Tabelle 2-5**). Als Analyseverfahren ist das Referenzverfahren DIN EN ISO 6579 anzuwenden.

### 2.9.2 Prozesshygienekriterien

Gemäß Kapitel 2.1., Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 wird der Nachweis von Salmonellen als Prozesshygienekriterium für die Lebensmittelkategorie Schlachttierkörper angewendet. Im Sinne eines attributiven Zweiklassenplans gilt ein Salmonellen-Ergebnis als „unbefriedigend“, wenn die Bedingung für  $c$  nicht erfüllt wird, d.h. der Wert für  $c$  wird überschritten. So gilt folgendes Ergebnis als „befriedigend“: beim Rind, kleinen Wiederkäuer und Pferd dürfen bei einer Stichprobeneinheit aus 50 Tierkörpern (definiert als Anzahl  $n$ , d. h. fünf Tierkörper aus je zehn Probenerhebungen) höchstens zwei Proben *Salmonella*-positiv (definiert als  $c$ ) sein. Für die Tierart Schwein gilt die Bedingung  $n = 50$ ,  $c = 5$ ; für die Tierart Geflügel gilt die Bedingung  $n = 50$ ,  $c = 7$  (**Tabelle 2-5**). Gemäß Kapitel 3.2 wird der Tierkörper von Haussäugetieren anhand einer Fläche von  $100 \text{ cm}^2$  mittels sog. „Kratzschwämmchentechnik“ beprobt. Dem Geflügelschlachttierkörper sind 10 g Halshautprobe zu entnehmen. Je Stichprobeneinheit werden 5 Sammelproben á 25 g gebildet, die aus  $5 \times 3$  Geflügelschlachttierkörpern, dies entspricht 150 g Probenmaterial, gezogen werden. Als Analyseverfahren ist das Referenzverfahren DIN EN ISO 6579 anzuwenden. Die Probenahmehäufigkeit kann auf eine 14-tägige Untersuchung verringert werden, wenn in 30 aufeinander folgenden Wochen befriedigende Ergebnisse erzielt wurden. Die Probenahmehäufigkeit kann noch weiter verringert werden, wenn in einem nationalen bzw. regionalen Salmonellen-Kontrollprogramm gezeigt wird, dass die Salmonellenprävalenz der vom Schlachthof gekauften Tiere gering ist.

## 2.10 Kulturelle Verfahren zum Nachweis von Salmonellen aus Lebensmitteln

### 2.10.1 Referenzverfahren

Der Nachweis von Salmonellen aus Lebensmitteln erfolgt nach standardisierten Verfahren. Die Referenzverfahren für den Nachweis von Salmonellen aus Lebensmitteln beruhen auf einer kulturellen Voranreicherung zur Resuszipation möglicherweise vorgeschädigter Zellen, einer anschließenden selektiven Anreicherung in ein oder mehreren flüssigen Nährmedien sowie einer nachfolgenden Subkultivierung auf ein oder zwei festen Selektivnährmedien. Salmonellen verdächtige Kolonien müssen serologisch und biochemisch bestätigt werden. Solche kulturellen Referenzverfahren sind langwierig und arbeitsaufwendig. Aufgrund der Lebensmittelkonservierung liegen Salmonellen häufig in subletal geschädigter Form vor (D'AOUST, 1981; BEUMER et al., 1991; BECKER et al., 1993; BLACKBURN, 1993; REISSBRODT, 1995; MANSFIELD und FORSYTHE, 2000; VAN DER ZEE, 2003).

Generell sind Salmonellen in Lebensmittel- und Umgebungsproben in nur geringer Zahl vorhanden, so dass ein Nachweis über ein Direktanreicherungsverfahren mit Selektivnährböden nicht gelingt (MACKEY, 1985). Auch die Direktanreicherung der Probenmatrix mit anschließender Zählung der Salmonellen gelingt nur selten, da z. B. auf Geflügelbroilern in der Regel nur wenige Salmonellen zu finden sind (JØRGENSEN et al., 2002). Das direkte Anreicherungsverfahren wurde zunächst von der amerikanischen Gesundheitsbehörde APHA („American Public Health Association“, engl.) für die Untersuchung von rohen oder stark kontaminierten Lebensmitteln übernommen. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass mit einer Voranreicherung von rohem Fleisch oder Abwasserproben die Nachweisraten auf bis zu 100 % gesteigert werden konnten (D'AOUST, 1981). So empfahlen auch VAN LEUSDEN et al. (1982) eine Kombination aus gepuffertem Peptonwasser („Buffered Peptone Water (BPW)“, engl.), Tetrathionatanreicherung nach Muller-Kauffmann (MKTT) bei 43 °C und Brillantgrün-Phenolrot-Laktose-Saccharose-Agar (BPLS) als Referenzmethode zum Nachweis von

Salmonellen aus Lebensmitteln, Futtermitteln, Fäzes und Wasser. In älteren Studien konnten EDEL und KAMPELMACHER (1973) bereits zeigen, dass in vergleichenden Untersuchungen von artifiziell und nativ kontaminierten Hackfleischproben ein Voranreicherungsverfahren höhere Nachweisraten erzielte als ein Direktanreicherungsverfahren.

Gegenwärtig findet man in der Literatur sowohl im europäischen, als auch im internationalen Raum standardisierte Verfahren zum Nachweis von Salmonellen in Lebensmitteln beschrieben (**Tabelle 2-6**). Die Auswahl der Nährmedien kann vor allem in Abhängigkeit vom Untersuchungsmaterial variieren. Im europäischen Raum sind Referenzverfahren in der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren (ASUV) nach § 64 Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch (LFGB), vormals § 35 Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetz (LMBG), im Schweizerischen Lebensmittel-Buch, in den Methoden des Britischen Institut für Normung BSI („British Standards Institute“, engl.) und in den Methoden des Nordischen Methoden-Komitees („Nordisk Metodik Komite“, norw.) beschrieben worden. International werden Referenzverfahren veröffentlicht durch die Internationale Normierungsorganisation ISO („International Organization for Standardization“, engl.), durch den Internationalen Milchwirtschaftsverband IDF („International Dairy Federation“, engl.), durch die Weltgesundheitsbehörde WHO bzw. Welternährungsbehörde FAO und durch die Internationale Kommission für mikrobiologische Lebensmittelspezifikationen ICMSF („International Commission of Microbiological Specifications for Foods“, engl.).

Nach SCHMIDT-LORENZ (1980), REISSBRODT (1995), TIETJEN und FUNG (1995) werden im US-amerikanischen Raum Referenzverfahren im Handbuch für bakteriologische Lebensmitteluntersuchungen BAM („Bacteriological Analytical Manual for Foods“, engl.) der Lebensmittel- und Arzneimittelbehörde FDA („Food and Drug Admistration“, engl.) sowie durch die Vereinigung der Lebensmittelchemiker AOAC („Association of Official Analytical Chemists“, engl.) und die Amerikanische Gesundheitsbehörde APHA („American Public Health Association“, engl.) beschrieben.

**Tabelle 2-6:** Auswahl an kulturellen Referenzverfahren zum Nachweis von Salmonellen aus Lebensmitteln (modifiziert nach SCHMIDT-LORENZ, 1980<sup>1</sup>; ANDREWS, 1992<sup>2</sup>; BECKER et al., 1993<sup>3</sup>; TIETJEN und FUNG, 1995<sup>4</sup>)

Voranreicherung	Selektivanreicherung	Subkultivierung	Referenz/Jahr
LB, TSB	SC, TT nach USP, RV	HE, XLD, BS	FAO/WHO <sup>2</sup>
LB, TSB, Nährbouillon	SC, TT	HE, XLD, BG	AOAC/FDA <sup>4</sup>
LB	SC, TT	SS, BS, HE	APHA <sup>4</sup>
BPW	RV, TT	XLD	DIN EN ISO 6579:2003
-	MKTT, SC	BPLS, BS	IDF 93A:1985 <sup>3</sup>
BPW	RV, SC	BG	IDF 93:2001
BPW	RV	BG	Nordisk Metodik Komitee (1991)
BPW	SC, TT	BG	§ 7, Anlage 4, Entwurf AVV Lebensmittelhygiene (2005)
Peptonnährbouillon	TT, SC, Selenit-Brillantgrün-Sulfapyridin-Bouillon	Salmonellen-Shigellen-Agar, BS, Desoxycholat-Citrat-Laktose-Saccharose-Agar, BG	Schweizerisches Lebensmittelbuch <sup>1</sup>
BPW	RV, SC	BG	BSI <sup>4</sup>

**Legende:**

LB, Laktose-Bouillon; TSB, Trypton-Soja-Bouillon; BPW, Buffered Peptone Water; SC, Selenit-Cystin-Bouillon; TT, Tetrathionat-Bouillon; USP, United States Pharmacopeia; RV, Rappaport-Vassiliadis-Bouillon; MK, Muller Kauffmann; HE, Hektoen-Enteric-Agar; XLD, Xylose-Lysin-Desoxycholat-Agar; BS, Bismut-Sulfit-Agar; BG, Brillantgrün-Agar; SS, *Salmonella-Shigella*-Agar; FDA, Food and Drug Administration; AOAC, Association of Official Analytical Chemists;

**Fortsetzung Legende:**

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations; WHO, World Health Organization; APHA, American Public Health Association; ISO, International Organization for Standardization; IDF, International Dairy Federation; AVV, Allgemeine Verwaltungsvorschrift; BSI, British Standards Institute

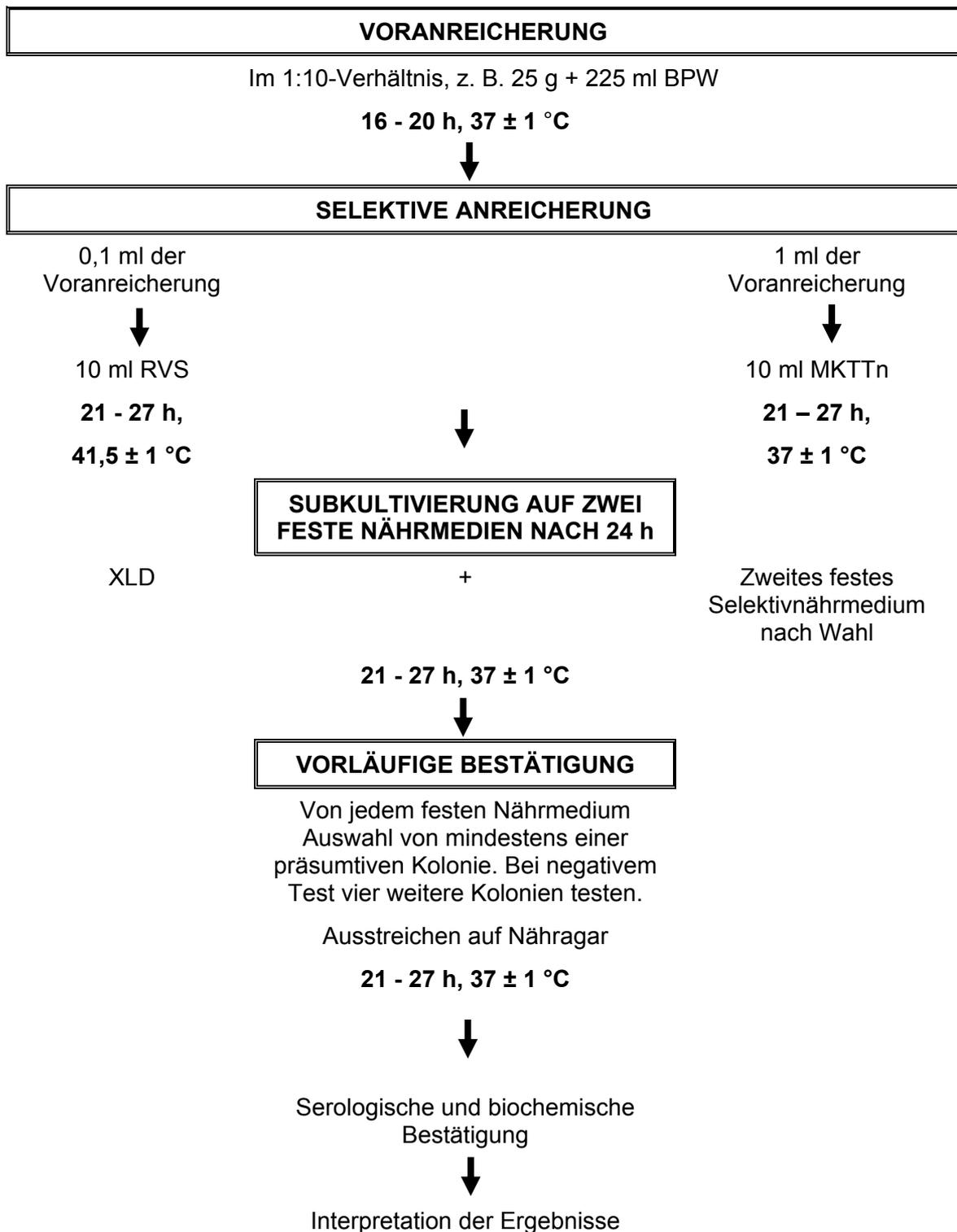
**2.10.1.1 Neues Referenzverfahren nach ASUV § 64 LFGB**

In der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren (ASUV) § 64 LFGB, Ausgabe Dezember 2004 ist derzeit unter der Lebensmittelmethode L 00.00-20 ein horizontales Verfahren nach DIN EN ISO 6579:2003 zum Nachweis von Salmonellen in Lebensmitteln und Futtermitteln beschrieben. Die endgültige Bestätigung der Salmonellen erfolgt nach der Lebensmittelmethode L 00.00-20a, Ausgabe Dezember 2004 und wird im nationalen Referenzlabor Salmonellen (NRL-Salm) in Berlin durchgeführt. In den vertikalen Lebensmittelmethoden L 01.00-13 (Milch), L 02.00-8 (Milchprodukte), L 03.00-7 (Käse), L 04.00-11 (Butter), L 05.00.9 (Eier), L 06.00-11 (Fleisch), L 07.00-11 (Fleischerzeugnisse), L 08.00-13 (Wurstwaren), L 20.01-9 (Majonäsen und Soßen), L 39.05.02-5 (Laktose), L 42.00-4 (Speiseeis) und L 48.01-16 (Säuglings- und Kleinkindernahrung) wird unmittelbar auf die horizontale Methode nach L 00.00-20 verwiesen.

Nach MOOIJMAN (2004) erscheint das horizontale ISO-Referenzverfahren nicht immer geeignet, um Salmonellen auch aus anderen Matrices zu isolieren, insbesondere aus Geflügelkot. Daher wird derzeit an einem Entwurf zur Ergänzung des Protokolls nach ISO 6579:2002 gearbeitet, der den Ersatz einer selektiven Anreicherung durch ein halbfestes Anreicherungsmedium wie „Modified Semisolid Rappaport Vassiliadis Medium“ (MSRV) oder „Diasalm“ vorsieht.

Die grundsätzlichen Untersuchungsschritte der horizontalen Referenzmethode sind beispielhaft unter Angabe der Nährmedien und Inkubationsbedingungen in der **Abbildung 2-1** aufgeführt. Das Ausgangsmaterial wird in einem 1:10-Verhältnis in gepuffertem Peptonwasser („Buffered Peptone Water (BPW)“, engl.), einem nicht-selektiven, flüssigen Nährmedium, für 16 bis 20 Stunden vorangereichert. Daraus wird

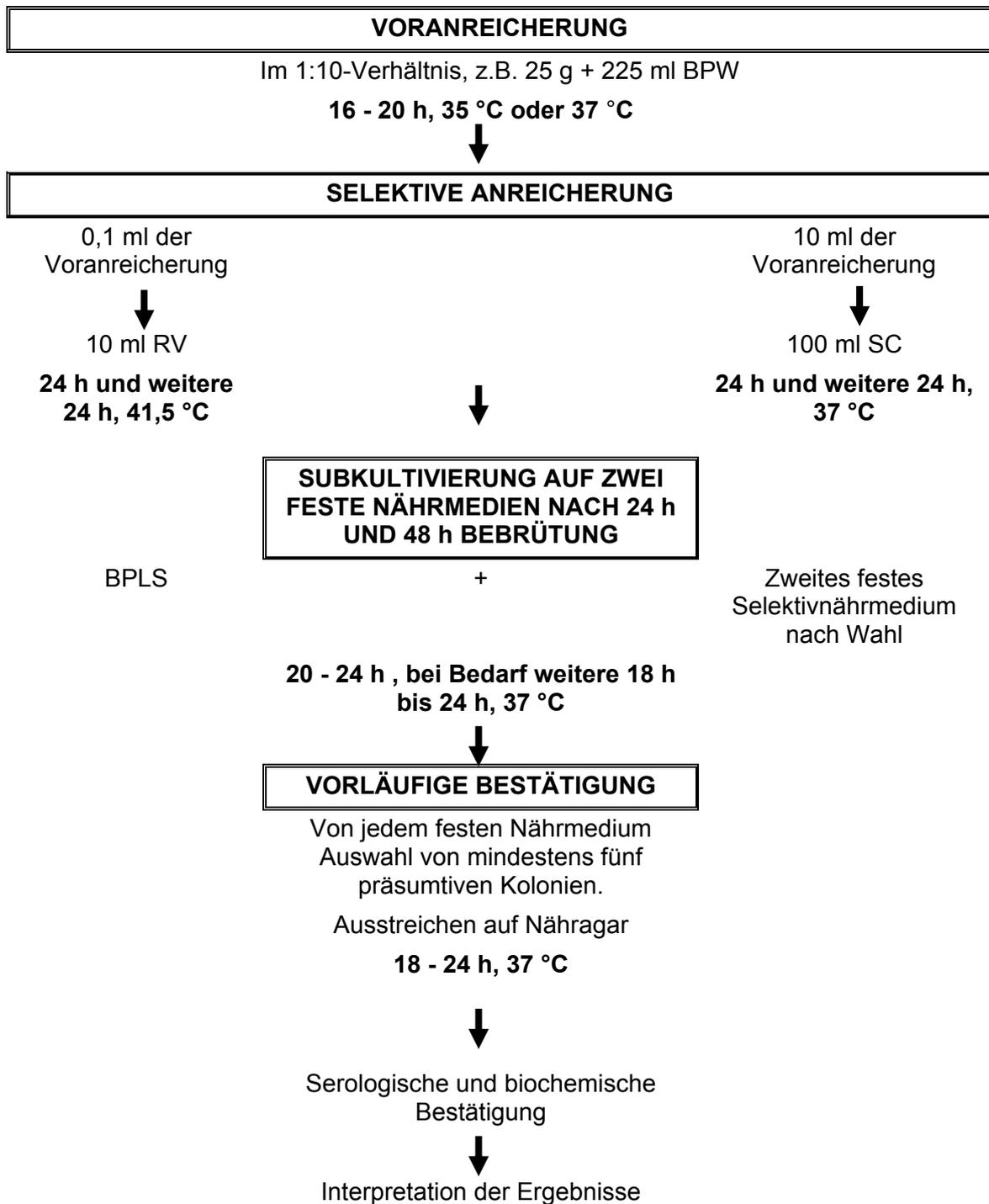
ein Inokulum in zwei selektive, flüssige Nährmedien überführt und bei 37 °C in Tetrathionatanreicherung nach Muller-Kauffmann mit Novobiocin (MKTTn) und bei 41,5 °C in Rappaport-Vassiliadis-Sojamehlpepton-Bouillon (RVS) bebrütet. Nach 24 Stunden Inkubation erfolgt eine Subkultivierung auf dem festen Referenzselektivnährboden Xylose-Lysin-Desoxycholat-Agar (XLD) und einem zweiten Medium nach Wahl. *Salmonella*-verdächtige Kolonien werden nach einer 24-stündigen Bebrütung identifiziert und auf einem Nähragar ausgestrichen. Nach einer weiteren 18 bis 27-stündigen Inkubation werden die Reinkulturen vorläufig bestätigt. Demnach dauert es vier Tage, um ein Salmonellen-negatives Ergebnis mit dem Referenzverfahren nach ASUV § 64 LFGB diagnostizieren zu können. Die vorläufige Bestätigung eines *Salmonella*-positiven Ergebnisses anhand einer präsumtiven Kolonie verlängert die Untersuchungsdauer um zwei weitere Arbeitstage auf ein bis zu sechstägiges Verfahren.

**Abbildung 2-1:**

Referenzverfahren zum horizontalen Nachweis von Salmonellen in Lebensmitteln und Futtermitteln gemäß L 00.00-20, ASUV § 64 LFGB (entspricht DIN EN ISO 6579:2003)

### 2.10.1.2 Altes Referenzverfahren nach ASUV § 64 LFGB

In der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren (ASUV), nunmehr § 64 LFGB, Ausgabe Februar 1998 wurde unter der Lebensmittelmethode L 00.00-20 das abgelöste Referenzverfahren beschrieben. Die endgültige Bestätigung der Salmonellen erfolgte nach der Lebensmittelmethode L 00.00-20a, Ausgabe November 1999. Die damalige L 00.00-20 entsprach dabei der DIN EN 12824:1998. Die grundsätzlichen Untersuchungsschritte der alten Referenzmethode nach DIN EN sind beispielhaft unter Angabe der Nährmedien und Inkubationsbedingungen in der **Abbildung 2-2** aufgeführt. Im Gegensatz zum neuen Referenzverfahren nach DIN EN ISO war eine Selektivanreicherung bei einer verlängerten Anreicherungszeit um weitere 24 Stunden in Rappaport-Vassiliadis (RV)-Medium und Selenit-Cystin (SC)-Medium vorgesehen. Als festes, selektives Referenznährmedium wurde Brillantgrün-Phenolrot-Laktose-Saccharose -Agar (BPLS) eingesetzt, der ebenso 24 Stunden und bei negativem Ergebnis weitere 24 Stunden bebrütet wurde. Demnach dauerte es sechs Tage, um ein Salmonellen-negatives Ergebnis mit dem alten Referenzverfahren bestätigen zu können. Die vorläufige Bestätigung eines *Salmonella*-positiven Ergebnisses anhand von fünf präsumtiven Kolonien verlängerte die Untersuchungsdauer um zwei weitere Arbeitstage auf ein bis zu achttägiges Verfahren.

**Abbildung 2-2:**

Horizontaler Nachweis von Salmonellen in Lebensmitteln bzw. Milch und Milchprodukten gemäß DIN EN 12824:1998 bzw. ISO 6785:2001 IDF 93:2001

Aus **Tabelle 2-7** ist ersichtlich, dass im Rahmen der Änderung des Normenwerkes die Rezeptur des BPW modifiziert wurde. Nach DIN EN ISO 6579:2003 wird nun konkret Caseinpepton als Nährbodengrundlage gefordert. Peptone im Allgemeinen sind Eiweisskörper, die fast allen üblichen Nährsubstraten als Stickstoffquelle zugesetzt werden. Ein enzymatischer Verdau durch Pepsin oder Trypsin metabolisiert die Peptone in Zwischen- und Endprodukte wie Peptide, Tryptophan und freie Aminosäuren (HALLMANN, 1953).

**Tabelle 2-7:** Rezeptur des gepufferten Peptonwassers (BPW) gemäß DIN EN 12824:1998 und DIN EN ISO 6579:2003

Zusammensetzung von BPW (g/l)	Nach DIN EN 12824:1998	Nach DIN EN ISO 6579:2003
Pepton	10,0	-
Casein, enzymatisch verdaut	-	10,0
NaCl	5,0	5,0
NaHPO <sub>4</sub>	9,0	9,0
KHPO <sub>4</sub>	1,5	1,5

Aus **Tabelle 2-8** ist ersichtlich, dass im Rahmen der Änderung des Normenwerkes die Rezeptur des RV-Mediums modifiziert wurde. Nach DIN EN ISO 6579:2003 wird nun konkret Sojamehlpepton als Grundlage gefordert und somit wird RVS-Medium eingesetzt. Trypton oder Trypsin-verdaute Peptonsubstrate dienen als Ersatz für Nährböden auf Fleischwasserbasis. Sojamehl-Grundsubstrate sind ebenso ein geeigneter Ersatz für Fleischwasser und werden bei der Anzucht anspruchsvoller Bakterienarten (z. B. Milchsäurebakterien, Bifidobakterien) sogar bevorzugt (HALLMANN, 1953).

**Tabelle 2-8:** Rezeptur von RV(S)-Medium gemäß DIN EN 12824:1998 und DIN EN ISO 6579:2003

Zusammensetzung von RV bzw. RVS (g/l)	Nach DIN EN 12824:1998	Nach DIN EN ISO 6579:2003
Trypton oder Sojapepton	4,5	-
Sojamehlpepton	-	5,0
NaCl	8,0	8,0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,6	1,4
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	-	0,2
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	40,0	40,0
Malachitgrün	0,04	0,04

### 2.10.1.3 Alternatives Verfahren zur Untersuchung von Milch und Milchprodukten

Die DIN EN 12824:1998 geht konform mit der internationalen, vertikalen Methode für die Untersuchung von Milch und Milchprodukten gemäß ISO 6785:2001 und IDF 93:2001 (vgl. **Abbildung 2-2**). BECKER et al. (2003) konnten zeigen, dass bei vergleichenden Untersuchungen von artifiziell kontaminierten Rohmilchproben weder mit dem alten Referenzverfahren gemäß DIN EN 12824:1998 noch mit dem neuen Referenzverfahren gemäß DIN EN ISO 6579:2003 eine Steigerung der Sensitivität erzielt werden konnte. Bei der Untersuchung von artifiziell kontaminiertem Käse erzielte die revidierte Methode eine um 5 % niedrigere Sensitivität. Demnach schlussfolgerten die Autoren, dass mit der revidierten Methode tendenziell vermehrt falsch-negative Ergebnisse auftreten könnten.

Nach BECKER et al. (1993) finden sich im Schrifttum jedoch nur sehr wenig Daten zu Untersuchungen von Rohmilch auf Salmonellen. Dabei wurden bisher nur Verfahren mit Voranreicherung und Direktanreicherungsverfahren verglichen. Somit lassen sich keine mehrfach eindeutig belegten Schlussfolgerungen über die Effizienz verschiedener Anreicherungsverfahren zum Nachweis von Salmonellen aus Milch und Milchprodukten ziehen. VAN LEUSDEN et al. (1982) empfahlen für die Untersuchung von Milchpulver eine 30-minütige Vorinkubation bei Raumtemperatur von 25 g der Probe in 50 ml BPW mit einer anschließenden Verdünnung durch Zugabe von weiteren 175 ml BPW. Das langsame Auflösen des Milchpulvers in der Voranreicherung durch vorsichtiges Schwenken erzielte dabei keine vergleichbaren, da nicht reproduzierbaren Ergebnisse. MOHAMMED et al. (1996) verglichen verschiedene kulturelle Anreicherungsverfahren gemäß Standardprotokoll anhand von 57 artifiziell kontaminierten Rohmilchproben. Es wurden die Selektivanreicherungen SC (37 °C), RV, RVS und MKTT (alle 42 °C) miteinander verglichen. Eine Subkultivierung erfolgte nach 24 und 48 Stunden auf den Nährböden Mannit-Lysin-Kristallviolett-Brillantgrün-Agar (MLCB), BPLS, XLD, *Salmonella-Shigella*-Agar (SS) und Rambach-Agar (RA), die für 24 h inkubiert wurden. Die erzielte Sensitivität und Spezifität der einzelnen Nährmedienkombinationen wurde vergleichend betrachtet. Die

Autoren erzielten bei der Untersuchung von artifiziell kontaminierten Rohmilchproben die beste Wiederfindungsrate mit einer Anreicherung in RVS und Subkultivierung auf MLCB sowie XLD. Die niedrigste Wiederfindungsrate wurde bei der Kombination MKTT mit RA festgestellt. Ein tatsächlicher methodischer Vergleich anhand einer abhängigen Stichprobe wurde jedoch nicht abgeleitet.

### 2.10.2 Herkömmliche flüssige Nährmedien zur Voranreicherung

Bei der Kultivierung von Bakterien in künstlichen Nährsubstraten kommt es, analog den Vorgängen in der Natur, zu komplizierten Stoffwechselprozessen. Im Rahmen dieser mikrobiellen chemischen Synthese beobachtet man einerseits einen dissimilierenden, vorwiegend enzymatischen Abbau und andererseits eine Assimilation der im Nähragar angebotenen Substrate (HALLMANN, 1953). Mikroorganismen können in Lebensmitteln durch Herstellungsprozesse wie Trocknung, Säuerung oder Einfrieren unterschiedlich stark geschädigt werden. Die Voranreicherung dient daher der Wiederbelebung bzw. Resusztation subletal geschädigter Salmonellen (EDEL und KAMPELMACHER, 1973; D'AOUST und MAISHMENT, 1979). Subletal geschädigte Zellen sind zwar in Hinblick auf Enzymaktivität, Metabolismus und Atmung intakt, aber sie zeigen auf üblichen Kulturmedien kein Wachstum (ROSZAK und COLWELL, 1987; MANSFIELD und FORSYTHE, 2000). Nach VAN LEUSDEN et al. (1982) stellt die Voranreicherung somit den kritischsten Schritt der Referenzmethode dar.

Gepuffertes Peptonwasser wurde erstmalig von VAN SCHOTHORST und VAN LEUSDEN (1972) beschrieben. Es konnte gezeigt werden, dass Kohlenhydrate für eine Resusztation nicht erforderlich sind. BPW behält im Lauf der Bebrütung einen stabilen pH-Wert, der für das Wachstum der Salmonellen günstig ist. SADOVSKI (1977) konnte zeigen, dass der pH-Wert des inkubierten BPWs nach null bis acht Stunden bei ca. 7,1 liegt und bereits nach 22 Stunden auf unter 5,0 abfällt. Dabei ist zu bedenken, dass durch eine Tieffrierung geschädigte Salmonellen besonders säureempfindlich reagieren. Daher darf eine 20-stündige Inkubationsdauer nicht überschritten werden und der Einsatz von Laktose-Bouillon ist nicht zu empfehlen. Es ist aber auch bekannt, dass bei

einer Voranreicherung in BPW ein hoher Anteil der nicht geschädigten Begleitflora zu einem Überwuchern der Salmonellen führen kann (BEUMER et al., 1991).

Laktose-Bouillon wurde von NORTH (1961) erstmals als ein laktosehaltiges Voranreicherungsmedium für den Nachweis von Salmonellen aus Ei und Eiprodukten beschrieben. Im europäischen Bereich hat sich der Einsatz von gepufferten Peptonwasser durchgesetzt oder wird der Laktose-Bouillon als gleichwertig angesehen. Laktose-Bouillon wird vor allem in den USA noch vielfach auch für andere Untersuchungsmaterialien verwendet (BECKER et al., 1993). D'AOUST und MAISHMENT (1979) verglichen mehrere Voranreicherungsmedien miteinander und stellten fest, dass die Inkubationszeit einen größeren Einfluss auf die Nachweisrate von Salmonellen in Lebensmitteln und Futtermitteln hat, als die unterschiedliche Zusammensetzung der von ihnen geprüften Nährmedien. Bei einer 24-stündigen Inkubationszeit wird die Nachweisrate von der Menge des überführten Inokulums nicht beeinflusst. Nach einer sechsstündigen Voranreicherung hängt die Salmonellen-Nachweisrate unter anderem direkt vom Inokulationsvolumen ab, welches in die Selektivanreicherung überführt wird (D'AOUST, 1981).

**Tabelle 2-9** zeigt eine Übersicht international verbreiteter Standardnährmedien, die zur Voranreicherung von Salmonellen in Lebensmitteln eingesetzt werden. Gepuffertes Peptonwasser BPW („Buffered Peptone Water“, engl.) kann für jede Matrix genutzt werden, Laktose-Bouillon LB („Lactose Broth“, engl.) empfiehlt sich für Lebensmittel mit einem pH größer als 6,0 wie z. B. Eiern, und Trypton-Soja-Bouillon (TSB) wird bei der Untersuchung von Gewürzen, Kräutern oder Trockenhefe verwendet (REISSBRODT, 1995).

**Tabelle 2-9:** Flüssige Standardnährmedien für die Voranreicherung von Salmonellen (nach D'AOUST, 1981)

<b>Standard</b>	<b>Nährmedium</b>
AOAC/APHA	Laktose-Bouillon Brillantgrün mit Wasser
FDA	Laktose-Bouillon Trypton-Soja-Bouillon Brillantgrün mit Wasser Magermilch mit Brillantgrün Nährbouillon
HPB	Nährbouillon Brillantgrün mit Wasser Trypton-Soja-Bouillon Magermilch mit Brillantgrün
ICMSF	Laktose-Bouillon BPW Brillantgrün mit Wasser Magermilch mit Brillantgrün
ISO	BPW Ringerlösung mit Brillantgrün
NAS	Laktose-Bouillon Brillantgrün Wasser
USDA	Laktose-Bouillon

**Legende:**

AOAC, Association of Official Analytical Chemists; APHA, American Public Health Association; FDA, Food and Drug Administration; HPB, Health Protection Branch; ICMSF, International Commission on Microbiological Specifications for Foods; ISO, International Organization for Standardization; NAS, National Academy of Sciences; USDA, United States Department of Agriculture

### 2.10.3 Herkömmliche flüssige Nährmedien zur Selektivanreicherung

Flüssige Selektivmedien haben ihre besondere Berechtigung als Anreicherungsmedien oder für die Bestimmung niedriger Keimgehalte. Generell entsteht beim Einsatz von Selektivnährböden die Diskrepanz zwischen einem erwünschten hohen Grad an Selektivität und einem unerwünschten Maß an zu geringer Anwachsrate (REUTER, 1970). Dabei beeinflussen die Bebrütungstemperaturen nachhaltig die Produktivität der Selektivanreicherung, weil nur das Wachstum der Begleitflora, jedoch nicht das Wachstum der Salmonellen unterdrückt werden sollte. Generell führt eine Erhöhung der Inkubationstemperatur zu einer Erhöhung der *Salmonella*-Nachweisrate (D'AOUST, 1981).

Im Anschluss an die Voranreicherung erfolgt eine selektive Anreicherung in flüssigen Medien, wobei sich von den zahlreichen Selektivmedien im europäischen Raum die folgenden drei im Lebensmittelbereich durchgesetzt haben: das Selenit-Cystin-Medium (SC) nach NORTH und BARTRAM (1953), das Tetrathionat-Medium (MKTT) nach MULLER (1923) und KAUFFMANN (1935) sowie das Rappaport-Vassiliadis-Medium (RV) nach RAPPAPORT et al. (1956) und VASSILIADIS et al. (1976). Beim Standardverfahren werden unter Berücksichtigung der Tatsache, dass einige Salmonellenstämme auf bestimmte Selektivstoffe empfindlich reagieren, zwei Selektivmedien auf unterschiedlicher Hemmstoffbasis bei unterschiedlichen Bebrütungstemperaturen parallel eingesetzt. Eine vollständige Unterdrückung der Begleitflora wird in der Praxis jedoch nicht erreicht (VASSILIADIS et al., 1984; BUSSE, 1995).

LEIFSON (1936) bezeichnete die Selenitbouillon als preiswertes Nährmedium, das eine einfache Zusammensetzung aufweist und dessen Inhaltsstoffe mit Ausnahme des Peptons eine bekannt gleich bleibende Qualität haben. Die erste Selenitbouillon wurde im Jahr 1916 von GUTH beschrieben. Selenitsalze dienen dem Nachweis der bakteriellen Reduktase, was zu einem dunkelroten Niederschlag führt. *S. Paratyphi* A und B lassen sich aufgrund ihrer unterschiedlichen Reduktaseaktivität differenzieren. Selenitsalze erhöhen gleichzeitig die Selektivität der Bouillon. Natriumselenit reagiert stark

alkalisch und Natriumhydrogenselenit leicht alkalisch. Alle Selenitsalze sind stark toxisch, wobei die Toxizität bei zunehmend saurem pH ansteigt. In Gegenwart von Natriumchlorid, Natriumphosphat, Fleischextrakt oder Casein verringert sich die Toxizität. LEIFSON unterteilte die Bakterien in fünf Gruppen und beschrieb, dass *S. Typhi* und *S. Paratyphi* sowie der „Cholera bacillus“, der Gruppe eins zugeordnet, gegenüber Natriumselenit am unempfindlichsten seien. Hingegen wurden grampositive Erreger der Gruppe vier und fünf zugeordnet, weil bereits bei geringen Konzentrationen von Natriumselenit das Wachstum stark beeinträchtigt wurde. LEIFSON (1936) beschrieb drei verschiedene Selenitanreicherungsbouillons: Das „Selenite-F(eces)-Medium“ zur Anzucht von typhoiden Erregern aus Fäzes, das „Selenite-S(ewage)-Medium“ zur Anzucht von typhoiden Erregern aus Abwässern und das „Selenite-M(ilk)-Medium“ zur Anzucht von typhoiden Erregern aus Milch. Der Zusatz von 1,0 µg/l Cystin und die Reduktion des Phosphatgehalts auf 0,25 % erhöht die Salmonellennachweisrate der Selenitanreicherung deutlich (NORTH und BARTRAM, 1953).

MULLER beschrieb 1923 ein neuartiges Nährmedium zur Anreicherung von typhoiden Bazillen. Auf Grundlage von Tetrathionat, welches aus der Reaktion von Natriumthiosulfat mit Kaliumjodidlösung entsteht und durch Kalziumkarbonat abgepuffert wird, können Typhus- und Paratyphuserreger angezüchtet und das Wachstum von *E. coli* um den Faktor fünf bis sechs verringert werden. Eine mit Brillantgrün und Galle kombinierte Tetrathionat-Anreicherungsbouillon wurde von KAUFFMANN (1935) erstmalig beschrieben. Nach den Untersuchungen von KAUFFMANN wurden die günstigsten Ergebnisse bei der Anreicherung von „Enteritis bacillen“ verzeichnet, weil die Nachweisraten um 600 % beim „Mäusetyphus bacillus“ und um 700 % beim „Gärtner bacillus“ gesteigert werden konnten. Um eine wirksame Ausschaltung von *Proteus* spp. zu erzielen, empfahl der Autor nicht nur das Schwärmen in der Anreicherung mittels Antiserum zu unterdrücken, sondern auch das Schwärmen auf den festen Nährböden zu verhindern. Die Hemmung der Begleitflora geht nicht allein von Tetrathionat aus. Sowohl Tetrathionat als auch Thiosulfat reagieren mit Sulfhydrylgruppen von Enzymen. Dies beeinflusst sowohl die Syntheseleistung und Aktivität der Enzyme als auch die Zellwand- und Membranbestandteile (PALUMBO und ALFORD, 1970). Die Tetrathionatreduktase wird nicht nur von Salmonellen, sondern auch von *Proteus* spp. exprimiert. Um das Wachstum von *Proteus* spp. zu unterdrücken

wurde daher von JEFFRIES (1959) vorgeschlagen, dem Medium Novobiocin zuzusetzen. Die Rezeptur des so genannten MKTTn konnte sich jedoch nicht durchsetzen (VAN DER ZEE, 2003). In einer Untersuchung von Umgebungsproben aus der Geflügelproduktion von TATE et al. (1990) erwies sich hingegen die Substitution von Novobiocin in festen Nährmedien als vorteilhaft, weil die Nachweisrate um 32 % gesteigert werden konnte. Nach VAN DER ZEE (2003) werden in der Literatur zahlreiche Variationen von Tetrathionat (TT)-haltigen Nährmedien beschrieben. So wurde von HAJNA im Jahr 1965 eine TT-Modifikation vorgeschlagen, die zusätzlich Hefeextrakt als Wachstumsfaktor enthält. Bekannt wurde diese Monographie als United States Pharmacopeia (USP)-Rezeptur. Nach VAN LEUSDEN et al. (1982) haben zahlreiche Untersuchungen verschiedener Labore gezeigt, dass die Formulierung nach Muller Kauffmann als die beste Tetrathionat-Rezeptur anzusehen ist. ANDREWS (1992) verwies darauf, dass die Tetrathionat-Anreicherung Kalziumkarbonat und Natriumthiosulfat enthält, was zur Bildung eines Niederschlags im Grundmedium führt. Daher ist ein gründliches Mischen des Nährmediums vor Gebrauch unabdingbar.

Das Rappaport-(R) Medium wurde erstmals von RAPPAPORT et al. (1956) beschrieben. Die Vorteile des Mediums liegen darin, dass einerseits Salmonellen angereichert werden können und andererseits die coliforme Begleitflora abgetötet wird. Das Medium enthält 4 % Magnesiumchlorid und 0,012 % Malachitgrün. Magnesiumchlorid wurde eingesetzt, weil bekannt ist, dass intestinale Bakterien unterschiedlich empfindlich auf eine Dehydrierung reagieren. Dabei ist Magnesiumchlorid das am stärksten selektiv wirkende Salz, denn in einer 4 %-igen Lösung werden *E. coli* und *Proteus* spp. bereits vollständig in ihrem Wachstum gehemmt. Malachitgrün, als Hemmstoff verwendet, wurde bereits von LÖFFLER beschrieben. Malachitgrün hemmt die coliforme Begleitflora, aber auch *S. Typhi*-Stämme und wirkt in Kombination mit Magnesiumchlorid toxischer als bei Verwendung als Einzelkomponente. Rappaport-Medium enthält ferner Trypsinpepton, weil dies entscheidend für das Wachstum der Salmonellen ist. In einer erstmaligen Evaluierung anhand von 3.391 klinischen Proben konnten RAPPAPORT et al. (1956) zeigen, dass das Rappaport-Medium sensitiver als Selenitbouillon oder Tetrathionat-Anreicherung ist und am besten für eine Salmonellenanreicherung mit Ausnahme von *S. Typhi* geeignet ist.

Nach VASSILIADIS et al. (1984) wurde ein modifiziertes Rappaport-Medium im Jahr 1970 als so genanntes R25-Medium in der Literatur erwähnt und in einer zweiten Modifikation im Jahr 1976 als so genanntes R10-Medium von VASSILIADIS et al. erstmals beschrieben. Die für R10-Medium alternative Bezeichnung „Rappaport-Vassiliadis (RV)-Medium“ wurde von PAPADAKIS und EFSTRATIOU im Jahr 1980 eingeführt. Im Gegensatz zu Rappaport-Medium und R25, die auch bei 37 °C bebrütet werden können, muss RV stets bei 43 °C inkubiert werden. RV-Medium erwies sich bei der Untersuchung von 409 Proben von Fleisch und Fleischerzeugnissen als sensitiver als R-Medium.

VASSILIADIS et al. (1985) empfahlen ein Inokulum von 0,1 ml der Voranreicherung in 10 ml RV als günstigstes Verhältnis. Bei der Untersuchung von 497 Geflügel- und Schweinefleischproben wurden damit signifikant bessere Ergebnisse erzielt als mit einem Inokulum von 0,5 oder 1,0 ml in 100 ml RV. Nach VASSILIADIS et al. (1985) kann je nach Empfindlichkeit der Serovaren ein größeres Inokulum von 0,5 ml bessere Ergebnisse erzielen, wie die Untersuchungen von Abwässern von HARVEY und PRICE im Jahr 1983 gezeigt haben.

Nach VAN DER ZEE (2003) wurde eine Modifikation von VAN SCHOTHORST und RENAUD Ende der 80er Jahre vorgeschlagen, als sie herausfanden, dass ein Ersatz des Tryptons durch Sojamehlpepton die Nachweisrate von *Salmonella* spp. erhöht. Auch in den Untersuchungen von MAIJALA et al. (1992) konnte gezeigt werden, dass Sojamehlpepton im Vergleich zu Caseinpepton signifikant besser für eine Salmonellenanreicherung geeignet ist.

#### **2.10.4 Herkömmliche feste Nährmedien zur Subkultivierung**

TAYLOR (1965) beschrieb erstmalig eine Gruppe von Xylose-Lysin-Agar als neuartige Nährmedien für die Isolierung von pathogenen Darmbakterien. Nach TAYLOR (1965) bestehen die Vorzüge des Xylose-Lysin-Desoxycholat-Agar (XLD) darin, dass ohne Sensitivitätsverlust Desoxycholat zur Hemmung der coliformen Begleitflora eingesetzt wird und damit insbesondere die klinische Diagnostik von Shigellen, anderen

pathogenen Darmbakterien und empfindlichen Salmonellen-Stämmen gelingt. Die Vorzüge des Xylose-Lysin-Brillantgrün-Agar (XLBG) bestehen darin, dass Brillantgrün als Hemmstoff eingesetzt wird und damit insbesondere der Nachweis von nontyphoiden Salmonellen im Bereich der Lebensmitteldiagnostik gelingt. Die Vorzüge beider XL-Agar bestehen ferner darin, dass eine 24-stündige Inkubation ausreichend ist. Shigellen werden über ihre negative Xylose-Reaktion präsumtiv erfasst. Um Salmonellen, die Xylose-positiv sind, von apathogenen Bakterien abzugrenzen, wurde als alkalischer Stoffwechselschritt die Salmonellen-spezifische Dekarboxylierung von Lysin eingefügt. Als weiteres Indikatorsystem des XL-Agars wird das H<sub>2</sub>S-Bildungsvermögen von Salmonellen genutzt. Demnach stellen sich Salmonellen auf XL-Agar kulturell als rote Kolonien mit schwarzem Zentrum dar. Shigellen und H<sub>2</sub>S-negative Salmonellenstämme erscheinen als rote Kolonien. *E. coli* und coliforme Keime erscheinen als gelbe Kolonien.

Nach BECKER et al. (1993) gehen alle brillantgrünhaltigen festen Selektivnährböden auf KRISTENSEN et al. aus dem Jahr 1925 zurück. Inzwischen liegen zahlreiche Modifikationen vor, von denen sich im internationalen Bereich vor allem der von EDEL und KAMPELMACHER im Jahr 1969 beschriebene BPLS-Agar durchsetzen konnte. Brillantgrün-Phenolrot-Laktose-Saccharose-Agar (BPLS) enthält als Selektivum Brillantgrün, was zu einer Wachstumshemmung der grampositiven Keime führen soll. Das enthaltene Zucker-Indikator-System aus Laktose, Saccharose und Phenolrot dient der Differenzierung von Laktose-fermentierenden Keimen. Ein Farbumschlag von Nährmedium und Kolonien entsteht bei einer Alkalisierung (rot) oder Ansäuerung (gelb). Mikroorganismen wie Salmonellen, die in der Regel keine Laktose oder Saccharose fermentieren, bauen die im Medium enthaltenen Peptone ab, was zu einer Alkalisierung führt. Die coliforme Begleitflora fermentiert hingegen Laktose. Diesen Vorzügen einer einfachen präsumtiven Erfassung von Salmonellen stehen einige Nachteile gegenüber. Atypische, Laktose-fermentierende *Salmonella* spp. werden von BPLS nicht detektiert. Auf BPLS kann zudem ein überwucherndes Wachstum von *Proteus* spp. und anderen gramnegativen Keime auftreten (EDEL und KAMPELMACHER, 1969).

COX (1993) wies auf die Problematik hin, dass manche Laktose-fermentierenden und typhoiden Salmonellen auf Selektivnährböden wie Rambach-Agar (RA) oder Mannit-Lysin-Kristallviolett-Brillantgrün-Agar (MLCB) nicht erfasst werden können. Daher beschrieb COX erstmalig Lysin-Mannitol-Glycerol-Agar (LMG), eine Komposition aus XLD nach TAYLOR (1965) und dem von INNOUE im Jahr 1968 erstmals beschriebenen MLCB. Typische und atypische Salmonellen werden anhand der entstehenden Alkalisierung des Nährbodens, bedingt durch primären Mannitolabbau, gefolgt von Lysin- und Peptonabbau, und anhand der H<sub>2</sub>S-Bildung detektiert. Die H<sub>2</sub>S-Bildung von *Citrobacter freundii* wird durch eine bis zu sieben Tage anhaltende Ansäuerung des Nährbodens unterdrückt, die bei der Metabolisierung sowohl von Mannitol als auch Glycerol entsteht. Typhoide Salmonellen können auf LMG wachsen, da hemmendes Brillantgrün im Nährboden nicht enthalten ist. Im Vergleich zu MLCB hat LMG den weiteren Vorteil, dass mit dem Nährboden eine höhere Spezifität erreicht wird.

BECKER et al. (1993) empfahlen den Einsatz von BPLS in Kombination mit MLCB, wenn stark kontaminiertes Untersuchungsmaterial vorliegt oder die Anwesenheit von Laktose-positiven *Salmonella* spp. zu erwarten ist. VAN LEUSDEN et al. (1982) merkten jedoch an, dass ein Überschwärmen der festen Nährmedien durch *Proteus* spp. auch durch ein sorgfältiges Vortrocknen der Platten verhindert werden kann.

MILLER et al. (1991) beschrieben erstmalig die Evaluierung des Xylose-Lysin-Tergitol 4-Mediums (XLT4) anhand von Typenstämmen und Geflügelstall-Umgebungstupfern. XLT4 stellt eine Verbesserung der Rezeptur von XL-Nährböden dar. Als Hemmstoff werden 4,6 ml/l Tergitol 4 (Fa. Sigma) eingesetzt, welches eine starke Hemmung von *Proteus*, *Pseudomonas* und *Providencia* spp. erzielt. Nach 24-stündiger Inkubation stellen sich H<sub>2</sub>S-bildende Salmonellen als glatte, weiche, schwarze Kolonien oder Kolonien mit einem schwarzem Zentrum dar, die aufgrund des Xylose-Abbaus einen gelben oder aufgrund des Lysinabbaus einen roten Rand aufweisen. MILLER et al. (1994) beschrieben, dass die Substitution der Rezeptur mit 1,2 g/l Proteosepepton Nr. 3 (Fa. Difco) zu einer schnelleren und intensiveren H<sub>2</sub>S-Bildung auf XLT4-Agar führt. Demnach können auch schwache („weak“, engl.) H<sub>2</sub>S-bildende Stämme nachgewiesen werden. Atypische Salmonellen erscheinen als rötlich-gelbe Kolonien. Demnach eignet

sich der Nährboden für die Untersuchung von Lebensmitteln, Umgebungsproben und klinischen Proben.

DUSCH und ALTWEGG (1995) verglichen XLT4 mit Hektoen-Enteric-Agar (HE), Rambach-Agar (RA), „*Salmonella* Detection and Identification Medium“ (SM ID), Novobiocin-Brillantgrün-Laktose-Medium und „Modified Semisolid Rappaport Vassiliadis Medium“ (MSRV) hinsichtlich ihrer Eignung, non-typhoide Salmonellen aus Stuhlproben nachzuweisen. Überprüft wurden 593 Proben im Direktausstrichverfahren und nach Anreicherung in Tetrathionat. Alternativ zu dem empfehlenswerten, hochsensitiven MSRV-Medium wird XLT4 empfohlen, weil der Nährboden eine hohe mit HE vergleichbare Sensitivität bei einer nahezu 100 %-igen Spezifität aufweist.

### 2.10.5 Chromogene Nährmedien

Die in diesem Kapitel beschriebenen chromogenen Nährmedien sind in der **Tabelle 2-10** hinsichtlich der enthaltenen chromogenen Substrate, dem zu erfassenden Keimspektrum und der spezifischen Enzyme sowie der kulturellen Merkmale zusammenfassend dargestellt.

Die Substitution mit synthetischen fluorogenen oder chromogenen Substraten in Selektivnährböden ermöglicht den direkten qualitativen Nachweis von Kolonien oder ein quantitatives Auszählverfahren auf der Platte. Gleichzeitig wird die Genauigkeit („Accuracy“, engl.) des Nachweisverfahrens verbessert und die Untersuchungsdauer verkürzt (MANAFI, 1996). Nach MINET et al. (2001) wurden in jüngerer Zeit chromogene Nährmedien entwickelt, um den spezifischen Nachweis der Aktivität von Salmonellen-spezifischen Enzymen zu ermöglichen.

Nach AAMLID et al. (1989) ist das ideale chromogene Substrat wasserlöslich, farblos, leicht zu metabolisieren und ergibt ein stabiles, farbintensives Spaltungsprodukt. Diese Eigenschaften haben phenolische Chromophore, die aus Phenyl-, Naphtyl- oder Nitrophenylderivaten abgespalten werden. Chromogene Substrate wurden erstmalig im Bereich der Immunologie eingesetzt. Das Chromogen reagiert mit dem gebundenem

Antikörper-Enzym-Komplex, was zur Bildung einer Farbstoffkonzentration führt, anhand derer die Konzentration des Ziel-Antigens indirekt nachgewiesen werden kann. Zur Spaltung der Chromogenen in Immunoassays werden am häufigsten stabile Enzyme wie Meerrettich-Peroxidase, alkalische Phosphatase oder *E. coli*- $\beta$ -Galaktosidase eingesetzt.

Chromogene Nährmedien wurden erstmals von RAMBACH (1990) zur Differenzierung von Salmonellen und Enterobacteriaceae beschrieben sowie von DUSCH und ALTWEGG (1993) anhand von klinischen Stuhlproben verglichen. RAMBACH beschrieb im Jahr 1990 als eine neuartige, biochemische Charakteristik von Salmonellen die Fähigkeit Propylenglycol abzubauen (PG+). Die dabei entstehende Ansäuerung des sogenannten Rambach-Agars (RA) wird durch Neutralrot nachgewiesen. Daher erscheinen non-typhoide Salmonellen (PG+) phänotypisch als rote Kolonien. Die Aktivität der  $\beta$ -Galaktosidase ( $\beta$ gal+) coliformer Keime wird durch das chromogene X-Gal nachgewiesen. Phänotypisch erscheinen coliforme Keime ( $\beta$ gal+) blau. Stämme, die sowohl  $\beta$ gal+ als auch PG+ sind, erscheinen auf Rambach-Agar violett. Zur Hemmung der Begleitflora wird Desoxycholat eingesetzt. In den von RAMBACH durchgeführten Untersuchungen konnte an 100 non-typhoiden *Salmonella*-Stämmen gezeigt werden, dass 97 % der Stämme nach 16-24 h Bebrütung Propylenglycol abbauen. Die Untersuchung von 70 Wasser- und Lebensmittelproben mittels Rambach-Agar erbrachte im Vergleich mit Brillantgrün-Agar identische Ergebnisse.

FREYDIERE und GILLE beschrieben 1991 den „C8-Esterase-Spot-Test“ als spezifisches fluorogenes Bestätigungsverfahren zum Nachweis von Salmonellen einschließlich *S. Typhi* und anderen atypischen Salmonellen.

Nach COOKE et al. (1999) liessen RICHARDSON et al. und RICHARDSON und COOKE in den Jahren 1993 und 1998 ihre neu entwickelten chromogenen C<sub>4</sub>- bis C<sub>10</sub>-Esterasesubstrate patentieren. COOKE et al. (1999) beschrieben dann erstmalig das „Chromogenic *Salmonella* Esterase-Medium“ (CSE). Als chromogenes Substrat enthält CSE 4-2-4-Octanoyloxy-3,5-Dimethoxyphenyl-Vinyl-Quinolinium-1-Propan-3-yl-Carboxylat-Bromid (SLPA-Octanoat), ein Ester aus einer C<sub>8</sub>-Fettsäure und einem phenolischem Chromophor, welches von der C<sub>8</sub>-Esterase der Salmonellen abgespalten wird. Das Phenol reichert sich innerhalb der *Salmonella*-Kolonien an und führt zu einer

sichtbaren, burgunderroten Verfärbung. Bei einigen Laktose-fermentierenden Stämmen, die eine Absenkung des Nährboden-pHs bewirken, verfärbt sich das Koloniezentrum schwach rötlich wie z. B. bei *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp. und Laktose-fermentierenden Salmonellen. Non-*Salmonella* spp. lassen sich jedoch überwiegend aufgrund ihrer weißen, cremefarbenen, gelben oder transparenten Koloniefärbung von Salmonellen unterscheiden.

PERRY et al. (1999) beschrieben erstmalig das „αβ-chromogenic-Medium (ABC)“. ABC-Medium enthält zwei chromogene Substrate. 3,4-Cyclohexenorsculetin-β-D-Galaktosid (CHE-Gal) dient zum Nachweis der α-Galaktosidase von Salmonellen. Typische Kolonien erscheinen auf ABC-Medium schwarz. 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-α-D-Galaktopyranosid (X-α-Gal) dient zum Nachweis der β-Galaktosidase coliformer Keime. Typische Kolonien erscheinen auf ABC-Medium grün.

GAILLOT et al. (1999) beschrieben erstmalig „CHROMagar *Salmonella* Medium (CAS)“ für die Untersuchung von Stuhlproben. Im Vergleich zu Hektoen Enteric-Agar weist CAS eine vergleichbare Sensitivität bei höherer Spezifität auf. Auf CAS-Medium erscheinen Salmonellen, einschließlich der H<sub>2</sub>S-negativen Stämme, hellviolett. Non-*Salmonellae* wachsen als blaue oder farblose Kolonien auf CAS.

MILLER und MALLINSON (2000) beschrieben erstmalig das gleichnamige Selektivnährmedium. „Miller-Mallinson-Agar (MM)“ wurde als Salmonellen-Spezialnährboden US-patentiert (MILLER und MALLINSON, 1999) und stellt eine Verbesserung der Rezeptur von XLT4-Nährboden dar. Mit MM gelingt der Nachweis sowohl von *S. Typhi* als auch von non-typhoiden Stämmen, weil die fein abgestimmte Rezeptur aus vier Zuckern und Proteinen besonders das Wachstum von Salmonellen begünstigt. Insbesondere Trehalose und Mannitol begünstigen ein initiales Wachstum aller *Salmonella* spp.. Laktose und Zellobiose sollen die H<sub>2</sub>S-Bildung von Non-*Salmonella*-Stämmen unterdrücken. Polypeptonpepton begünstigt insbesondere die erwünschte H<sub>2</sub>S-Bildung von Salmonellen. Als zusätzliches, pH-unabhängiges Nachweissystem für die Laktosespaltung wurde 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galaktopyranosid (X-Gal) eingesetzt. X-Gal ist ein chromogenes Substrat zum Nachweis der Permease-unabhängigen β-Galaktosidase coliformer Keime. MM wirkt desweiteren stark selektiv auf die enterische Begleitflora. MM-Medium ist sensitiver als

XLT4 ohne dessen hohe Spezifität einzubüßen, weil mit MM auch der Nachweis von atypischen Salmonellen wie den schwachen („weak“, engl.) und sehr schwachen („ultra-weak“, engl.) H<sub>2</sub>S-bildenden Stämmen gelingt. Im Bereich der US-amerikanischen Geflügelwirtschaft sind dies immerhin 15 % der Salmonellen-Isolate. Nach MALLINSON et al. (2000) erscheinen *E. coli* und coliforme Keime als deutlich blaugrüne Kolonien auf MM. Salmonellen zeichnen sich generell durch ein starkes Wachstum aus und erscheinen in Abhängigkeit ihres H<sub>2</sub>S-Bildungsvermögens als cremefarbene, silbermetallisch glänzende, graue oder schwarze Kolonien.

MINET et al. (2001) beschrieben erstmalig die „AES-Salmonellen-Agar-Platte (ASAP)“ als ein zeitsparendes chromogenes Selektivmedium. ASAP ermöglicht aufgrund der hohen Selektivität nur ein schwach ausgeprägtes Wachstum der Begleitflora und benötigt aufgrund der hohen Spezifität weniger Bestätigungsreaktionen zum Ausschluß falsch-präsumtiver Kolonien. Bei der Untersuchung von 485 Stuhlproben im Direktausstrich- und Anreicherungsverfahren konnten mit ASAP im Vergleich zu SM-ID und HE-Agar die meisten Salmonellen-positiven Proben nachgewiesen werden.

EIGNER et al. (2001) beschrieben erstmalig „BBL CHROMagar Salmonella (BCAS)“ als eine Modifikation des CAS-Mediums. BCAS weist gegenüber CAS eine verbesserte Selektivität auf und reduziert die Anzahl falsch-positiver Ergebnisse. BCAS enthält drei chromogene Substrate. Salmonellen erscheinen als hellviolette Kolonien mit violetter Hof. Non-*Salmonellae* erscheinen als blaugrüne Kolonien mit oder ohne violetten Hof. Bakterienkolonien, die keines der Substrate abbauen können, erscheinen transparent, weiß oder grau.

**Tabelle 2-10:** Identifizierung von Salmonellen und weiteren Enterobacteriaceae anhand von spezifischen chromogenen Substraten als Bestandteil verschiedener neuartiger Selektivnährmedien (modifiziert nach RUIZ et al., 1996a; PEREZ et al., 2003)

Jahr	Autor(en)	Akronym	Koloniefärbung (Enzym [Substrat])	Zielkeime
1990	RAMBACH	RA*	Blaugrün ( $\beta$ -Galactosidase [X-Gal])	Coliforme Keime
1991	POUPART et al.	SM ID**	Blau ( $\beta$ -Galactosidase [X-Gal]) Grün ( $\beta$ -Glucosidase [X-Glu])	Coliforme Keime Begleitflora
1996a	RUIZ et al.	SM ID 2	Hellviolett (Esterase [Patent]) Blau ( $\beta$ -Galactosidase [X-Gal]) ( $\beta$ -Glucosidase [X-Glu])	Salmonellen Begleitflora
1999	COOKE et al.	CSE	Burgunderrot (C <sub>8</sub> -Esterase [SLPA-Octanoat])	Salmonellen
1999	GAILLOT et al.	CAS	Hellviolett (Esterase [Patent]) Blau $\beta$ -Galactosidase [Patent])	Salmonellen Non- <i>Salmonellae</i>
1999	PERRY et al.	ABC	Schwarz ( $\beta$ -Galactosidase [CHE-Gal]) Grün ( $\alpha$ -Galactosidase [X- $\alpha$ -Gal])	Non- <i>Salmonellae</i> Salmonellen
2000	MILLER und MALLINSON	MM***	Blaugrün ( $\beta$ -Galactosidase [X-Gal])	Coliforme Keime

\* Kombiniertes Nährboden: detektiert zusätzlich Propylenglycol-Abbau

\*\* Kombiniertes Nährboden: detektiert zusätzlich Glucuronat-Abbau

\*\*\* Kombiniertes Nährboden: detektiert zusätzlich H<sub>2</sub>S-Bildungsvermögen

**Fortsetzung Tabelle 2-10:**

Identifizierung von Salmonellen und weiteren Enterobacteriaceae anhand von spezifischen chromogenen Substraten als Bestandteil verschiedener neuartiger Selektivnährmedien (modifiziert nach RUIZ et al., 1996a; PEREZ et al., 2003)

<b>Jahr</b>	<b>Autor(en)</b>	<b>Akronym</b>	<b>Koloniefärbung (Enzym [Substrat])</b>	<b>Zielkeime</b>
2001	EIGNER et al.	BCAS	Hellviolett mit Hof (Esterase [Patent])	Salmonellen
			Blau mit/ohne Hof ( $\beta$ -Galactosidase [Patent])	Non- <i>Salmonellae</i>
2001	LANG et al.	OSCM	Hellviolett (Esterase [Patent])	Salmonellen
			Blau $\beta$ -Galactosidase [Patent])	Non- <i>Salmonellae</i>
2001	MINET et al.	ASAP	Magentarot ( $C_8$ -Esterase [5-Bromo-6-Chloro-3-Indolyl-Caprylat])	Salmonellen
			Blau ( $\beta$ -Glucosidase [X- $\beta$ -D-Glucopyranosid])	<i>Klebsiella</i> spp., <i>Enterobacter</i> spp.
			Violett (beide Enzyme)	<i>Serratia</i> spp.
2001	ROURE et al.	COMPASS	Magentarot (Esterase [5-Bromo-6-Chloro-3-Indolyl-Caprylat])	Salmonellen
			Blau ( $\beta$ -Glucosidase [Glucopyranosid])	Non- <i>Salmonellae</i>

Das Versagen von chromogenen Nährmedien, aber auch die zu hohe Selektivität von Selektivanreicherungen, wird mehrfach in der Literatur beschrieben. Chromogene Nährmedien haben zwar im Allgemeinen eine höhere Spezifität, weisen jedoch gleichzeitig eine geringere Sensitivität auf (RAMBACH, 1990; DUSCH und ALTWEGG, 1993; RUIZ et al., 1996b; GAILLOT et al., 1999). Auch PEREZ et al. (2003) beschrieben, dass sich chromogene Nährmedien im Vergleich zu Hektoen Enteric-Agar in der klinischen Diagnostik als weniger sensitiv erwiesen haben.

In den Untersuchungen zum Nachweis von 170 non-typhoiden *Salmonella*-Stämmen von FREYDIERE und GILLE (1991) konnte gezeigt werden, dass sich mit Rambach-Agar die Serovare *S. Agona*, *S. Paratyphi A* und *S. Typhi* nicht nachweisen lassen. Der C<sub>8</sub>-Esterase-Spot-Test erwies sich hingegen als spezifisch für den Nachweis von *S. Typhi* und atypischen Salmonellen. Auch in den Untersuchungen von MANAFI und WILLINGER (1994) konnte gezeigt werden, dass mit Rambach-Agar nur 61 und mit SM ID 65 von 69 Prüfstämmen nachgewiesen werden konnten. Mit beiden chromogenen Nährmedien misslang der Nachweis von Stämmen der Subspezies IIIa und IIIb sowie mit Rambach-Agar der Nachweis von *S. Paratyphi*, *S. Typhi*, *S. Moscow* und *S. Wassenaar*.

RUIZ et al. (1996b) überprüften zehn herkömmliche und chromogene Selektivmedien sowie den MUCAP-Test anhand von 14 Laktose-fermentierenden *Salmonella*-Stämmen und 16 Stämmen von *Salmonella arizonae*. Einzig das herkömmliche Nährmedium Bismut- Sulfid-Agar detektierte 100 % der 30 zu überprüfenden atypischen *Salmonella*-Stämme. Das zweitbeste Resultat mit 27 detektierten Stämmen erzielte Novobiocin-Brillantgrün-Glucose-Agar. Demnach gelang es weder mit dem C<sub>8</sub>-Esterase-Test MUCAP noch mit den chromogenen Nährböden Rambach-Agar und SM ID atypische *Salmonella*-Stämme vollständig nachzuweisen.

PERRY et al. (1999) untersuchten 1.022 Salmonellen-Prüfstämme und 300 weitere gram-negative Non-*Salmonellae* sowie 283 Stuhlproben mit dem chromogenen ABC-Medium. Dabei konnte gezeigt werden, dass auf ABC-Medium die Stämme der Serovare *Salmonella arizonae*, *S. Branderup* und *S. Saintpaul* eine falsch-negative Reaktion zeigten.

COOKE et al. (1999) haben beschrieben, dass mit dem chromogenen CSE-Medium keine falsch-positiven Ergebnisse durch *Proteus* spp. und H<sub>2</sub>S-bildende *Citrobacter freundii*-

Stämme auftreten. Mit CSE-Medium gelang der Nachweis von *Salmonella diarizonae* und *S. Pullorum*. Als problematisch erwiesen sich hingegen Stämme von *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* und *S. Indiana*. In den Untersuchungen von COOKE et al. (1999) konnte ferner gezeigt werden, dass mit den chromogenen Nährmedien Rambach-Agar und SM ID Agar *Salmonella diarizonae* nicht nachgewiesen werden konnte. *S. Pullorum* führte zu falsch-negativen Reaktionen auf XLD, HE und Rambach-Agar. *S. Indiana* konnte von keinem der eingesetzten Nährmedien nachgewiesen werden. Ein einzelner Stamm von *S. Typhimurium* führte zu falsch-negativen Ergebnissen auf Rambach-Agar.

EIGNER et al. (2001) evaluierten den BBL CHROMagar *Salmonella* (BCAS) anhand von 176 Stämmen und 439 Stuhlproben und konnten zeigen, dass *Salmonella arizonae* und *Salmonella diarizonae* nicht als präsumtive Kolonien erscheinen und somit zu falsch-negativen Ergebnissen führen. *S. Gallinarum* zeigte nur ein schwaches bis kein vorhandenes Wachstum auf BCAS.

## 2.11 Polymerasekettenreaktion zum Nachweis von Salmonellen aus Lebensmitteln

RAHN et al. (1992) beschrieb erstmalig die Evaluierung des *invA*-Gens als Salmonellen-spezifischen Genombereich für die konventionelle Polymeraseketten-reaktion („Polymerase chain reaction (PCR)“, engl.). Anhand von 630 *Salmonella*-Stämmen mit 100 Serovaren, isoliert von Tier und Mensch, sowie anhand von 142 Non-*Salmonellae* aus 21 anderen Genera wurde die DNA-Sequenz gescreent. Das Amplifikat ist ein 284 Bp großes DNA-Fragment. Bei 99,4 % der überprüften *Salmonella*-Stämme konnte *invA* nachgewiesen werden. Desweiteren zeigte *invA* eine 100 %-ige Spezifität und ist somit von hohem diagnostischem Wert.

BÜLTE und JAKOB (1995) stellten eine Digoxigenin-markierte *invA*-Gensonde für ein Koloniehybridisierungsassay mit Nitrozellulose-Filter auf modifiziertem Rambach-Agar her. Anhand von 312 Positivkontrollstämmen und 268 Negativkontrollstämmen konnte eine 100 %-ige Sensitivität und Spezifität des Verfahrens demonstriert werden. In 11

artifiziiell kontaminierten Rindfleischproben gelang eine Quantifizierung des Teststamms mittels dieser *invA*-Gensonde. Bei der Untersuchung von 104 Lebensmittelproben tierischen Ursprungs wurden bereits nach 48 h mit dem *invA*-Gensonden-Assay 29 *Salmonella*-positiven Proben nachgewiesen. Mit dem kulturellen Referenzverfahren waren es nur 27 Proben.

RIJPENS et al. (1999) beschrieben ein zeitsparendes PCR-IMS-Verfahren zum Nachweis von hitzestressen Salmonellen in Milch- und Eiprodukten. Bereits nach 16-stündiger Voranreicherung in BPW gelang eine Aufkonzentrierung und Aufbereitung des Erregers mittels immunomagnetischer Separation (IMS) und Lysispuffer. Milchpulver- und Rohmilchkäseproben wurden zusätzlich in RVS für die Dauer von 4 Stunden verkürzt angereichert. Für die PCR wurde das von AABO et al. im Jahr 1993 entwickelte *invA*-spezifische Primerpaar ST 11 und ST 15 eingesetzt. Um eine Hemmung der PCR auszuschließen, wurde versucht, eine interne Amplifikationskontrolle für PCR-Untersuchungen in Voranreicherungsmedien zu entwickeln.

In ASUV § 64 LFGB L 00.00-52, Ausgabe Juli 2000, wurde die DIN-Methode 10135:1999 übernommen, welches ein Verfahren zum Nachweis von Salmonellen in Lebensmitteln mit der Polymerase-Kettenreaktion darstellt. Das *invA*-Gen wird als Salmonellen-spezifische DNA-Sequenz aufgeführt.

MALORNY et al. (2003a) leiteten als „Task-Manager“ den Salmonellen-Ringversuch des „Europäischen Food-PCR-Projekts“ zur Untersuchung der diagnostischen Genauigkeit der Salmonellen-spezifischen PCR. Die Nachweisgrenze bei der Untersuchung artifiziiell kontaminierter Proben lag bei weniger als fünf Kolonien-bildenden Einheiten pro 25 g bzw. 100 ml. Anhand von 435 nativ kontaminierten Proben konnte eine 97,5 %-ige Sensitivität und Spezifität ermittelt werden. ZIEMER und STEADHAM (2003) überprüften die Spezifität verschiedener *Salmonella*-spezifischer Primerpaare für die Untersuchung der intestinalen Flora in Fäzesproben. Als Zielsequenzen wurden unter anderem 16S rDNA, SOP 1-Virulenz-Gen, *stn*-Enterotoxin-Gen, *invA*-Gen und das Histidintransport-Operon überprüft. Nur drei Primerpaare erwiesen sich für die Untersuchung der intestinalen Flora in Fäzesproben als Salmonellen-spezifisch. Geeignete Primerpaare müssen immer unter Berücksichtigung der zu analysierenden Matrix sorgfältig ausgewählt und intern überprüft werden.

## 3 Eigene Untersuchungen

### 3.1 Ziel der Untersuchungen

Im ersten Teilversuch wurden 36 ausgewählte Prüfstämme auf drei herkömmlichen und drei chromogenen *Salmonella*-Selektivnährmedien fraktioniert ausgestrichen und bebrütet, um die Leistungsfähigkeit der einzelnen Selektivnährböden miteinander zu vergleichen. Die Koloniemorphologie der einzelnen Stämme wurde beurteilt und die Produktivität und die Selektivität der Nährböden berechnet.

Ziel des zweiten Teilversuchs war die Bestimmung der Reisolierungsraten von *Salmonella* Typhimurium aus Schweinehackfleisch nach unterschiedlichen kulturellen Anreicherungsmethoden im Modell. So wurden in jeweils 25 g Schweinehackfleisch (n = 92) unterschiedliche Konzentrationen des Laborstammes *Salmonella* Typhimurium 164/93 (BgVV) artifiziell eingemischt und gemäß der Referenzverfahren DIN EN 12824:1998 und parallel dazu gemäß prEN ISO 6579:2000 (nunmehr: DIN EN ISO 6579:2003) zweistufig angereichert. Drei chromogene Selektivnährmedien wurden hinsichtlich ihrer Eignung als Subkultivierungsmedium geprüft.

Im dritten Teilversuch wurden die zwei kulturellen Referenzverfahren anhand einer Untersuchung von 286 nativen Lebensmittelproben methodisch verglichen. Dabei wurde jeweils zusätzlich die aerobe mesophile Keimzahl bestimmt. Zusätzlich wurde zur vorläufigen Bestätigung ein kolorimetrischer Schnelltest angewendet. Das Serovar- und Resistenzspektrum der aus dem Ausgangsmaterial isolierten *Salmonella*-Stämme wurde durch das Nationale Referenzlabor Salmonellen (NRL-Salm), Standort: Bundesinstitut für Risikobertung (BfR) Berlin, Direktor und PROF. DR. REINER HELMUTH, erfasst.

## 3.2 Material

### 3.2.1 Bakterienkulturen

Für die Untersuchungen des ersten Teilversuchs wurden 27 Stämme der Gattung *Salmonella* sowie acht weitere Stämme aus der Familie der Enterobacteriaceae und zusätzlich ein *Pseudomonas aeruginosa*-Stamm einbezogen. Berücksichtigt wurden insbesondere lebensmittelhygienisch bedeutsame *Salmonella*-Serovaren. Sie sind unter Angabe ihrer Bezeichnung und Herkunft in der **Tabelle 3-1** gelistet.

Für die Untersuchungen im zweiten Teilversuch wurde im Modell der Laborstamm *Salmonella* Typhimurium 164/93 (BgVV) eingesetzt. Eine Gebrauchskultur des Teststamms wurde auf Plate-Count-Agarschrägröhrchen (PC, Fa. Merck, Darmstadt, Artikelnummer 1.05463) bei + 4 °C aufbewahrt und konnte so für die Dauer von sechs Wochen genutzt werden. Das PC-Medium wurde als Trockennährboden bezogen und gemäß Herstellerangaben zubereitet.

**Tabelle 3-1:** Herkunft ausgewählter Prüfstämme (n = 36)

<b>Lfd. Nr.</b>	<b>Serovar bzw. Spezies</b>	<b>Stammbezeichnung</b>
1	<i>Salmonella arizonae</i>	AES <sup>1</sup> 8.1.
2	<i>Salmonella Bovismorbificans</i>	IFTN <sup>2</sup> H 217
3	<i>Salmonella Derby</i>	BgVV <sup>3</sup> 1454/61
4	<i>Salmonella Dublin</i>	x-O 162/98 <sup>4</sup>
5	<i>Salmonella Dublin</i>	x-O 163/98 <sup>4</sup>
6	<i>Salmonella Enteritidis</i>	ATCC <sup>5</sup> 13076
7	<i>Salmonella Enteritidis</i>	BgVV 164/93
8	<i>Salmonella Enteritidis</i>	IFTN W 28/8
9	<i>Salmonella Give</i>	IFTN W 37/8
10	<i>Salmonella Goldcoast</i>	IFTN H 9
11	<i>Salmonella Hadar</i>	IFTN W 30/1
12	<i>Salmonella Infantis</i>	IFTN H 21
13	<i>Salmonella I-Rauhform</i>	IFTN H 59
14	<i>Salmonella Livingstone</i>	IFTN H 19
15	<i>Salmonella London</i>	IFTN H 74
16	<i>Salmonella Manhattan</i>	IFTN W 33/4
17	<i>Salmonella Newport</i>	IFTN W 30/11
18	<i>Salmonella Ohio</i>	IFTN H 103
19	<i>Salmonella Oranienburg</i>	ATCC 3592
20	<i>Salmonella Panama</i>	IFTN H 100
21	<i>Salmonella Paratyphi B</i>	IFTN W 30/11

**Fortsetzung Tabelle 3-1: Herkunft ausgewählter Prüfstämme (n = 36)**

<b>Lfd. Nr.</b>	<b>Serovar bzw. Spezies</b>	<b>Stammbezeichnung</b>
22	<i>Salmonella</i> Paratyphi B	IFTN W 35/11
23	<i>Salmonella</i> Senftenberg	DSM <sup>6</sup> 10062
24	<i>Salmonella</i> Thompson	IFTN SV 4/7
25	<i>Salmonella</i> Typhimurium O:5	IFTN H 273
26	<i>Salmonella</i> Typhimurium	BgVV 2260/93
27	<i>Salmonella</i> Virchow	BgVV 174
-----		
28	<i>Citrobacter freundii</i>	AES 1.2.
29	<i>Citrobacter freundii</i>	IFTN M 50b
30	<i>E. coli</i>	ATCC 25922
31	<i>Enterobacter aerogenes</i>	BgVV 1799/89
32	<i>Hafnia alvei</i>	NCTC <sup>7</sup> 8105
33	<i>Proteus mirabilis</i>	NCTC 11938
34	<i>Proteus morgani</i>	BgVV 696/84
35	<i>Shigella sonnei</i>	BgVV 7887/89
-----		
36	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 15442

- 1 AES Laboratoire, Combourg, France
- 2 BÜLTE, Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde (IFTN), JLU Gießen
- 3 Bundesgesundheitsministerium für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV), Berlin
- 4 BAUERFEIND, Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, JLU Gießen
- 5 American Type Culture Collection (ATCC), Virginia, USA
- 6 Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSM), Braunschweig
- 7 National Collection of Type Cultures (NCTC), London, UK

### 3.2.2 Probenmatrix

Für die Einmischversuche des zweiten Teilversuchs ( $n = 92$ ) wurde frisches Schweinehackfleisch verwendet. In **Tabelle 3-2** sind die einzelnen Anteile der verschiedenen Probenmatrizes aus 286 Untersuchungen nativ kontaminierter Lebensmittelproben aufgeschlüsselt. So wurden für den dritten Teilversuch insgesamt 286 Hackfleisch- ( $n = 206$ ) und Geflügelfleischproben ( $n = 80$ ) untersucht. Davon entfielen 132 Proben auf frisches Hackfleisch (Schwein  $n = 71$ , Rind und Schwein gemischt  $n = 61$ ) und 74 tiefgefrorene Proben auf Rinder- ( $n = 27$ ), Schweine- ( $n = 20$ ) und gemischtes Hackfleisch ( $n = 27$ ). Es wurden desweiteren 74 frische Geflügelfleischproben, einschließlich marinierten Geflügelfleischzubereitungen ( $n = 12$ ) und Innereien wie Hähnchenleber, -magen und -herzen ( $n = 7$ ), untersucht sowie sechs tiefgefrorene Proben Geflügelfleisch. Die Lebensmittelproben wurden als lose sowie fertig abgepackte Ware aus dem Filial- und Einzelhandel bezogen und in Mengen von circa 500 g gekauft, gekühlt transportiert und unmittelbar untersucht. Von den tiefgefrorenen Lebensmittelproben waren 58 Proben bereits als *Salmonella*-positiv bestätigt worden und wurden in Mengen von jeweils 200 g nachuntersucht, um die Nachweisraten der zu vergleichenden Methoden in den eigenen Untersuchungen zu erhöhen. Im dritten Teilversuch wurden sowohl Einzelansätze als auch Poolproben untersucht.

**Tabella 3-2:** Anteile verschiedener Probenmatrizes aus Untersuchungen nativer Lebensmittelproben (n = 286)

Lebensmittel	Untersuchungsmaterial	
	Tierarten	Anzahl (n)
Frisches Hackfleisch	Schwein	71
Frisches Hackfleisch	gemischt, aus Rind und Schwein	61
Tiefgefrorenes Hackfleisch	Rind	27 *
Tiefgefrorenes Hackfleisch	Schwein	20 **
Tiefgefrorenes Hackfleisch	gemischt, aus Rind und Schwein	27 **
-----		
Frischfleisch	Geflügel	55
Frischfleisch, tiefgefroren	Geflügel	6 **
Fleischzubereitungen	Geflügel	12
Innereien	Geflügel	7

\* Darin wurden 5 Nachuntersuchungen einbezogen

\*\* Es handelte sich ausschließlich um Nachuntersuchungen zuvor *Salmonella*-positiver Proben

### 3.2.3 Nährmedien

Für die eigenen Untersuchungen wurden die nachfolgend beschriebenen Anreicherungsmedien und Subkultivierungsmedien berücksichtigt (vgl. auch Abbildung 3-2, Tabelle 3-3, Tabelle 3-4).

#### 3.2.3.1 Anreicherungsmedien und Probenvorbereitung

Zur Anzüchtung der Prüf- und Teststämme wurde Hirn-Herz-Bouillon/ Brain-Heart-Infusion broth (BHI-Bouillon, Fa. Merck, Darmstadt, Nr. 1.10493) gemäß Herstellerangaben eingesetzt. Um für den Einmischversuch verschiedene Konzentrationsstufen einzustellen, wurde die Übernachtskultur des jeweiligen Teststamms in Verdünnungslösung mit Agarzusatz (Drop-Lösung) dekadisch verdünnt. Die Verdünnungslösung wurde gemäß § 64 LFGB, L 00.00-54, Ausgabe Juli 2000 (entspricht DIN EN ISO 6877-1:1999) zubereitet – d. h. mit 1,0 g/l Pepton aus Casein (Fa. Merck, Artikelnummer 1.07213; 8,5 g/l Natriumchlorid, Fa. Merck, Artikelnummer 1.06404) - und mit 0,75 g/l Agar-Agar Nr. 1 Neutral (Fa. Oxoid, Wesel, Artikelnummer L11) substituiert, um eine einfache Handhabung des Tropfplattenverfahrens zu gewährleisten (REUTER, 1970).

Zur Bestimmung der aeroben mesophilen Keimzahl in Lebensmitteln gemäß § 64 LFGB, L 06.00-19, Ausgabe Mai 1984 (entspricht DIN 10161) wurde ebenso Verdünnungslösung benötigt. Die Geflügelfleischproben wurden mit einer definierten Menge Verdünnungslösung gespült. Sowohl das artifiziell kontaminierte Schweinehackfleisch als auch die nativen Lebensmittelproben wurden in gepuffertem Peptonwasser (Buffered Peptone Water, BPW, Fa. Merck, Artikelnummer 107228) vorangereichert. Anschließend erfolgte eine parallele Selektivanreicherung in Selenit-Cystin-Medium (SC, Fa. Oxoid, Wesel, Selenit-Cystin-Lösung-Basis, Artikelnummer CM699 und Natrium-Biselenit, Artikelnummer L121), Rappaport-Vassiliadis-Bouillon mit Sojamehlpepton (RVS, Fa. Merck, Darmstadt, Artikelnummer 107700) und

Tetrathionatanreicherung nach Muller-Kauffmann mit Novobiocinzusatz (MKTTn, Fa. Biokontrol, Frankreich, Artikelnummer BK135HA und BS03308). Die Anreicherungsmedien wurden als Trockennährböden bezogen und gemäß Herstellerangaben zubereitet.

### **3.2.3.2 Subkultivierungsmedien**

Für die Untersuchungen wurden sechs *Salmonella*-Selektivnährmedien zur Subkultivierung eingesetzt, die in **Tabelle 3-3** und **Tabelle 3-4** unter Angabe des Akronyms, des Herstellers, der Artikelnummer und der Nährbodenbestandteile vergleichend aufgelistet sind (vgl. auch **Kapitel 2.10.4** und **Kapitel 2.10.5**).

Im ersten Teilversuch wurden die Stämme neben der üblichen Reinheitskontrolle und zur Bestimmung des „Absolute Growth Index (AGI)“, d. h. des Wachstumsverhaltens, zusätzlich auf Keimzählagar als Referenznährboden ausgestrichen.

**Tabelle 3-3:** Herkömmliche Subkultivierungsmedien zum Nachweis von Salmonellen

Bezeichnung	<u>Brillantgrün- Phenolrot- Laktose- Saccharose- Medium</u>	<u>Xylose-Lysin- Desoxycholat- Medium</u>	<u>Xylose-Lysin- Tergitol 4- Medium</u>
Akronym	<b>BPLS</b>	<b>XLD</b>	<b>XLT4</b>
Hersteller	Fa. Oxoid, UK Nr. CM 0329B	Fa. Sifin, Berlin Nr. TN 1196	Fa. Merck, Darmstadt, Nr. 1.13919
<b>Bestandteile g/l Aqua dest.</b>			
<b>a) Nährstoffe</b>			
Pepton aus Casein			
Pepton aus Fleisch	10,0		
Proteose Pepton Nr. 3			1,6
Fleischextrakt	5,0		
Hefeextrakt	3,0		3,0
Laktose	10,0	7,5	7,5
D(+)-Xylose		3,5	3,75
Saccharose	10,0	7,5	7,5
L(+)-Lysin		5,0	5,0
<b>b) Salze</b>			
Natriumchlorid		5,0	5,0
di- Natriumhydrogenphosphat	1,0		
Natriumhydrogenphosphat	0,6		
Ammoniumeisen(III)-Citrat		0,8	0,8
Natriumthiosulfat		6,8	6,8
<b>c) Indikatoren</b>			
Neutralrot			
Phenolrot	0,09	0,08	0,08
<b>d) Selektivstoffe</b>			
Natriumdesoxycholat		2,5	
Brillantgrün	0,0047		
Tergitol (Niaproof) 4			4,6
<b>Agar-Agar</b>	12,0	13,5	18,0
<b>End-pH bei 25 °C</b>	6,9 ± 0,2	7,4 ± 0,2	7,4 ± 0,2

**Tabelle 3-4:** Chromogene Subkultivierungsmedien zum Nachweis von Salmonellen

Bezeichnung	Miller-Mallinson-Medium	AES-Salmonellen-Agar-Platte	Oxoid <i>Salmonella</i> Chromogen-Medium
Akronym	MM	ASAP	OSCM
<b>Hersteller</b>	Nach MILLER und MALLINSON (2000), seit 2003 bei Becton Dickinson, USA	AES Laboratoire, France, Nr. AEB 520090	Fa. Oxoid, Wesel CM1007 und SR0194
<b>Bestandteile g/l A. dest.</b>			
<b>a) Nährstoffe</b>			
Pepton		10,0	
Spezialpepton			10,0
„Opaque agents“		10,0	
Polypeptonpepton	3,5		
Fleischextrakt	3,0		
$\alpha$ -Laktose	10,0		
D(+)-Zellobiose	5,0		
D(+)-Trehalose-Dihydrat	1,33		
D-Mannitol	1,2		
<b>b) Salze</b>			
Natriumchlorid	3,0		
Ammoniumeisen (III)-Citrat	0,8		
Natriumthiosulfat	6,8		
<b>c) Chromogene</b>			
5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galaktopyranosid (X-Gal)	0,1		
5-Bromo-6-Chloro-3-Indolyl-Caprylat (Mag-Caprylat)			
X- $\beta$ -D-Glucopyranosid			
<b>d) Selektivstoffe</b>			
Cefsoludin			12,0
Novobiocin			5,0
Tergitol (Niaproof) 4	4,6		
<b>e) Puffer</b>			
Trizma Lauge	0,7		
Trizma Hydrochlorid	2,3		
<b>Agar-Agar</b>	15,0	15,0	12,0
<b>End-pH bei 25 °C</b>	7,4 $\pm$ 0,2	7,2 $\pm$ 0,2	7,2 $\pm$ 0,2

\* „Chromogene Substanzen und Hemmstoffe“, keine genaueren Mengenangaben durch den Hersteller

\*\* „Chromogene Substanzen“, keine genaueren Mengenangaben durch den Hersteller

**Tabelle 3-5** stellt die Inkubationsbedingungen und das laut Herstellerangaben zu erfassende Keimpektrum von sechs *Salmonella*-Selektivnährmedien zusammenfassend dar.

**Tabelle 3-5:** Inkubationsbedingungen und Keimpektren verschiedener *Salmonella*-Subkultivierungsmedien

Bezeichnung	Akro- nym	Inkuba- tion	Keimpektrum
<u>Brillantgrün-Phenolrot-Laktose-Saccharose-Medium</u>	BPLS	37 °C, 24-48 h, aerob	<i>Salmonella</i> spp. außer <i>S. Typhi</i> , Laktose- und Saccharose-positive Keime, <i>Proteus</i> spp., <i>Pseudomonas</i> spp.
<u>Xylose-Lysin-Desoxycholat-Medium</u>	XLD	37 °C, 24-48 h, aerob	<i>Salmonella</i> spp., <i>Shigella</i> spp.
<u>Xylose-Lysin-Tergitol 4-Medium</u>	XLT4	37 °C, 24-48 h, aerob	<i>Salmonella</i> spp, <i>Citrobacter</i> spp., <i>Enterobacter</i> spp., <i>E. coli</i>
<u>Miller-Mallinson-Medium</u>	MM	37 °C, 24-48 h, aerob	<i>Salmonella</i> spp, <i>Citrobacter</i> spp., <i>Enterobacter</i> spp., <i>E. coli</i> , <i>Klebsiella</i> spp., <i>Proteus</i> spp., <i>Providencia</i> spp., <i>Morganella</i> spp., <i>Pseudomonas</i> spp.
<u>AES-Salmonellen-Agar-Platte</u>	ASAP	37 °C, 24-48 h, aerob	<i>Salmonella</i> spp, <i>Serratia</i> spp., <i>Klebsiella</i> spp., <i>Enterobacter</i> spp., <i>E. coli</i> , <i>Citrobacter</i> spp., <i>Proteus</i> spp.
<u>Oxoid <i>Salmonella</i> Chromogen-Medium</u>	OSCM	37 °C, 24-48 h, aerob	<i>Salmonella</i> spp., <i>E. coli</i> , <i>Enterobacter</i> spp., <i>Klebsiella</i> spp., <i>Citrobacter</i> spp., <i>Shigella</i> spp., <i>Proteus</i> spp., <i>Pseudomonas</i> spp.

### 3.2.4 Reagenzien

Im zweiten und dritten Teilversuch wurde zur vorläufigen, serologischen Bestätigung der präsumtiv verdächtig erscheinenden Kolonien omnivalentes *Salmonella*-Antiserum (Enteroclon *Anti-Salmonella* A-67, Fa. Sifin, Berlin) eingesetzt. Dabei handelt es sich um eine Mischung aus 48 monoklonalen Antikörpern, die gegen die gruppenspezifischen Salmonellen-O-Antigene bzw. das Vi-Antigen gerichtet sind. Die vorläufige, biochemische Identifizierung wurde mit kommerziell erhältlichen biochemischen Schnelltests für Enterobacteriaceae (Typ „api<sup>®</sup>20E“, Fa. bioMérieux, Frankreich) durchgeführt. Zusätzlich wurde eine molekularbiologische Bestätigung des *invA*-Gens mittels konventioneller Polymerasekettenreaktion (PCR) nach RAHN et al. (1992) gemäß § 64 LFGB, L 00.00-52, Ausgabe Juli 2000 (entspricht DIN 10135) durchgeführt.

#### 3.2.4.1 Kolorimetrischer Schnelltest

Desweiteren wurden im dritten Teilversuch präsumtive Kolonien mittels dem kolorimetrischen Schnelltest „Oxoid Biochemisches Identifizierungs-System (O.B.I.S.) *Salmonella* Test“ (Fa. Oxoid, Wesel) bestätigt. Der „O.B.I.S. *Salmonella* Test“ bestimmt die Pyroglutamyl-Aminopeptidase-(PYRase)-Aktivität und die Phenylalanin-Deaminase-(NPA)-Aktivität. Das Fehlen einer PYRase- und einer NPA-Aktivität bei Salmonellen (PYR-NPA-) ermöglicht die Differenzierung von den Gattungen *Citrobacter* spp. (PYR+), *Proteus* spp. (PYR-NPA+) und *Morganella* spp. (PYR-NPA+), die häufig als Hintergrundflora in Fleisch auftreten bzw. in der klinischen Enteritis-Diagnostik auf Selektivnährmedien eine *Salmonella*-präsumtive Koloniemorphologie aufweisen. Die zwei Reaktionsfelder der Testkarte sind mit einem PYRase- bzw. NPA-spezifischen Substrat beschichtet. Wird das PYRase-Substrat mikrobiell hydrolysiert bzw. das NPA-Substrat deaminiert, wird durch Zugabe spezieller Farbwirkstoffe der enzymatische Abbau sichtbar gemacht.

### 3.2.5 Laborgeräte und Verbrauchsmaterial

Für die mikrobiologische Untersuchungen wurden folgende Geräte, Glaswaren und Verbrauchsmaterialien genutzt:

- Dampfsterilisator, Typ „H+P 500EV“, Fa. Varioklav, Oberschleißheim
- Automatischer Nährmediensterilisator und Tischautoklav, Typ „Agarclav 5/10“, Fa. Integra Bioscience, Fernwald
- Abfüllgerät für Nährböden, Typ „Tecnomat 125“, Fa. Integra Bioscience, Fernwald
- Mikrowelle Typ „Dimension 4“, Fa. Panasonic, Hamburg
- Trocknungsschrank (+ 60 °C), Fa. Memmert, Schwabach, Seriennummer 967010
- Brutschrank (+ 37 °C), Typ „BE 800“, Fa. Memmert, Schwabach, Seriennummer e895.0107
- Brutschrank (+ 42 °C), Typ „T340“, Fa. Heraeus, Hanau
- Gefriertruhe (- 25 °C), Typ „Comfort“, Fa. Liebherr Deutschland
- Elektronische Präzisionswaage, Typ „BP 4100S“, Fa. Sartorius, Göttingen
- Beutelwalk-Mischgerät, Typ „Lab Blender 400“, Modell No BA 6021, Fa. Seward, Europa
- Bunsenbrenner, Typ „Gasi“, Fa. Schütt Labortechnik, Göttingen, Artikelnummer 3.340102
- Reagenzglasschüttler, Typ „Reax Top“, Fa. Heidolph, Kelheim
- Reagenzglasgestell, Fa. VWR International, Darmstadt, Artikelnummer 212.64
- Platinösen, Volumen 0,5 µl, Fa. VWR International, Darmstadt, Artikelnummer 631.712
- Impfhaken, Fa. VWR International, Darmstadt, Artikelnummer 631711
- Impfösenhalter, Fa. VWR International, Darmstadt, Artikelnummer 231.2572
- Pipettierball, Fa. VWR International, Darmstadt, Artikelnummer 6122006

- Messpipetten 1 ml und 10 ml, Fa. VWR International, Darmstadt, Artikelnummer 6121125 und 6121134
- Kulturröhrchen mit Kapsenbergkappe, Fa. VWR International, Darmstadt, Artikelnummer 391.018 und 391.091
- Weithals-Erlenmeyerkolben, Fa. VWR International, Darmstadt, Artikelnummer 391.0260
- Aluminiumfolie im Dispenser, Fa. VWR International, Darmstadt, Artikelnummer 293.4186
- Petrischalen, Fa. Nerbe plus, Winsen, Artikelnummer 09.0131.000
- Sterile Probenbeutel 400, Typ „P“ mit Filterstreifen, Fa. Meintrup DWS Laborgeräte, Löhden, Artikelnummer ME 001006

Für die molekularbiologischen Untersuchungen wurden folgende Geräte, Glaswaren und Verbrauchsmaterialien genutzt:

- Tischzentrifuge, Fa. Eppendorf, Modell 5415C
- Kochwasserbad, 100 °C
- UV-Kabinett 825-UCV/22, Fa. Plas-Labs
- Thermocycler „Perkin Elmer GeneAmp 9600“, Fa. Applied Biosystems, Darmstadt
- Gelelektrophoresekammer, Typ Blue Manne 100 und 200, Fa. Blueline
- Fotoanlage MP 4<sup>+</sup>; Fa. Polaroid
- Eisblock
- Vortexer, Typ MS1, Ika-Werke
- Reagenzgefäßständer
- Reagenzgefäße für PCR (100 µl, 200 µl)
- Pipetten, Typ Research<sup>®</sup>, Varipip<sup>®</sup>, Referenz der Fa. Eppendorf, 100-1000 µl
- Pipettenspitzen, Fa. Eppendorf, Volumina 10 µl, 200 µl und 1000 µl
- Einmalhandschuhe

### 3.3 Methoden

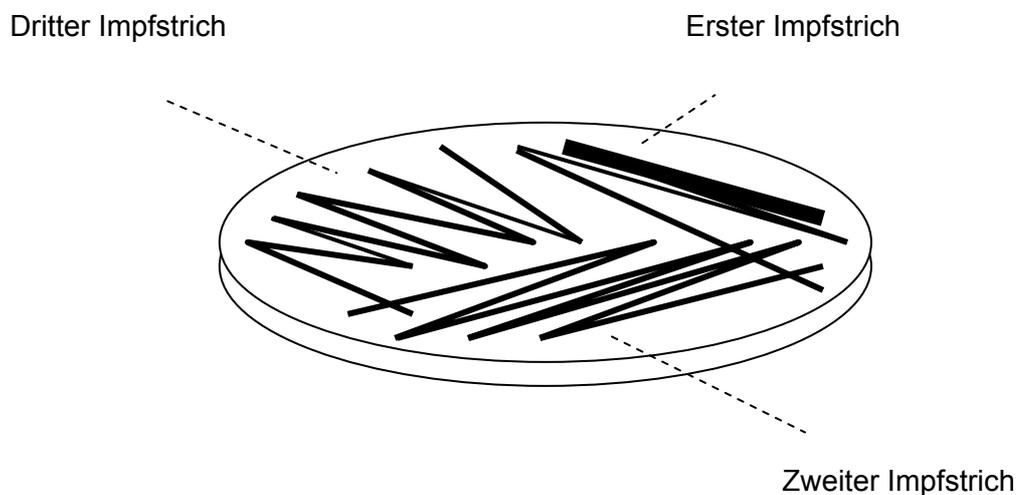
#### 3.3.1 Aufbewahrung und Anzuchtung von Prüfstämmen

Die Lagerung und Konservierung der Prüfstämme erfolgte in zwei Systemen. Einerseits wurde eine Kolonie in 1 ml BHI-Bouillon in einem Kryoröhrchen (Typ „Cryovial sterile Röhrchen, 2 ml, Nr. 309-2a“, Fa. VWR, Darmstadt) für 18 h angereichert und mit 200 µl Glycerin (Fa. Merck, Darmstadt), entsprechend einer 20 %-igen Lösung, versetzt. Dieses Gemisch wurde vorgekühlt und anschließend bei -25 °C tiefgefroren. Andererseits wurde Kolonien von Referenzmaterial in Kügelchen des Microbanksystems (Fa. MAST DIAGNOSTIKA, Reinfeld) eingerieben und bei -25 °C eingelagert. Vor Versuchsbeginn wurden die tiefgefrorenen Stämme bei 37 °C für 18 h in BHI-Bouillon resusziert und zur Reinheitskontrolle auf Plate-Count-Nährboden ausgestrichen. Zur mittelfristigen Lagerung von Arbeitskulturen wurden die resuszierten Bakterienstämme auf Plate-Count-Agarschrägröhrchen aufbewahrt.

#### 3.3.2 Teilversuch 1: Leistungsprüfung der *Salmonella*-Selektivnährmedien

Die Anzuchtung der Prüfstämme ( $n = 36$ ) erfolgte in Hirn-Herz-Bouillon bei 37 °C für  $18 \pm 2$  h unter aeroben Bedingungen. Anschließend wurden die Subkultivierungsmedien im Drei-Ösen-Verfahren entsprechend **Abbildung 3-1** beimpft. Um einen Verdünnungseffekt von Ausstrich zu Ausstrich auf der Agarplatte zu erzielen, wurde die Öse nach jedem Impfstrich ausgeglüht. Der Winkel zwischen Impfüse und Agaroberfläche betrug ungefähr 30 °. Anschließend erfolgte die Inkubation bei 37 °C für 24 h unter aeroben Bedingungen. Zur Beschreibung der kulturellen Merkmale einzelner Kolonien wurden die folgenden Kriterien nach BAUMGART (1997) herangezogen: Oberfläche, Form, Größe, Farbe, Pigmentbildung, Profil, Rand und ggf. Konsistenz. Kolonien unter 1 mm wurden als „Pinpoints (engl.)“ bezeichnet. Nach

WEENK (2003) wurde die Produktivität eines Selektivnährbodens ausgedrückt durch den „Absolute Growth Index (AGI)“ (absoluter Wachstumsindex, engl.) der Prüfstämme, angegeben als arithmetischen Mittelwert. Die Selektivität wurde als „Relative Growth Index (RGI)“ (relativer Wachstumsindex, engl.) der Prüfstämme ausgedrückt, indem der Quotient aus dem  $AGI_{\text{Testnährboden}} : AGI_{\text{Referenznährboden}}$  errechnet wurde. Das Wachstum der Prüfstämme wurde semiquantitativ beurteilt: ein geringes Wachstum von 1-4 Kolonien wurde mit „1“ bewertet, ein mäßiges Wachstum von 5-10 Kolonien mit „2“, ein gutes Wachstum auf dem 1. und 2. Impfstrich mit „3“ und ein sehr gutes Wachstum auf allen drei Impfstrichen mit „4“. Dieses Bewertungsschema entsprach der Methode nach MALLINSON et al. (2000) wie unter **Kapitel 3.3.4** beschrieben.



**Abbildung 3-1:** Schema zum Drei-Ösen-Verdünnungsausstrich mit dreimaligem Ausglühen der Impfpöse (nach BAUMGART, 1997)

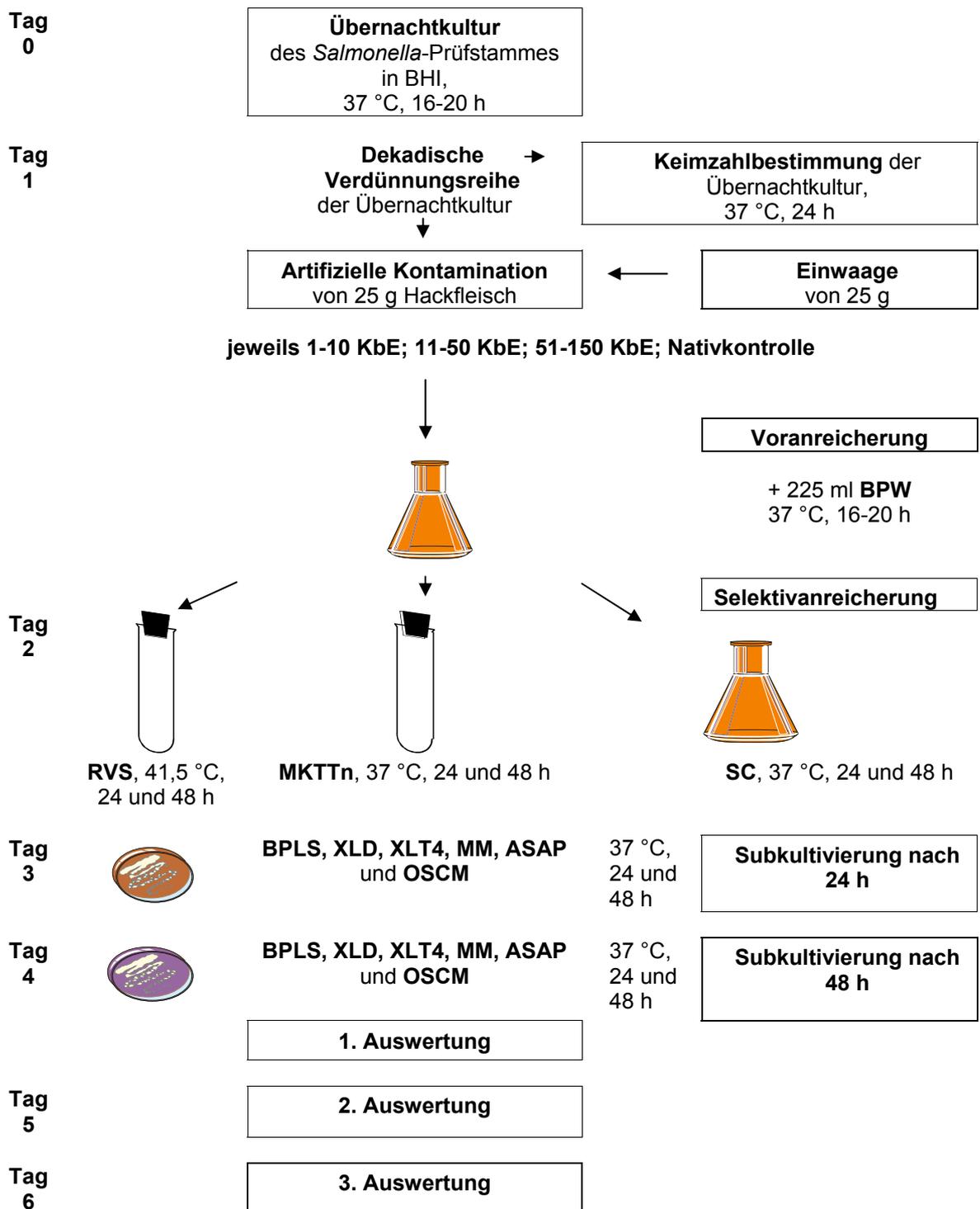
### 3.3.3 Kulturelle Referenzverfahren zum Nachweis von Salmonellen aus Lebensmitteln

#### 3.3.3.1 Teilversuch 2: Einmischversuche

Der schematische Versuchsaufbau ist der **Abbildung 3-2** zu entnehmen. Zur artifiziellen Kontamination wurden 25 g Schweinehackfleisch mit dem Teststamm *Salmonella* Typhimurium 164/93 (BgVV) in drei unterschiedlichen Konzentrationen, und zwar mit 1-10 Kolonie-bildenden Einheiten (KbE) pro 25 g, 11-50 KbE/25 g und 51-150 KbE/25 g beimpft. Hierzu wurde der *Salmonella*-Stamm in 10 ml BHI-Bouillon bei 37 °C für  $18 \pm 2$  h inkubiert. An dem darauf folgenden Tag wurde gemäß § 64 LFGB, L 00.00-54 eine dekadische Verdünnungsreihe der frisch angereicherten *Salmonella*-Übernachtskultur in Kulturröhrchen mit Drop-Lösung angelegt. Vor der Einwaage in einen sterilen Stomacherbeutel wurde das Hackfleisch unter aseptischen Kautelen sorgfältig durchmischt. Dann wurden die 25 g Hackfleisch mit einer errechneten Anzahl von Zellen aus der Übernachtskultur (ÜNK) beimpft, manuell, im Beutel befindlich durchgeknetet und anschließend in 225 ml gepuffertem Peptonwasser (BPW) in einem Beutelwalkmischgerät für zwei Minuten homogenisiert. In Anlehnung an § 64 LFGB, L 06.00-19 wurden jeweils 0,1 ml der dezimalen Verdünnungsstufen  $1:10^5$  („-5“) bis  $1:10^8$  („-8“) im Doppelansatz auf vorgetrocknete, in vier Sektoren unterteilte PC-Nährböden im Tropfplattenverfahren (Drop-Technik) ausgebracht. Nach einer 24-stündigen Inkubation bei 37 °C wurde die *Salmonella*-Keimzahl (KbE/ml) ermittelt. Die tatsächliche Einmischkonzentration an Salmonellen in 25 g Hackfleisch konnte anhand dieser Ergebnisse zurückgerechnet werden. Die Voranreicherung in 225 ml BPW wurde für 16-20 h bei 37 °C statisch inkubiert. Anschließend wurden jeweils 0,1 ml der Voranreicherung in 10 ml Rappaport-Vassiliadis-Sojamehlpepton-Bouillon (RVS) überimpft und für 18-24 h bei 41,5 °C inkubiert. 10 ml der Voranreicherung wurden in 100 ml Selenit-Cystin-Medium (SC) überimpft und für 18-24 h bei 37 °C inkubiert. Gemäß der neuen ISO/DIS 6579:2000 wurde parallel zum Referenzverfahren 1 ml der Voranreicherung in 10 ml Tetrathionat-Medium nach Muller-Kauffmann mit Novobiocin (MKTTn) überimpft und für 24 h bei 37 °C inkubiert. Nach 24 h erfolgte eine erstmalige Subkultivierung („24 h-Ausstrich“) aus den drei Selektivanreicherungen

auf jeweils sechs Nährböden, u. z. den Referenznährböden BPLS und XLD sowie auf XLT4 und den chromogenen Nährmedien MM, ASAP und OSCM. Nach weiteren 24 h Inkubation der Selektivanreicherungen erfolgte eine zweite Subkultivierung („48 h-Ausstrich“) auf diese Selektivmedien. Insgesamt wurden also ausgehend von einer vorangereicherten Probe 2 x 18 Selektivnährmedien beimpft. Somit wurden in eigenen Untersuchungen artifiziell kontaminierter Hackfleischproben (n = 92) 3.312 Einzeldaten generiert.

Die festen Selektivmedien wurden jeweils bei 37 °C für 24 h inkubiert, ausgewertet (sog. 1. Auswertung, d. h. Beurteilung des „24 h-Ausstrich“ nach 24 h Inkubation bzw. 2. Auswertung, d. h. Beurteilung des „48 h-Ausstrichs“ nach 24 h Inkubation) und bei negativem Ergebnis weitere 24 h bebrütet und ausgewertet (sog. 2. Auswertung, d. h. Beurteilung des „24 h-Ausstrichs“ nach 48 h Inkubation bzw. 3. Auswertung, d. h. Beurteilung des „48 h-Ausstrichs“ nach 48 h Inkubation). Das kulturelle Ergebnis galt als Salmonellen-positiv, wenn mindestens eine oder bis zu fünf präsumtive Kolonien auf mindestens einem Selektivnährboden zu beobachten waren. Präsumtive Kolonien wurden serologisch bestätigt. Das serologische Ergebnis galt als Salmonellen-positiv, wenn nach 1- bis 20-maligem Schwenken eine makroskopisch sichtbare Präzipitation eintrat und eine Autoagglutination ausgeschlossen werden konnte. Pro Versuchsansatz wurde jeweils zusätzlich ein rekultiviertes Isolat molekularbiologisch bestätigt. Das PCR-Ergebnis galt als Salmonellen-positiv, wenn die Bande des Zielgens mit einer Größe von 284 Bp nachgewiesen wurde. Der PCR-Lauf galt als auswertbar, wenn die Bande des Zielgens sowohl bei der Positiv- als auch der Aufbereitungskontrolle darstellbar war und der Leerwert keine Bande zeigte. Bei jedem Versuchsansatz wurde zusätzlich eine Nativkontrolle der Hackfleischprobe in die kulturellen Untersuchungen einbezogen, um zeitgleich eine natürliche *Salmonella*-Kontamination der Matrix auszuschließen.

**Abbildung 3-2:**

Versuchsaufbau zur Wiederfindung und kulturellen Anreicherung von *Salmonella* Typhimurium in artifiziiell kontaminierten Hackfleischproben

### 3.3.3.2 Teilversuch 3: Untersuchung nativer Proben

Der schematische Versuchsaufbau entspricht ebenso der **Abbildung 3-2** und erfüllte die methodischen Verfahrensschritte gemäß DIN EN ISO 6579:2003 bzw. ISO 6579:2002 bzw. ISO/DIS 6579:2000 sowie DIN EN 12824:1998. Die Untersuchungen begannen am „Tag 1“ mit der Einwaage von 25 g Hackfleisch unter sterilen Kautelen und Voranreicherung der Proben in gepuffertem Peptonwasser. Zusätzlich wurde zur Bestimmung der aeroben mesophilen Keimzahl (AKZ) von frischem Hackfleisch 10 g Probenmaterial zwecks Herstellung einer Erstverdünnung eingewogen. Die Geflügelfleischproben wurden in einem sterilen Probenahmebeutel mit jeweils 200 ml Verdünnungslösung gespült und 3 Minuten lang manuell geknetet (sog. „Carcass Rinsing“, engl.). Davon wurde ein Äquivalent von 10 ml für die Bestimmung der aeroben mesophilen Keimzahl (AKZ) und ein Äquivalent von 25 ml für die Salmonellenuntersuchung abgenommen. Die Bestimmung der aeroben mesophilen Keimzahl erfolgte gemäß § 64 LFGB, L 06.00-19, Ausgabe Mai 1984 (entspricht DIN 10161) und wurde im Tropfplattenverfahren angelegt.

So wie unter **Kapitel 3.3.3.1** bereits erläutert, wurden im dritten Teilversuch ebenso drei Selektivanreicherungen, d. h. SC, RVS und MKTTn, und sechs feste Selektivnährmedien, d. h. BPLS, XLD, XLT4, MM, ASAP und OSCM, für ein zweistufiges 24-stündiges bzw. 48-stündiges Anreicherungsverfahren eingesetzt. Insgesamt wurden also, ausgehend von einer vorangereicherten Probe, 2 x 18 Selektivnährmedien beimpft. Somit wurden in eigenen Untersuchungen nativ kontaminierter Hackfleisch- und Geflügelfleischproben (n = 286) 10.296 Einzeldaten generiert. Zur vorläufigen Bestätigung wurden die Reinkulturen jeweils serologisch, biochemisch und molekularbiologisch bestätigt. Das biochemische Ergebnis galt als Salmonellen-positiv, wenn anhand der abzulesenden Farbreaktionen der einzelnen Testkit-Becherchen („Tubes“, engl.) ein Salmonellen-typischer Zahlencode mit dem Auswerteschlüssel des Herstellers ermittelt werden konnte. Zusätzlich wurde der kolorimetrische Schnelltest „O.B.I.S. *Salmonella*“ überprüft. Dazu wurde das isolierte Koloniematerial mit der Öse auf die zwei Reaktionsfelder der Testkarte verrieben.

Durch Zugabe eines PYR- („Violettfärbung“) bzw. NPA-Farbentwicklers („Orange-Färbung“) wurde ein möglicher mikrobiell enzymatischer Abbau sichtbar gemacht. Sämtliche präsumtiven und vorläufig bestätigten Isolate wurden zur endgültigen Bestätigung gemäß § 64 LFGB, L 00.00-20a dem Nationalen Referenzlabor Salmonellen (NRL-Salm) im Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR), Berlin, zugesandt.

In sieben Versuchsansätzen wurden zur Erhöhung der *Salmonella*-Nachweiswahrscheinlichkeit Sammelproben aus verschiedenen Hackfleischteilproben angelegt und untersucht. Dazu wurden in zwei Versuchsansätzen 50 Einzelproben, die in fünf Filialen gekauft wurden, in zehn Sammelproben (Einwaage 5 x 5 g) zusammengefasst. In einem dritten Versuchsansatz wurden aus zehn Einzelproben, die in fünf Filialen gekauft wurden, je fünf Teilmengen gewonnen und in zehn Sammelproben (Einwaage 5 x 5 g) zusammengefasst. In vier weiteren Versuchsansätzen wurden 30 Einzelproben, die in drei Filialen gekauft wurden, in zehn Sammelproben (Einwaage 3 x circa 8,35 g) zusammengefasst.

### 3.3.4 Statistische Methoden

Die Ergebnisse aus den eigenen Untersuchungen nativer Lebensmittelproben (Teilversuch drei) wurden anhand eines verteilungsunabhängigen Tests als nichtparametrische Hypothese überprüft. Die Datenauswertung erfolgte unter Verwendung des Statistikprogramm Pakets BiAs 7.07 (ACKERMANN, 1998) auf den Rechnern im lokalen Rechnernetzwerk der Arbeitsgruppe „Biomathematik und Datenverarbeitung“ des Fachbereiches Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen unter der Leitung von Dr. Klaus Failing. Um eine verbundene Stichprobe zweimal auf ein bestimmtes alternatives Merkmal untersuchen zu können, wurde eine Vierfeldertafel aufgestellt. Das Häufigkeitsverhältnis, welches aus der Intensität der Merkmalsänderungen entsteht, wurde hinsichtlich der Signifikanz mit dem McNEMAR-Vorzeichentest (MCNEMAR, 1947) überprüft („Test auf Unterschiede“). Für den methodischen Vergleich des alten und neuen Referenzverfahrens wurde ein „Statistischer Nachweis auf Unterlegenheit“ durchgeführt.

Hierbei lautete die Nullhypothese:

$$H_0: P_B \geq P_A \quad P_B = \text{Nachweisrate der neuen Methode}$$

$$P_A = \text{Nachweisrate der alten Methode}$$

d. h. die neue Methode ist nicht schlechter als die alte Methode.

Als Alternativhypothese wurde die Aussage formuliert:

$$H_1: P_B < P_A \quad P_B = \text{Nachweisrate der neuen Methode}$$

$$P_A = \text{Nachweisrate der alten Methode}$$

d. h. die neue Methode ist zu erwarten schlechter als die alte Methode.

Demnach kann die Nullhypothese abgelehnt werden, wenn in der Vierfeldertafel die sog. „Zahl der Wechsler“, d. h. die Anzahl der Falsch-Negativen signifikant größer als die Anzahl der Falsch-Positiven ist. Bei einem Konfidenzbereich mit  $P = 95\% = 0,95$  und einer Irrtumswahrscheinlichkeit  $\alpha = 5\% = 0,05$ , wurde  $p < 0,05$  als signifikant und  $p > 0,05$  als nicht signifikant angesehen.

Um das Leistungsvermögen der verschiedenen *Salmonella*-Nährmedien im dritten Teilversuch unabhängig voneinander bewerten zu können, wurden die Sensitivität, die Spezifität und die Produktivität ermittelt. Die Berechnung der Sensitivität und Spezifität wurde aus einer Datenmatrix abgeleitet, die zunächst als unabhängige Stichprobe betrachtet wurde. Dabei haben alle Proben die gleiche Wahrscheinlichkeit und werden einmal untersucht. Eine Probe galt statistisch gesehen als diagnostisch *Salmonella*-positiv, wenn eines der sechs eingesetzten Nährmedien einen endgültig bestätigten Salmonellennachweis erbrachte. Als falsch-positives Resultat wurde das Wachstum von *Salmonella*-präsumtiven Kolonien gezählt, die serologisch ausgeschlossen werden konnten.

Die Berechnung der Sensitivität erfolgte nach der Formel:

$$\text{Sensitivität (\%)} = \frac{\text{Anzahl tatsächlich positiver Proben} \times 100}{\text{Anzahl tatsächlich positiver Proben} + \text{Anzahl falsch-negativer Proben}}$$

Die Berechnung der Spezifität erfolgte nach der Formel:

$$\text{Spezifität (\%)} = \frac{\text{Anzahl tatsächlich negativer Proben} \times 100}{\text{Anzahl tatsächlich negativer Proben} + \text{Anzahl falsch-positiver Proben}}$$

Die Berechnung der Produktivität erfolgte nach einer praxisnahen Methode in Anlehnung an MALLINSON et al. (2000). Aus einzeln beobachteten Daten wurde die Produktivität in Form des arithmetischen Mittelwerts unter Berücksichtigung der Standardabweichung angegeben. So wurde das Bakterienwachstum von subkultivierten nativen Lebensmittelproben auf jeder einzelnen Petrischale subjektiv beobachtet und semiquantitativ bewertet. Mit „1“ wurde ein geringes Wachstum von 1-4 Kolonien bewertet. Mit „2“ wurde ein mäßiges Wachstum von 5-10 Kolonien bewertet. Mit „3“ wurde ein gutes Wachstum auf dem 1. und 2. Impfstrich bewertet. Mit „4“ wurde ein sehr gutes Wachstum auf allen drei Impfstriichen ohne das Auftreten von Begleitflora bewertet.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Teilversuch 1: Produktivität und Selektivität

Die Ergebnisse aus dem ersten Teilversuch sind in **Tabelle 4-1** und **Tabelle 4-2** dargestellt. Die Produktivität (WEENK, 2003) oder der absolute Wachstumsindex (AGI) von 27 *Salmonella*-Prüfstämmen auf sechs ausgewählten festen Selektivnährmedien lag im Durchschnitt bei einem „mäßigen bis gutem Wachstum“ (MALLINSON et al., 2000, vgl. **Kapitel 3.3.4**). So erreichte BPLS im Mittel einen AGI-Wert von 2,7, XLD einen AGI-Wert von 2,6, XLT4 einen AGI-Wert von 2,5, MM einen AGI-Wert von 2,4, ASAP einen AGI-Wert von 2,5 und OSCM einen AGI-Wert von 2,4.

Nach WEENK (2003) liegt der relative Wachstumsindex (RGI) für unerwünschte Keime bei 0 und für erwünschte Keime bei 0,7 auf Selektivnährmedien. So erwies sich die Selektivität der sechs ausgewählten festen Selektivnährmedien als sehr gering. Für neun ausgewählte Non-*Salmonella*-Prüfstämme wurde auf BPLS im Mittel ein RGI-Wert von 0,8 erzielt, auf XLD ein RGI-Wert von 1,0, auf XLT4 ein RGI-Wert von 0,4, auf MM ein RGI-Wert von 0,7, auf ASAP ein RGI-Wert von 0,6 und auf OSCM ein RGI-Wert von 0,7.

**Tabelle 4-1:** Produktivität [AGI] von *Salmonella*-Prüfstämmen (n = 27) auf sechs *Salmonella*-Selektivnährmedien

<b>Selektivnährboden</b>	<b>Absoluter Wachstumsindex*(<math>\bar{x}[s]</math>)</b>
BPLS	2,7 (0,49)
XLD	2,6 (0,49)
XLT4	2,5 (0,43)
MM	2,4 (0,24)
ASAP	2,5 (0,43)
OSCM	2,4 (0,24)

\* nach MALLINSON et al. (2000) und WEENK (2003)

**Tabelle 4-2:** Selektivität [RGI] von neun ausgewählten Non-*Salmonella*-Prüfstämmen auf sechs *Salmonella*-Selektivnährmedien

Selektivnährboden	Relativer Wachstumsindex*
BPLS	0,8
XLD	1,0
XLT4	0,4
MM	0,7
ASAP	0,6
OSCM	0,7

\* nach WEENK (2003):  $RGI = \frac{\text{AGI Testnährmedium}}{\text{AGI Referenznährmedium}}$

## 4.2 Teilversuch 1: Koloniemorphologische Charakterisierung

### 4.2.1 Typisch erscheinende *Salmonella*-Stämme

In **Tabelle 4-3** sind die kulturellen Merkmale im Sinne biochemisch typischer *Salmonella* spp. auf unterschiedlichen Selektivmedien tabellarisch zusammengefasst. Als typische Salmonellen erwiesen sich die unter **Tabelle 3-1** genannten Prüfstämme mit Ausnahme von *S. Derby* 1454/61, *S. Dublin* x-O162/98, *Salmonella arizonae* AES 8.1. und *S. Senftenberg* DSM 10062. 25 Stämme der Gattung *Salmonella enterica* ssp. *enterica* konnten biochemisch als H<sub>2</sub>S-positiv bestätigt werden. Der Senftenberg-Stamm DSM 10062 zeigte sich als sehr schwach-H<sub>2</sub>S-positiv („ultra weak producer“, engl.), d. h. H<sub>2</sub>S-negativ auf Dreizuckereisenagar oder Lysin-Eisen-Agar, aber H<sub>2</sub>S-positiv auf Gelatine-Cystein-Thiosulfat-Eisenammoniumcitrat-Agar (nach VÉRON und GASSER, 1963; MALLINSON et al., 2000 und MALLINSON und MILLER, 2003). Der Vertreter der Subspezies *arizonae* konnte als Laktose-negativ, β-Galaktosidase-positiv und H<sub>2</sub>S-positiv bestätigt werden. Bei einigen Stämmen (n = 6) war ferner ein Wachstum von rauen Kolonien, d. h. von Kolonien in der so genannten R-Form („rough“, engl.) zu beobachten.

**Tabelle 4-3:** Koloniemorphologie typischer *Salmonella* spp. auf Selektivmedien

Nährmedien	Koloniemorphologie
<b>BPLS</b>	2-3 mm große, runde, erhabene, glatte, glänzende, transparente Kolonien vor leuchtendrotem Hintergrund
<b>XLD</b>	3-4 mm große, runde, erhabene, glatte, glänzende, schwarze Kolonien mit farblosem Randsaum und hellrotem Hof
<b>XLT4</b>	Stecknadelkopfgroße, runde, erhabene, glatte, glänzende, schwarze Kolonien mit farblosem Randsaum und gelbrotem Hof
<b>MM</b>	Stecknadelkopfgroße, runde, erhabene, glatte, glänzende, schwarze Kolonien
<b>ASAP</b>	2 mm große, runde, erhabene, glatte, glänzende, rosafarbene Kolonien
<b>OSCM</b>	2 mm große, runde, erhabene, glatte, glänzende, purpurfarbene Kolonien

#### 4.2.2 Atypisch erscheinende *Salmonella*-Stämme

##### S. Derby

Der im Versuch geprüfte *Salmonella* Derby-Stamm BgVV 1454/61 erwies sich als H<sub>2</sub>S-positiv, Laktose-negativ, C8-Esterase-positiv und negativ für die Salmonellen-spezifische Hydrolase. Somit gelang der Nachweis präsumtiv charakteristischer Kolonien mit dem BPLS-, XLD-, XLT4-, MM- und ASAP-Medium. Mit dem Nährboden OSCM gelang hingegen kein präsumtiver Nachweis von *S. Derby*. In **Tabelle 4-4** wird das charakteristische Aussehen von *S. Derby* BgVV 1454/61 dargestellt.

**Tabelle 4-4:** Koloniemorphologie eines *S. Derby*-Stammes (BgVV 1454/61) auf Selektivmedien

Nährmedien	Koloniemorphologie
<b>BPLS</b>	2-3 mm große, runde, erhabene, glatte, glänzende, transparente Kolonien vor leuchtendrotem Hintergrund
<b>XLD</b>	3-4 mm große, runde, erhabene, glatte, glänzende, schwarze Kolonien mit farblosem Randsaum und hellrotem Hof
<b>XLT4</b>	2 mm große, runde, erhabene, glatte, glänzende, schwarze Kolonien mit farblosem Randsaum und gelbrotem Hof
<b>MM</b>	Stecknadelkopfgröße, runde, erhabene, glatte, glänzende, schwarze Kolonien
<b>ASAP</b>	2 mm große, runde, erhabene, glatte, glänzende, rosafarbene Kolonien
<b>OSCM</b>	Blassviolette Pinpoints

**S. Dublin**

Der im Versuch geprüfte *Salmonella* Dublin-Stamm x-O162/98 erwies sich als H<sub>2</sub>S-positiv und Laktose-negativ. Die Salmonellen-spezifische Hydrolase sowie die C8-Esterase konnten nicht nachgewiesen werden. Nach GRAY et al. (2003) exprimieren solche Stämme innerhalb der ersten 24 h der Kultivierung das Enzym C8-Esterase in zu geringen Konzentrationen. So gelang der präsumtive Nachweis charakteristischer Kolonien mit dem BPLS-, XLD-, XLT4- und MM-Medium, hingegen nicht mit den Nährböden ASAP und OSCM. In **Tabelle 4-5** wird das charakteristische Aussehen von *S. Dublin* x-O162/98 dargestellt.

**Tabelle 4-5:** Koloniemorphologie eines *S. Dublin*-Stammes (x-O162/98) auf Selektivmedien

Nährmedien	Koloniemorphologie
<b>BPLS</b>	2-3 mm große, runde, erhabene, glatte, glänzende, transparente Kolonien vor leuchtendrotem Hintergrund
<b>XLD</b>	3-4 mm große, runde, erhabene, glatte, glänzende, schwarze Kolonien mit farblosem Randsaum und hellrotem Hof
<b>XLT4</b>	2 mm große, runde, erhabene, glatte, glänzende, schwarze Kolonien mit farblosem Randsaum und gelbrotem Hof
<b>MM</b>	Stecknadelkopfgröße, runde, erhabene, glatte, glänzende, schwarze Kolonien
<b>ASAP</b>	2 mm große, runde, erhabene, glatte, glänzende, weiße Kolonien
<b>OSCM</b>	1-2 mm große, runde, erhabene, glatte, glänzende, blassviolette Kolonien

### *Salmonella arizonae*

Der im Versuch geprüfte *Salmonella arizonae*-Stamm AES 8.1. erwies sich als H<sub>2</sub>S-positiv, β-Galaktosidase-positiv und Laktose-negativ. So gelang der präsumtive Nachweis charakteristischer Kolonien mit dem BPLS-, XLD-, MM- und ASAP-Medium. Mit XLT4 gelang kein präsumtiver Nachweis. Der gleichzeitige Nachweis der β-Galaktosidase und der Salmonellen-spezifischen Hydrolase auf dem OSCM-Medium führte zu einer Überlagerung des purpurfarbenen Chromogens mit dem blauen Chromogen. Somit gelang kein eindeutig präsumtiver Nachweis von *Salmonella arizonae* mit dem OSCM-Medium. In **Tabelle 4-6** wird das charakteristische Aussehen von *Salmonella arizonae* AES 8.1 dargestellt.

**Tabelle 4-6:** Koloniemorphologie eines *Salmonella arizona*-Stammes (AES 8.1.) auf Selektivmedien

Nährmedien	Koloniemorphologie
<b>BPLS</b>	2-3 mm große, runde, erhabene, glatte, glänzende, transparente Kolonien vor leuchtendrotem Hintergrund
<b>XLD</b>	3-4 mm große, runde, erhabene, glatte, glänzende Kolonien mit stecknadelspitzgroßem, schwarzen Zentrum, farblosem Randsaum und hellrotem Hof
<b>XLT4</b>	3-4 mm große, runde, erhabene, glatte, glänzende, transparente Kolonien vor gelbem Hintergrund
<b>MM</b>	Stecknadelkopfgröße, runde, erhabene, glatte, glänzende, schwarze Kolonien mit blauem Randsaum
<b>ASAP</b>	2 mm große, runde, erhabene, glatte, glänzende, rosafarbene Kolonien
<b>OSCM</b>	2 mm große, runde, erhabene, glatte, glänzende, blaue Kolonien

**S. Senftenberg**

Der im Versuch geprüfte *Salmonella* Senftenberg-Stamm DSM 10062 erwies sich als schwach H<sub>2</sub>S-positiv, Laktose-negativ, C8-Esterase-positiv und positiv für die Salmonellen-spezifische Hydrolase. So gelang der präsumtive Nachweis charakteristischer Kolonien mit dem BPLS-, MM-, ASAP- und OSCM-Medium. Mit XLD und XLT4 misslang ein präsumtiver Nachweis (**Tabelle 4-7**). Mit der außerordentlichen Hilfe des Autors Dr. Edward T. Mallinson, Professor emeritus am „The Avrum Gudelsky Veterinary Center“ der Universität Maryland, USA, wurden zusätzliche Untersuchungen anhand von weiteren *Salmonella*-Prüfstämmen und nativ kontaminierten Hackfleischproben durchgeführt. So konnte gezeigt werden, dass der

von uns hergestellte MM-Nährboden der Qualität des kommerziellen Fertignährbodens, der zum Zeitpunkt der Untersuchungen nur im US-amerikanischen Raum vertrieben wurde, entsprach. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass auf Basis von organischen Schwefelverbindungen, wie z. B. Cystein, das Serovar Senftenberg (DSM 10062) die Fähigkeit besitzt, Schwefelwasserstoff zu bilden. Auf dem MM-Medium stellen sich morphologisch große, gelbliche Kolonien mit eingesunkenem Zentrum dar, die nach 24 bis 48 h einen silbermetallischen Glanz („silver metallic sheen (sms)“, engl.) entwickeln (**Tabelle 4-7**).

**Tabelle 4-7:** Koloniemorphologie eines *S. Senftenberg*-Stammes (DSM 10062) auf Selektivmedien

<b>Nährmedien</b>	<b>Koloniemorphologie</b>
<b>BPLS</b>	2-3 mm große, runde, erhabene, glatte, glänzende, transparente Kolonien vor leuchtendrotem Hintergrund
<b>XLD</b>	3-4 mm große, runde, erhabene, glatte, glänzende, gelbe Kolonien mit hellrotem Hof
<b>XLT4</b>	3-4 mm große, runde, erhabene, glatte, glänzende, gelbe Kolonien mit hellrotem Hof
<b>MM</b>	4 mm große, runde, erhabene, im Zentrum eingesunkene, glatte, glänzende, gelbliche Kolonien mit silbermetallischem Glanz
<b>ASAP</b>	2 mm große, runde, erhabene, glatte, glänzende, rosafarbene Kolonien
<b>OSCM</b>	2 mm große, runde, erhabene, glatte, glänzende, purpurfarbene Kolonien

### 4.2.3 Non-Salmonella-Prüfstämme

Die Koloniemorphologie der im Versuch eingesetzten *Citrobacter*-Stämme (n = 2) erschien auf BPLS-Nährmedium *Salmonella*-präsumtiv. Das Wachstum von *Pseudomonas aeruginosa* erschien ebenso auf dem BPLS-Medium als präsumtiv *Salmonella*-verdächtig (**Tabelle 4-8**). Auch auf XLD-Nährmedium erschien *Citrobacter freundii* als *Salmonella*-präsumtiv verdächtig. XLD unterdrückte das Schwärmen von *Proteus mirabilis* nicht (**Tabelle 4-9**). Auch auf XLT4-Nährmedium erschien *Citrobacter freundii* präsumtiv *Salmonella*-verdächtig. Mit XLT4 konnte jedoch eine vollständige Hemmung von *Hafnia alvei* und *Proteus mirabilis* erzielt werden (**Tabelle 4-10**). *Citrobacter* spp. liessen sich auf dem MM-Medium zusätzlich durch ihre Konsistenz von *Salmonella* spp. differenzieren. Nach MALLINSON et al. (2000) weisen *Citrobacter* spp. bereits nach 18-stündiger Inkubation häufig eine fadenziehende („stringy“, engl.) Konsistenz auf, gegenüber der charakteristisch weichen („buttery“, engl.) Konsistenz von *Salmonella* spp.. Der Grund dafür sind das raschere Wachstum und somit das schnellere Absterben von *Citrobacter* spp. auf MM-Nährboden (**Tabelle 4-11**). Mit dem ASAP-Medium gelang die vollständige Hemmung von *Proteus mirabilis* und *Pseudomonas aeruginosa* (**Tabelle 4-12**). Mit dem OSCM-Medium gelang die vollständige Hemmung von *Proteus mirabilis* (**Tabelle 4-13**).

**Tabelle 4-8:** Koloniemorphologie von Non-*Salmonella*-Prüfstämmen auf BPLS

Stamm	Koloniemorphologie auf BPLS
<b><i>Citrobacter freundii</i></b> (n=2)	2-3 mm große, runde, erhabene, glatte, glänzende, transparente Kolonien vor leuchtend rotem Hintergrund
<b><i>E. coli</i></b>	Transparente Pinpoints vor gelbgrünem Hintergrund
<b><i>Enterobacter aerogenes</i></b>	3 mm große, runde, erhabene, glatte, glänzende, schleimig-gelbe Kolonien auf gelbem Nährboden
<b><i>Hafnia alvei</i></b>	Transparente Pinpoints auf braunem Nährboden
<b><i>Proteus mirabilis</i></b>	Transparente Pinpoints auf gelbrotem Nährboden
<b><i>Proteus morganii</i></b>	Transparente Pinpoints auf gelbrotem Nährboden
<b><i>Shigella sonnei</i></b>	Transparente Pinpoints auf rotbraunem Nährboden
<b><i>Pseudomonas aeruginosa</i></b>	2-3 mm, große, runde, erhabene, glatte, glänzende, transparente Kolonien vor leuchtend rotem Hintergrund

**Tabelle 4-9:** Koloniemorphologie von Non-*Salmonella*-Prüfstämmen auf XLD

<b>Stamm</b>	<b>Koloniemorphologie auf XLD</b>
<b><i>Citrobacter freundii</i></b> (n=2)	2 mm große, runde, erhabene, glatte, glänzende, schwarze Kolonien
<b><i>E. coli</i></b>	2-4 mm große, runde, gelbe Kolonien vor gelbem Hintergrund
<b><i>Enterobacter aerogenes</i></b>	3 mm große, runde, opake Kolonien mit transparentem Randsaum und gelbem Hof
<b><i>Hafnia alvei</i></b>	3 mm große, erhabene, glänzende, gelbe Kolonien mit gelbem Hof
<b><i>Proteus mirabilis</i></b>	Überschwärmt
<b><i>Proteus morganii</i></b>	3 mm große, runde, erhabene, glatte, glänzende, transparente Kolonien
<b><i>Shigella sonnei</i></b>	2-3mm große, runde, transparente Kolonien vor rotem Hintergrund
<b><i>Pseudomonas aeruginosa</i></b>	2 mm große, runde, erhabene, glatte, glänzende Kolonien vor rotem Hintergrund

**Tabelle 4-10:** Koloniemorphologie von Non-*Salmonella*-Prüfstämmen auf XLT4

Stamm	Koloniemorphologie auf XLT4
<i>Citrobacter freundii</i> (n=2)	2 mm große, runde bis unregelmäßig begrenzte erhabene, glatte, glänzende, schwarze Kolonien
<i>E. coli</i>	3 mm große, unregelmäßige, gelbe Kolonien vor gelbem Hintergrund
<i>Enterobacter aerogenes</i>	3 mm große, runde, opake Kolonien mit transparentem Randsaum und gelbem Hof
<i>Hafnia alvei</i>	Gehemmt
<i>Proteus mirabilis</i>	Gehemmt
<i>Proteus morganii</i>	Transparente Pinpoints
<i>Shigella sonnei</i>	Transparente Pinpoints
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2 mm große, runde, erhabene, glatte, glänzende Kolonien vor rotem Hintergrund

**Tabelle 4-11:** Koloniemorphologie von Non-*Salmonella*-Prüfstämmen auf MM

<b>Stamm</b>	<b>Koloniemorphologie auf MM</b>
<b><i>Citrobacter freundii</i></b> (n=2)	4-6 mm große, unregelmäßige, flache, raue, schwarze Kolonien
<b><i>E. coli</i></b>	1-2 mm große, runde, blaue Kolonien
<b><i>Enterobacter aerogenes</i></b>	3 mm große, runde, erhabene, raue, blaue Kolonien
<b><i>Hafnia alvei</i></b>	1 mm große, runde, erhabene, glatte, glänzende, weiße Kolonien
<b><i>Proteus mirabilis</i></b>	Gehemmt
<b><i>Proteus morganii</i></b>	Transparente Pinpoints
<b><i>Shigella sonnei</i></b>	Blaue Pinpoints
<b><i>Pseudomonas aeruginosa</i></b>	3 mm große, runde, weiß-opake Kolonien

**Tabelle 4-12:** Koloniemorphologie von Non-*Salmonella*-Prüfstämmen auf ASAP

<b>Stamm</b>	<b>Koloniemorphologie auf ASAP</b>
<b><i>Citrobacter freundii</i></b> (n=2)	3-4 mm große, runde, farblose oder blaugrüne, raue Kolonien
<b><i>E. coli</i></b>	1-2 mm große, runde, weiße Kolonien
<b><i>Enterobacter aerogenes</i></b>	2 mm große, runde, erhabene, glatte, glänzende, blaue Kolonien
<b><i>Hafnia alvei</i></b>	1 mm große, runde, erhabene, glatte, glänzende, blaue Kolonien
<b><i>Proteus mirabilis</i></b>	Gehemmt
<b><i>Proteus morganii</i></b>	2 mm große, runde, erhabene, glatte, glänzende, transparente Kolonien
<b><i>Shigella sonnei</i></b>	Weißer Pinpoints
<b><i>Pseudomonas aeruginosa</i></b>	Gehemmt

**Tabelle 4-13:** Koloniemorphologie von Non-*Salmonella*-Prüfstämmen auf OSCM

<b>Stamm</b>	<b>Koloniemorphologie auf OSCM</b>
<b><i>Citrobacter freundii</i></b> (n=2)	3 mm große, runde, erhabene, glatte, glänzende, blaue bis blassviolette Kolonien
<b><i>E. coli</i></b>	2-3 mm große, runde, blaue Kolonien
<b><i>Enterobacter aerogenes</i></b>	3 mm große, runde, erhabene, glatte, glänzende, violette Kolonien mit blauem Zentrum
<b><i>Hafnia alvei</i></b>	1 mm große, runde, erhabene, glatte, glänzende, blaue Kolonien
<b><i>Proteus mirabilis</i></b>	Gehemmt
<b><i>Proteus morganii</i></b>	Transparente Pinpoints mit blassviolettem Zentrum
<b><i>Shigella sonnei</i></b>	1-2 mm große, runde, blaue Kolonien
<b><i>Pseudomonas aeruginosa</i></b>	1-2 mm große, runde, erhabene, glatte, glänzende blassviolette Kolonien

Mit keinem der eingesetzten Selektivnährmedien gelang die vollständige Hemmung von *Citrobacter freundii*, *E. coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus morganii* oder *Shigella sonnei* (**Tabelle 4-14**). In **Tabelle 4-15** sind in einer zusammenfassenden Übersicht die sechs im Versuch eingesetzten *Salmonella*-Selektivmedien und die nicht-detektierten Prüfstämme dargestellt. Nur mit dem Miller-Mallinson-Medium gelang nach 24-stündiger Subkultivierung ein zuverlässiger Nachweis charakteristischer Kolonien aller getesteten Prüfstämme (n = 35) und Hemmung des Wachstums von *Proteus mirabilis* (n=1). Mit den übrigen festen Selektivmedien wurden die Bakterienstämme von *S. Senftenberg*, *S. Derby*, *S. Dublin*, *Salmonella arizonae*, *Citrobacter freundii* und *Pseudomonas aeruginosa* hingegen fehlerhaft im Sinne von falsch-positiv bzw. falsch-negativ detektiert.

**Tabelle 4-14:** Wachstumsverhalten von Non-*Salmonella*-Prüfstämmen auf sechs verschiedenen *Salmonella*-Selektivnährmedien

Stamm	Wachstum auf Selektivnährboden					
	BPLS	XLD	XLT4	MM	ASAP	OSCM
<i>Citrobacter freundii</i> (n=2)	+	+	+	+	+	+
<i>E. coli</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Enterobacter aerogenes</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Hafnia alvei</i>	+	+	-	+	+	+
<i>Proteus mirabilis</i>	+	+	-	-	-	-
<i>Proteus morganii</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Shigella sonnei</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	+	+	+	-	+

+ Wachstum vorhanden (Pinpoints, Kolonien oder Schwärmphänomen)

- Vollständige Hemmung des Wachstums

**Tabelle 4-15:** Fehlerhafte Detektion von *Salmonella*- und Non-*Salmonella*-Prüfstämmen (n = 7) auf sechs verschiedenen Selektivmedien

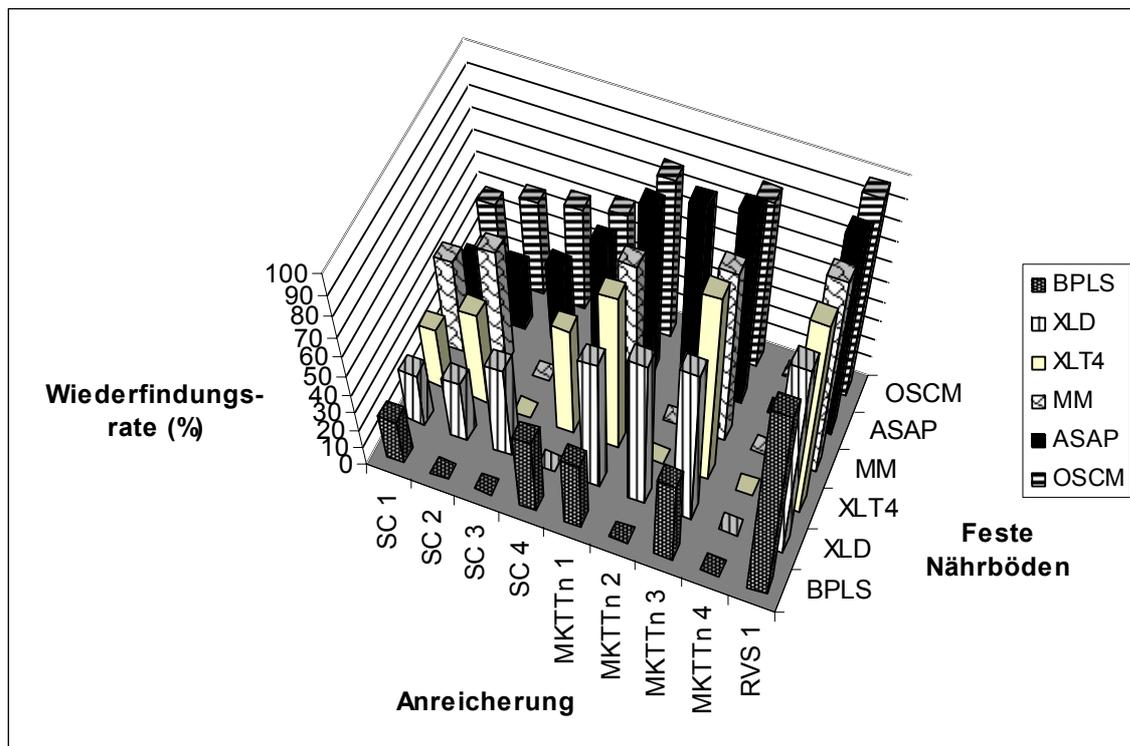
<b>Festes <i>Salmonella</i>- Selektivnährmedium</b>	<b>Fehlerhaft detektierter Prüfstamm (nach 24-stündiger Subkultivierung)</b>
<b>BPLS</b>	<i>Citrobacter freundii</i> (n=2), <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<b>XLD</b>	<i>Citrobacter freundii</i> (n=2), S. Senftenberg, <i>Salmonella arizonae</i>
<b>XLT4</b>	<i>Citrobacter freundii</i> (n=2), S. Senftenberg, <i>Salmonella arizonae</i>
<b>MM</b>	-
<b>ASAP</b>	S. Dublin
<b>OSCM</b>	S. Derby, S. Dublin, <i>Salmonella arizonae</i>

### 4.3 Teilversuch 2: Artifiziiell kontaminierte Lebensmittelproben

Für den kulturellen Nachweis von *Salmonella* spp. aus Fleisch sollten sowohl empfehlenswerte Inkubationsbedingungen als auch Kombinationen aus Anreicherungs- und Subkultivierungsmedien gefunden werden. Die Ergebnisse der dazu durchgeführten Modellversuche (n = 92) mit artifiziiell kontaminierten Schweinehackfleischproben werden in den nachfolgenden Abschnitten beschrieben.

#### 4.3.1 Vergleichende Untersuchungen zur Verlängerung der Inkubationsdauer um weitere 24 Stunden

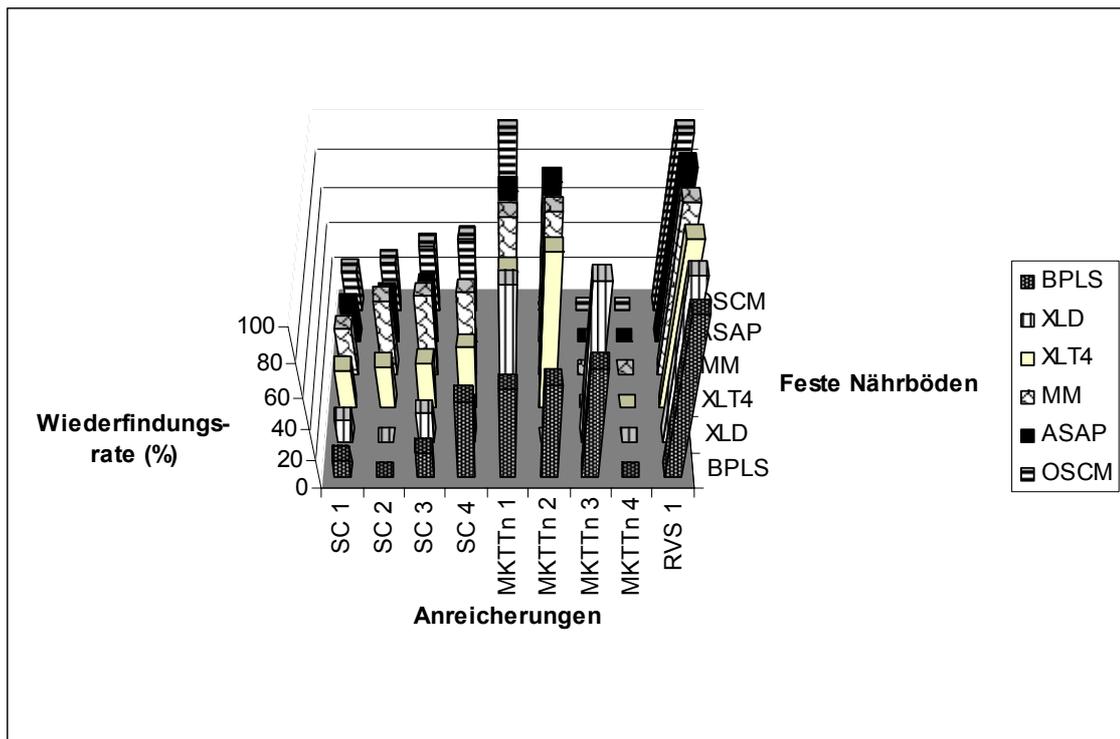
In Abbildung 4-1, Abbildung 4-2 und Abbildung 4-3 werden die Wiederfindungsraten von *S. Typhimurium* in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer und den Nährmedien als Säulendiagramme gezeigt. Die Darstellung der Einzeldaten als Säulendiagramme erfolgte kumulativ (vgl. auch Tabelle 9-1, Tabelle 9-2 und Tabelle 9-3). Die Wiederfindungsrate definiert sich als prozentualer Anteil der nachgewiesenen *Salmonella*-positiven Proben in Bezug auf die Gesamtheit der artifiziiell kontaminierten Hackfleischproben. Die Einmischversuche wurden in drei Gruppen durchgeführt. In der ersten Gruppe wurden Konzentrationen von 1-10 (n = 25, vgl. Abbildung 4-1), in der zweiten Gruppe Konzentrationen von 11-50 (n = 41, vgl. Abbildung 4-2) und in der dritten Gruppe Konzentrationen von 51-200 (n = 26, Abbildung 4-3) Koloniebildenden Einheiten (KbE) *S. Typhimurium* pro 25 g Schweinehackfleisch berücksichtigt.



#### Legende:

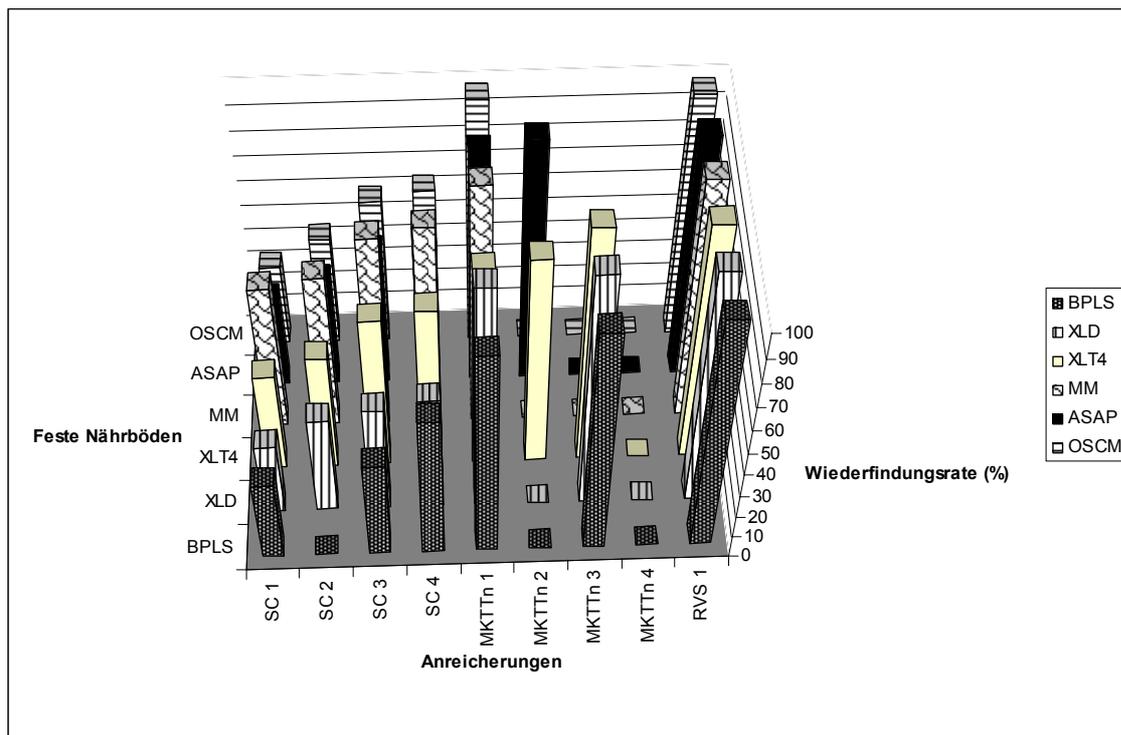
SC 1	24-stündige Selektivanreicherung und 24-stündige Subkultivierung
SC 2	24-stündige Selektivanreicherung und 48-stündige Subkultivierung
SC 3	48-stündige Selektivanreicherung und 24-stündige Subkultivierung
SC 4	48-stündige Selektivanreicherung und 48-stündige Subkultivierung
MKTTn 1	24-stündige Selektivanreicherung und 24-stündige Subkultivierung
MKTTn 2	24-stündige Selektivanreicherung und 48-stündige Subkultivierung
MKTTn 3	48-stündige Selektivanreicherung und 24-stündige Subkultivierung
MKTTn 4	48-stündige Selektivanreicherung und 48-stündige Subkultivierung
RVS 1	24-stündige Selektivanreicherung und 24-stündige Subkultivierung

**Abbildung 4-1:** Wiederfindungsrate (%) von Salmonellen aus artifiziell kontaminierten Hackfleischproben (n = 92) in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer und der Nährmedien: Ausgangsinokulum (n = 25) von 1-10 KbE *S. Typhimurium* /25 g Hackfleisch

**Legende:**

SC 1	24-stündige Selektivanreicherung und 24-stündige Subkultivierung
SC 2	24-stündige Selektivanreicherung und 48-stündige Subkultivierung
SC 3	48-stündige Selektivanreicherung und 24-stündige Subkultivierung
SC 4	48-stündige Selektivanreicherung und 48-stündige Subkultivierung
MKTTn 1	24-stündige Selektivanreicherung und 24-stündige Subkultivierung
MKTTn 2	24-stündige Selektivanreicherung und 48-stündige Subkultivierung
MKTTn 3	48-stündige Selektivanreicherung und 24-stündige Subkultivierung
MKTTn 4	48-stündige Selektivanreicherung und 48-stündige Subkultivierung
RVS 1	24-stündige Selektivanreicherung und 24-stündige Subkultivierung

**Abbildung 4-2:** Wiederfindungsrate (%) von Salmonellen aus artifizell kontaminierten Hackfleischproben (n = 92) in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer und der Nährmedien: Ausgangsinokulum (n = 41) von 11-50 KbE *S. Typhimurium* /25 g Hackfleisch



#### **Legende:**

- |         |  |
|---------|--|
| SC 1    | 24-stündige Selektivanreicherung und 24-stündige Subkultivierung |
| SC 2    | 24-stündige Selektivanreicherung und 48-stündige Subkultivierung |
| SC 3    | 48-stündige Selektivanreicherung und 24-stündige Subkultivierung |
| SC 4    | 48-stündige Selektivanreicherung und 48-stündige Subkultivierung |
| MKTTn 1 | 24-stündige Selektivanreicherung und 24-stündige Subkultivierung |
| MKTTn 2 | 24-stündige Selektivanreicherung und 48-stündige Subkultivierung |
| MKTTn 3 | 48-stündige Selektivanreicherung und 24-stündige Subkultivierung |
| MKTTn 4 | 48-stündige Selektivanreicherung und 48-stündige Subkultivierung |
| RVS 1   | 24-stündige Selektivanreicherung und 24-stündige Subkultivierung |

**Abbildung 4-3:** Wiederfindungsrate (%) von Salmonellen aus artifiziell kontaminierten Hackfleischproben (n = 92) in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer und der Nährmedien: Ausgangsinokulum (n = 26) von 51-200 KbE *S. Typhimurium* /25 g Hackfleisch

### 4.3.2 Selenit-Cystin-Medium

Unabhängig von der eingemischten Konzentration führte eine Verlängerung der Inkubationsdauer um weitere 24 Stunden bei einer Selektivanreicherung mit Selenit-Cystin-Medium in 100 % der Fälle zu einer Erhöhung der *Salmonella*-Wiederfindungsrate. In Gruppe eins (**Tabelle 9-1**) konnten die Wiederfindungsraten von 24,0 % bis 48,0 % (Prozentsatz nach 24-stündiger Selektivanreicherung und 24-stündiger Subkultivierung), nach Verlängerung der Inkubationsdauer auf Wiederfindungsraten zwischen 40,0 % und 60,0 % gesteigert werden. In der Gruppe zwei (**Tabelle 9-2**) konnten die Wiederfindungsraten von 12,0 % bis 29,3 % (Prozentsatz nach 24-stündiger Selektivanreicherung und 24-stündiger Subkultivierung), nach Verlängerung der Inkubationsdauer auf Wiederfindungsraten zwischen 22,0 % und 51,2 % gesteigert werden. In der Gruppe drei (**Tabelle 9-3**) konnten die Wiederfindungsraten von 30,8 % bis 61,5 % (Prozentsatz nach 24-stündiger Selektivanreicherung und 24-stündiger Subkultivierung), nach Verlängerung der Inkubationsdauer auf Wiederfindungsraten zwischen 50,0 % und 84,6 % gesteigert werden. Dabei erwies sich eine Kombination von Selenit-Cystin-Selektivanreicherung mit Subkultivierung auf MM-Agar als überlegen, denn unabhängig der eingemischten Konzentration wurden hiermit die höchsten Wiederfindungsraten erzielt (60,0 %; 51,2 % und 84,6 %).

### 4.3.3 Tetrathionat-Anreicherung nach Muller Kauffmann mit Novobiocin

Eine Verlängerung der Inkubationsdauer um weitere 24 Stunden erwies sich bei einer Selektivanreicherung mit MKTTn in 98,6 % der Fälle als unabdingbar. In Gruppe eins (vgl. **Tabelle 9-1**) wurden die *Salmonella*-Wiederfindungsraten von 36,0 % bis 84,0 % (Prozentsatz nach 24-stündiger Selektivanreicherung und 24-stündiger Subkultivierung) durch eine Verlängerung der Inkubationsdauer auf Wiederfindungsraten zwischen 44,0 % und 96,0 % gesteigert. Dabei erwies sich eine Kombination von MKTTn-Selektivanreicherung mit Subkultivierung auf XLT4-Agar oder ASAP-Agar als überlegen, denn hiermit wurden die höchsten Wiederfindungsraten von 96,0 % erzielt. In höheren Einmischkonzentrationen, wie in Gruppe zwei und drei durchgeführt, wurden die höchsten Wiederfindungsraten bereits ohne eine Verlängerung der Inkubationsdauer erzielt. Eine Kombination mit MKTTn-Selektivanreicherung und den chromogenen Nährmedien OSCM-Agar bzw. OSCM-Agar und MM-Agar erwies sich bereits nach 24-stündiger Selektivanreicherung und 24-stündiger Subkultivierung als überlegen (jeweils 100 %; vgl. **Tabelle 9-2**, **Tabelle 9-3**). Desweiteren wurden in der zweiten Gruppe Wiederfindungsraten zwischen 58,5 % und 92,7 % bzw. nach Verlängerung der Inkubationsdauer zwischen 70,7 % und 95,1 % erzielt. In Gruppe drei konnten die Wiederfindungsraten von 84,6 % bis 96,2 % (Prozentsatz nach 24-stündiger Selektivanreicherung und 24-stündiger Subkultivierung) durch eine Verlängerung der Inkubationsdauer um weitere 24 Stunden auf 96,2 % bis 100 % gesteigert werden.

### 4.3.4 Rappaport-Vassiliadis-Anreicherung mit Sojamehlpepton

Eine Verlängerung der Inkubationsdauer um weitere 24 Stunden erwies sich bei einer RVS-Selektivanreicherung als entbehrlich. Sowohl unabhängig der eingemischten *Salmonella*-Konzentration als auch der im Versuch eingesetzten festen Nährmedien konnten bereits nach 24-stündiger Selektivanreicherung in RVS und 24-stündiger Subkultivierung zu 100 % die höchste *Salmonella*-Wiederfindungsrate von jeweils 100 % erzielt werden (vgl. **Tabelle 9-1**, **Tabelle 9-2**, **Tabelle 9-3**).

### 4.3.5 Vergleichende Untersuchungen zu den Referenznährböden

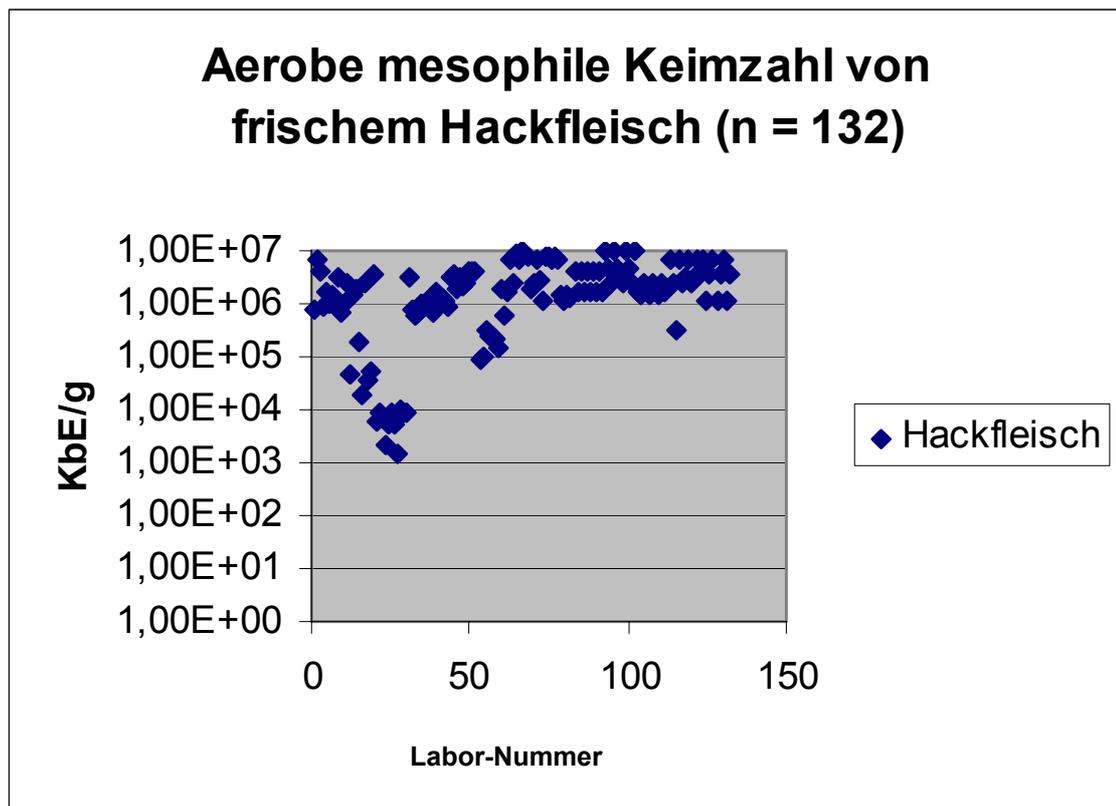
Beim Vergleich der Referenznährböden gemäß DIN EN 12824:1998 und DIN EN ISO 6579:2003 konnte folgender Trend beobachtet werden: Unabhängig von der Einmischkonzentration erbrachten eine 48-stündige Selektivanreicherung mit SC-Medium und 48-stündige Subkultivierung auf dem Referenznährboden BPLS deutlich geringere *Salmonella*-Wiederfindungsraten. So wurden Wiederfindungsraten von nur 40,0 %, 51,0 % und 61,5 % erzielt. Im Vergleich dazu erbrachte eine 24-stündige Selektivanreicherung mit MKTTn-Medium und eine 24-stündige Subkultivierung auf dem Referenznährboden XLD gemäß DIN EN ISO 6579:2003 deutlich höhere Wiederfindungsraten von 68,0 %, 95,0 % und 96,2 % (vgl. **Tabelle 9-1**, **Tabelle 9-2** und **Tabelle 9-3**).

## 4.4 Teilversuch 3: Untersuchungen anhand nativer Lebensmittelproben

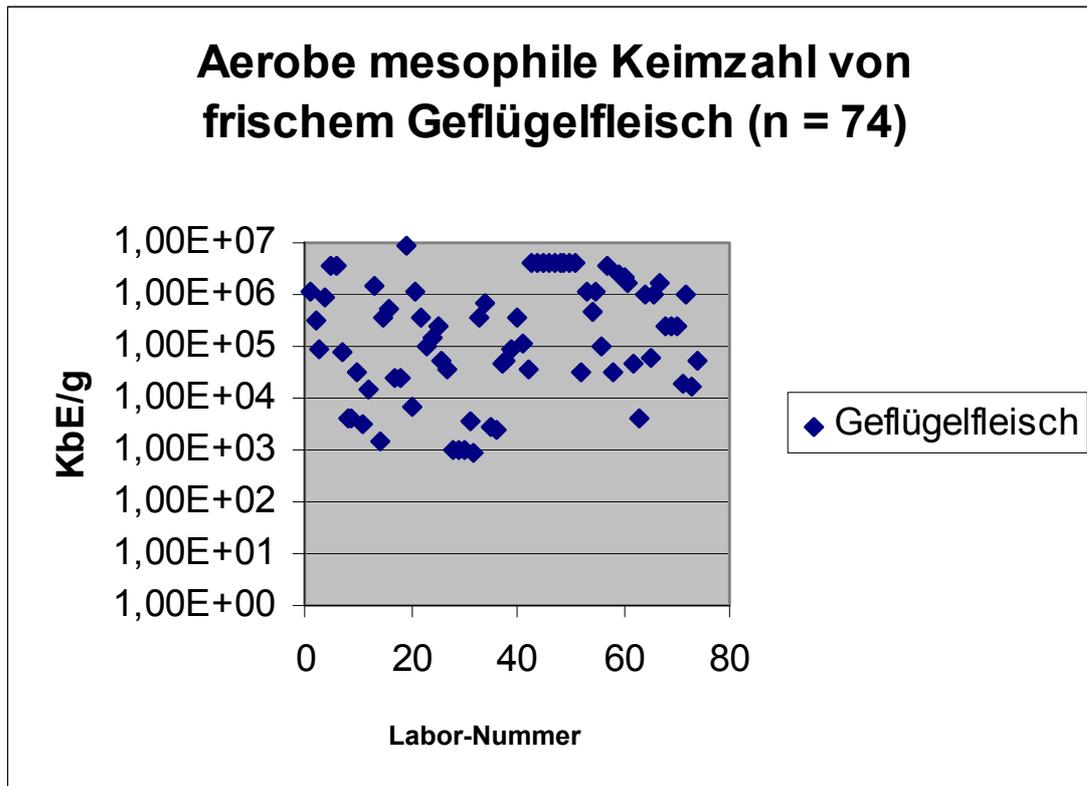
Für den kulturellen Nachweis von *Salmonella* spp. aus Fleisch sollten die bisher geltende Referenzmethode nach § 64 LFGB mit dem neuen Verfahren nach DIN EN ISO 6579:2003 anhand eines statistischen Tests auf Unterlegenheit methodisch verglichen werden. Desweiteren wurden die festen Nährmedien unabhängig zueinander hinsichtlich ihrer Effizienz beschrieben. Die Ergebnisse aus den Untersuchungen von 286 nativ kontaminierten Fleischproben werden in den nachfolgenden Abschnitten dargestellt.

#### 4.4.1 Aerobe mesophile Keimzahl der Hackfleisch- und Geflügelfleischproben

Im dritten Teilversuch wurden insgesamt 286 Hackfleisch- ( $n = 206$ ) und Geflügelfleischproben ( $n = 80$ ) aus dem Einzelhandel untersucht. Davon entfielen 132 Proben auf frisches Hack- und 74 Proben auf frisches Geflügelfleisch (**Tabelle 3-2**). Von den Lebensmittelproben aus frischen Matrices wurde die aerobe mesophile Keimzahl bestimmt. Der aerobe mesophile Keimgehalt der Hackfleischproben ( $n = 132$ ) lag zu 42 % ( $n = 55$ ) oberhalb des Grenzwertes  $m$  gemäß Verordnung (EG) 2073/2005 (**Abbildung 4-4**). In **Abbildung 4-5** sind die Einzeldaten für den aeroben mesophilen Keimgehalt der Geflügelfleischproben ( $n = 74$ ) dargestellt. 30 % ( $n = 22$ ) der Geflügelfleischproben wiesen einen aeroben mesophilen Keimgehalt oberhalb des empfohlenen Grenzwertes  $m$  für frisches Geflügelfleisch gemäß der mikrobiologischen Spezifikationen der FAO bzw. des empfohlenen Grenzwertes  $m$  für mariniertes Geflügelfleisch gemäß der Empfehlung der Föderation der Schweizerischen Nahrungsmittelindustrie auf (BAUMGART, 2002). Somit wiesen die aus dem Einzelhandel bezogenen Hackfleisch- und Geflügelfleischproben einen überwiegend guten hygienischen Zustand auf.



**Abbildung 4-4:** Aerobe mesophile Keimzahl von frischem Hackfleisch (n = 132)



**Abbildung 4-5:** Aerobe mesophile Keimzahl von frischem Geflügelfleisch (n = 74)

#### 4.4.2 Anteil *Salmonella*-positiver Hackfleisch- und Geflügelfleischproben

Von den 286 Hackfleisch- und Geflügelfleischproben waren insgesamt 39 (13,6 %) mit *Salmonellen* kontaminiert. Davon entfielen 19 Proben auf frisches Hack- und Geflügelfleisch und 20 Proben auf nachuntersuchte, d. h. tiefgefrorene, bereits als *Salmonella*-positiv bestätigte Lebensmittelproben (vgl. **Kap. 3.2.2**, **Tabelle 4-16**). Demnach lag die *Salmonella*-Kontaminationsrate, bezogen auf die Gesamtheit der Untersuchungen der jeweiligen frischen Matrix (vgl. **Tabelle 3-2**) bei 11,3 % für frisches Schweinehackfleisch (*Salmonella*-positive Proben: n = 8), bei 9,8 % für gemischtes Hackfleisch (*Salmonella*-positive Proben n = 6) und bei 6,8 % für frisches Geflügelfleisch (*Salmonella*-positive Proben n = 5).

Bei 58 (Hackfleisch n = 52, Geflügel n = 6) der tiefgefrorenen Lebensmittelproben (n = 80) handelte es sich um eine Nachuntersuchung zwischenzeitlich tiefgefroren gelagerter *Salmonella*-positiver Einzelproben. Von den nachuntersuchten Proben erwiesen sich Schweinehackfleisch (n = 5), gemischtes Hackfleisch (n = 8), Rinderhackfleisch (n = 5) sowie Geflügelfleisch (n = 2) als *Salmonella*-positiv. Dies entsprach, bezogen auf die Gesamtheit der Untersuchungen der jeweiligen nachuntersuchten Matrix (vgl. **Tabelle 3-2**), einer *Salmonella*-Wiederfindungsrate von 34,6 % für nachuntersuchte *Salmonella*-positive Hackfleischproben und einer *Salmonella*-Wiederfindungsrate von 33,3 % für nachuntersuchte *Salmonella*-positive Geflügelfleischproben.

**Tabelle 4-16:** Teilversuch 3: *Salmonella*-positive Proben (n = 39) aus Untersuchungen nativer Lebensmittelproben

**Anzahl der *Salmonella*-positiven Proben**

<b>Untersuchungsmaterial</b>	<b>Frische Lebensmittelproben</b>	<b>Nachuntersuchte Lebensmittelproben</b>	<b>Summe</b>
<b>Hackfleisch, Schwein</b>	8	5	13
<b>Hackfleisch, gemischt</b>	6	8	14
<b>Hackfleisch, Rind</b>	0	5	5
<b>Geflügelfleisch</b>	5	2	7
<b><math>\Sigma</math></b>	19	20	39

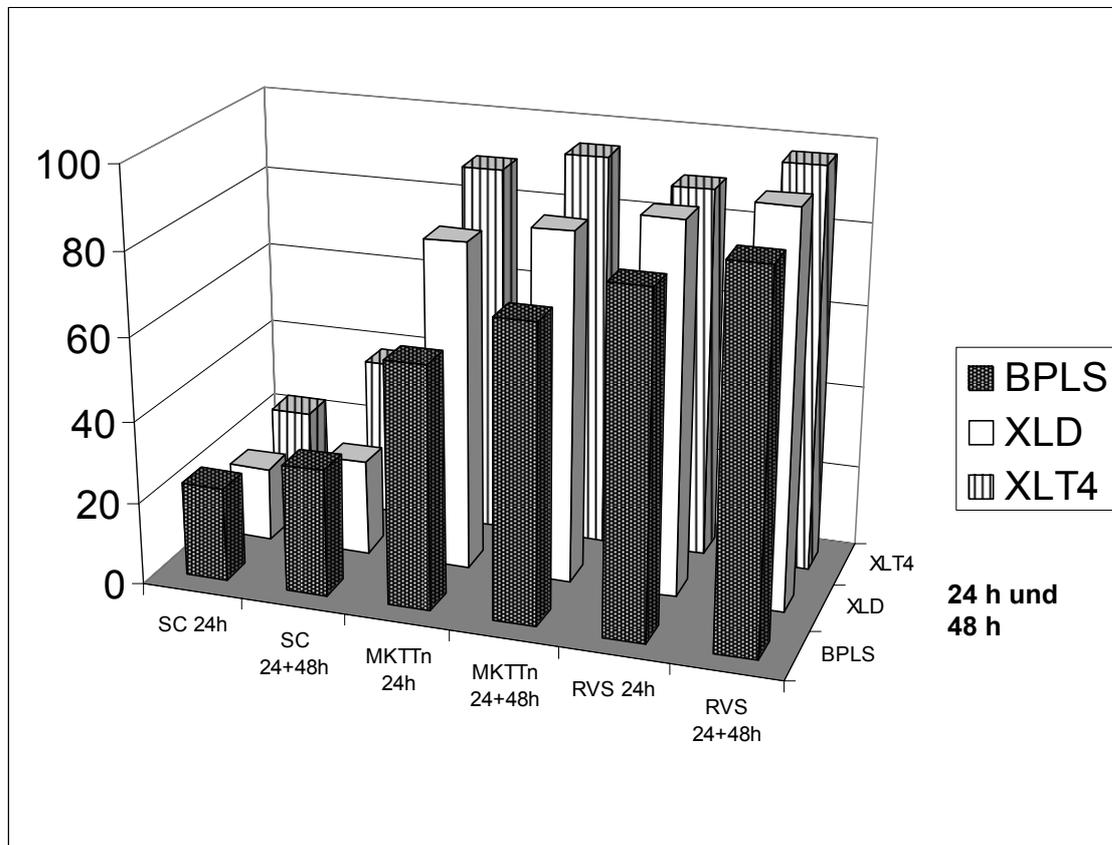
#### 4.4.3 *Salmonella*-Nachweishäufigkeit in Abhängigkeit von Kultivierungsdauer und -nährmedium

In Abbildung 4-6 und Abbildung 4-7 sind für die kulturelle Untersuchung von 39 *Salmonella*-positiven Hackfleisch- und Geflügelfleischproben die Nachweisraten in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer und den Nährmedien als Säulendiagramme dargestellt. Die Darstellung der Einzeldaten als Säulendiagramme erfolgte kumulativ (vgl. Tabelle 9-4). Die höchste Nachweisrate gelang mit einer Selektivanreicherung in RVS (97,4 %), gefolgt von MKTTn (94,9 %) und SC (38,5 %).

Eine Verlängerung der Inkubationsdauer um weitere 24 Stunden bei einer Selektivanreicherung mit SC war unabdingbar, denn es führte in allen Fällen zu einer Erhöhung der *Salmonella*-Nachweisrate. Dabei war XLT4 zur Subkultivierung den anderen festen Nährmedien überlegen, weil hiermit die höchste Nachweisrate von 38,5 % erzielt wurde.

Eine Verlängerung der Inkubationsdauer um weitere 24 Stunden bei einer Selektivanreicherung mit MKTTn war vorteilhaft, denn auch hier führte es – mit Ausnahme des ASAP-Mediums – zu einer Erhöhung der Salmonellen-Nachweisrate. Dabei erwies sich eine Kombination mit XLT4 auch hier als überlegen, weil damit die höchste Nachweisrate von 94,9 % erzielt wurde.

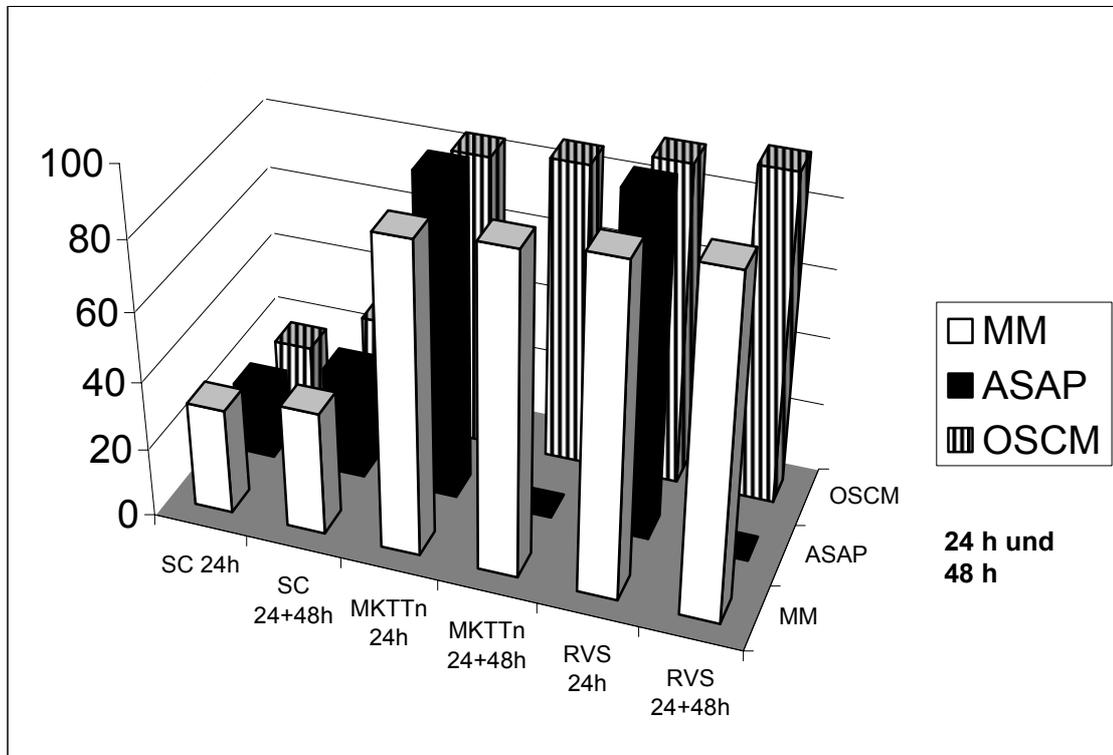
Eine Verlängerung der Inkubationsdauer um weitere 24 Stunden bei einer Selektivanreicherung mit RVS führte zwar zu einer Erhöhung der *Salmonella*-Nachweisrate. Es erwies sich jedoch eine Kombination mit ASAP als überlegen, weil bereits nach verkürzter Anreicherungszeit die höchste Nachweisrate von 97,4 % erzielt wurde. Desweiteren wurden *Salmonella*- Nachweisraten von 97,4 % mit XLT4 und MM nach einer verlängerten Anreicherungszeit in RVS erzielt. Im Vergleich zu den herkömmlichen Nährmedien BPLS, XLD und XLT4 gelang mit den neuen chromogenen Nährmedien MM, ASAP und OSCM bereits nach verkürzter Anreicherungszeit in RVS – d. h. eine Verlängerung um weitere 24 h entfiel - eine insgesamt höhere Nachweisrate (94,9 %; 97,4 % und 92,3 % gegenüber 82,1 %; 89,7 % und 89,7 %).



**Legende:**

SC 24 h	24-stündige Selektivanreicherung in SC
SC 24 + 48 h	48-stündige Selektivanreicherung in SC
MKTTn 24 h	24-stündige Selektivanreicherung in MKTTn
MKTTn 24 + 48 h	48-stündige Selektivanreicherung in MKTTn
RVS 24 h	24-stündige Selektivanreicherung in RVS
RVS 24 + 48 h	48-stündige Selektivanreicherung in RVS

**Abbildung 4-6:** Nachweisrate (%) von Salmonellen aus *Salmonella*-positiven Hackfleisch- und Geflügelfleischproben (n = 39) in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer und den Nährmedien: 1. Herkömmliche Nährmedien

**Legende:**

SC 24 h	24-stündige Selektivanreicherung in SC
SC 24 + 48 h	48-stündige Selektivanreicherung in SC
MKTTn 24 h	24-stündige Selektivanreicherung in MKTTn
MKTTn 24 + 48 h	48-stündige Selektivanreicherung in MKTTn
RVS 24 h	24-stündige Selektivanreicherung in RVS
RVS 24 + 48 h	48-stündige Selektivanreicherung in RVS

**Abbildung 4-7:** Nachweisrate (%) von Salmonellen aus *Salmonella*-positiven Hackfleisch- und Geflügelfleischproben (n = 39) in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer und den Nährmedien: 2. Chromogene Nährmedien

Desweiteren wurden die Nachweisraten hinsichtlich eines signifikanten Unterschieds geprüft. Dabei blieben die Resultate einer Subkultivierung auf chromogenen Nährmedien - im Sinne eines zweiten Nährbodens frei nach Wahl – unberücksichtigt, weil in Kombination mit einer Selektivanreicherung in RVS insgesamt die höchsten *Salmonella*-Nachweisraten erzielt wurden. Dadurch entstand kein Unterschied mehr zwischen altem und neuem Referenzverfahren.

Eine statistische Prüfung mit dem McNemar-Vorzeichentest ermittelte eine signifikant höhere Nachweishäufigkeit ( $p = 0,000003$ ) von Salmonellen mit einer verlängerten Anreicherung in RVS und nachfolgender Subkultivierung auf BPLS im Vergleich zu einer verlängerten Anreicherung in SC (**Tabelle 4-17**).

**Tabelle 4-17:** Vierfeldertafel zum Vergleich einer verlängerten Anreicherung in RVS und in SC-Medium anhand des McNemar-Vorzeichentests (McNemar, 1947)

		SC/BPLS (24 und 48 h)		
		+	-	$\Sigma$
RVS/BPLS (24 und 48 h)	+	12	23	35
	-	1	250	251
$\Sigma$		13	273	286

$p =$   
0,000003

Die Nachweishäufigkeit von Salmonellen mit einer verkürzten Anreicherung in RVS und nachfolgender Subkultivierung auf XLD war hingegen nicht signifikant höher ( $p = 0,375$ ) als mit einer verkürzten Anreicherung in MKTTn (**Tabelle 4-18**).

**Tabelle 4-18:** Vierfeldertafel zum Vergleich einer verkürzten Anreicherung in RVS und in MKTTn anhand des McNEMAR-Vorzeichentests (McNEMAR, 1947)

		MKTTn/XLD (24 h)		$\Sigma$
		+	-	
RVS/XLD (24 h)	+	31	4	35
	-	1	250	251
$\Sigma$		32	254	286

$$\underline{p = 0,375}$$

Zwischen einer verkürzten und einer verlängerten Anreicherungszeit in SC mit nachfolgender Subkultivierung auf BPLS konnte ebenso keine statistisch signifikant höhere Nachweishäufigkeit ( $p = 0,250$ ) ermittelt werden (**Tabelle 4-19**).

**Tabelle 4-19:** Vierfeldertafel zum Vergleich einer verkürzten und einer verlängerten Anreicherung in SC anhand des McNEMAR-Vorzeichentests (McNEMAR, 1947)

		SC/BPLS (24 h)		$\Sigma$
		+	-	
SC/BPLS (24 und 48 h)	+	9	3	12
	-	0	274	274
$\Sigma$		9	277	286

$$p = 0,250$$

Zwischen einer verkürzten und einer verlängerten Anreicherungszeit in MKTTn mit nachfolgender Subkultivierung auf XLD konnte ebenso keine statistisch signifikant höhere Nachweishäufigkeit ( $p = 0,500$ ) ermittelt werden (**Tabelle 4-20**).

**Tabelle 4-20:** Vierfeldertafel zum Vergleich einer verkürzten und einer verlängerten Anreicherung in MKTTn anhand des McNEMAR-Vorzeichentests (McNEMAR, 1947)

		MKTTn/XLD (24 h)		$\Sigma$
		+	-	
MKTTn/XLD (24 und 48 h)	+	31	2	33
	-	0	253	253
$\Sigma$		31	255	286

$p = 0,500$

Zwischen einer verkürzten und einer verlängerten Anreicherungszeit in RVS mit nachfolgender Subkultivierung auf XLD konnte ebenso keine statistisch signifikant höhere Nachweishäufigkeit ( $p = 0,500$ ) ermittelt werden (**Tabelle 4-21**).

**Tabelle 4-21:** Vierfeldertafel zum Vergleich einer verkürzten und einer verlängerten Anreicherung in RVS und Subkultivierung auf XLD anhand des McNEMAR-Vorzeichentests (McNEMAR, 1947)

		RVS/XLD (24 h)		$\Sigma$
		+	-	
RVS/XLD (24 und 48 h)	+	35	2	37
	-	0	249	249
$\Sigma$		35	251	286

$p = 0,500$

Auch die statistische Prüfung der Ergebnisse für eine verkürzte Anreicherung in RVS mit nachfolgender Subkultivierung auf XLD erbrachte keine statistisch signifikant höhere Nachweishäufigkeit ( $p = 1,000$ ) im Vergleich mit einer verlängerten Anreicherung in RVS und nachfolgender Subkultivierung auf BPLS (**Tabelle 4-22**).

**Tabelle 4-22:** Vierfeldertafel zum Vergleich einer verkürzten und einer verlängerten Anreicherung in RVS und Subkultivierung auf XLD und BPLS anhand des McNEMAR-Vorzeichentests (McNEMAR, 1947)

		RVS/XLD (24 h)		$\Sigma$
		+	-	
RVS/BPLS (24 und 48 h)	+	33	2	35
	-	2	249	251
$\Sigma$		35	251	286

$p = 1,000$

Eine verkürzte Anreicherung in RVS mit nachfolgender Subkultivierung auf BPLS erbrachte keine statistisch signifikant höhere Nachweishäufigkeit ( $p = 0,250$ ) im Vergleich mit einer verlängerten Anreicherung in RVS und nachfolgender Subkultivierung auf BPLS (**Tabelle 4-23**).

**Tabelle 4-23:** Vierfeldertafel zum Vergleich einer verkürzten und einer verlängerten Anreicherung in RVS und Subkultivierung auf BPLS anhand des McNemar-Vorzeichentests (McNemar, 1947)

		RVS/BPLS (24 h)		$\Sigma$
		+	-	
RVS/BPLS (24 und 48 h)	+	32	3	35
	-	0	251	251
$\Sigma$		32	254	286

$$p = 0,250$$

#### 4.4.4 Vergleich der kulturellen Referenzmethoden: Statistischer Test auf Unterlegenheit

Anhand einer Stichprobe von 286 Hackfleisch- und Geflügelfleischproben mit insgesamt 39 *Salmonella*-positiven Proben wurden folgende Bedingungen überprüft: Als Bedingung für die Testwahrheit oder alte Referenzmethode („Alte Methode“) galten die Ergebnisse, die mit den Selektivanreicherungen SC und RVS mit verlängerter Anreicherungszeit (d.h. 24 Stunden und weitere 24 Stunden bei negativem Ergebnis), Subkultivierung auf BPLS-Nährboden und Nachweis von mindestens fünf Kolonien erzielt wurden. Als Bedingung für die Testvariante oder neue Referenzmethode („Neue Methode“) galten die Ergebnisse, die mit den Selektivanreicherungen MKTTn und RVS mit verkürzter Anreicherungszeit, Subkultivierung auf XLD und Nachweis von mindestens einer Kolonie erzielt wurden. **Tabelle 4-24** zeigt die dazugehörige Vierfeldertafel. 37 der positiven Proben erfüllten die oben genannten Bedingungen. Je eine Probe konnte sowohl mit der „alten Methode“ als auch der „neuen Methode“ nicht nachgewiesen werden. Die relative Genauigkeit oder „Accuracy“, definiert nach DIN EN ISO 16140:2003, der verglichenen Verfahren lag demnach bei 89,7 %.

Statistisch betrachtet konnte zwischen der alten und der neuen Referenzmethode kein signifikanter Unterschied gezeigt werden ( $p = 1,000$ ). Die Anzahl der Wechsler zwischen Falsch-Negativen und Falsch-Positiven war nicht signifikant groß. Daher muß die Nullhypothese, formuliert als Aussage „Die neue Methode ist nicht schlechter als die alte Methode“, unberechtigterweise beibehalten werden. Die aufgestellte Nullhypothese beizubehalten, bedeutet jedoch eine statistisch schwache Aussage zu formulieren, weil die sogenannte Teststärke oder Trennschärfe („Power“, engl.) des durchgeführten Tests zu gering ist. Nach WALLIS (1980) ist die Power eines Tests definiert als die Wahrscheinlichkeit, die der Nullhypothese  $H_0$  gegenübergestellte richtige Alternativhypothese  $H_A$  als solche zu erkennen.

**Tabelle 4-24:** Vierfeldertafel zum Vergleich der *Salmonella*-Referenzmethoden anhand des McNEMAR-Vorzeichentests (McNEMAR, 1947)

		Neue Methode		$\Sigma$
		+	-	
Alte Methode	+	35	1	36
	-	1	249	250
$\Sigma$		36	250	286

$p = 1,000$

#### 4.4.5 Sensitivität, Spezifität und Produktivität der Selektivnährmedien

Das Leistungsvermögen der Selektivnährmedien wurde sowohl im ersten Teilversuch anhand des Wachstums von Prüfstämmen (vgl. **Kap. 4.1**) als auch im dritten Teilversuch anhand von Einzelbeobachtungen aus der Untersuchung nativer Lebensmittelproben beurteilt. So wurde für die Berechnung der Sensitivität von der Option ausgegangen, dass mindestens fünf Kolonien bestätigt werden mussten. Demnach wurde für BPLS eine Sensitivität von 90,7 %, für XLD und OSCM von 95,1 % sowie für XLT4, MM und ASAP von 97,5 % ermittelt. Verringerte man die Vorgabe auf eine Bestätigung von mindestens einer Kolonie, dann konnte die Sensitivität der Nährmedien gesteigert werden, u.z. für BPLS auf 95,1 %, für OSCM auf 97,5 % und für XLT4, MM und ASAP auf 100 %. Für die Spezifität wurden geringere Werte ermittelt. So wurde demnach für XLD eine Spezifität von 79,9 %, für OSCM von 82,9 %, für MM von 85,8 %, für BPLS von 87,9 % sowie für XLT4 und ASAP von 93,6 % berechnet. Eine besonders hohe Produktivität erzielten die Elektivmedien BPLS ( $n = 75; \bar{x} = 3,0; s = 0,67$ ) und MM ( $n = 88; \bar{x} = 3,0; s = 0,5$ ). Die herkömmlichen Nährmedien XLD ( $n = 79; \bar{x} = 2,6; s = 0,77$ ) und XLT4 ( $n = 90; \bar{x} = 2,6; s = 0,79$ ) sowie die chromogenen Nährmedien OSCM ( $n = 83; \bar{x} = 2,6; s = 0,5$ ) und ASAP ( $n = 86; \bar{x} = 2,5; s = 0,5$ ) erzielten eine geringere Produktivität.

#### 4.4.6 Anzahl und Verteilung der isolierten *Salmonella*-Serovare

Aus 39 *Salmonella*-positiven Hackfleisch- und Geflügelfleischproben konnten 43 Salmonellen-Stämme isoliert werden, unter denen sich 8 unterschiedliche Serovare und 2 nicht weiter typisierbare Salmonellen-Stämme befanden. Unter den 43 Isolaten dominierte der Serovar *S. Typhimurium* (n = 21) mit den Subtypen DT 104 B low, DT 104 L, DT 012 und RDNC. In abnehmender Häufigkeit wurden die Serovare *S. Infantis* (n = 8), *S. Saintpaul* (n = 3), *S. Senftenberg* (n = 1), *S. Derby* (n = 1), *S. I-Rauhform* (n = 1), *S. Paratyphi B d-Tartrat-positiv* (n = 1) und *S. Enteritidis* PT1 (n = 1) sowie nicht weiter typisierbare Salmonellen der Gruppe B (n = 1) und Gruppe D1 (n = 5) gefunden. In einigen Fällen konnten mehrere Serovare in einer einzigen Probe nachgewiesen werden (**Tabelle 4-25**).

Die Durchführung einer Resistenzbestimmung gemäß § 64 LFGB L 00.00-20a (vgl. **Kap. 3.3.3.2**) zeigte, dass sich einzelne Stämme der Serovare *S. Paratyphi B d-Tartrat-positiv* und *S. Saintpaul*, die aus der Matrix „Geflügelfleisch“ isoliert wurden, durch den Besitz multipler Resistenzen auszeichneten. Einzelne Stämme der Serovare *S. Typhimurium* Phagentyp DT 012 und RDNC, die mehrfach aus der Matrix „Rinder- und Schweinehackfleisch“ isoliert werden konnten, zeichneten sich ebenso durch eine Multiresistenz aus (**Abbildung 4-8**).

**Tabelle 4-25:** Anzahl und Verteilung der *Salmonella*-Isolate (n = 43) aus 39 Hackfleisch- und Geflügelfleischproben

<b>Salmonellen-Isolate aus Hackfleisch und Geflügelfleisch</b>			
<b>Anzahl positiver Proben (n)</b>	<b>Tierart</b>	<b>Anzahl Stämme (n)</b>	<b>Serovar bzw. Gruppe</b>
13	Schwein	17	S. Typhimurium DT 012 (n = 5), S. Typhimurium DT 104I (n = 2), S. Derby (n = 1), S. Subspezies I-Rauhform (n = 1), S. Infantis (n = 2), S. der Gruppe D 1 (n = 5), S. der Gruppe B (n = 1)
5	Rind	5	S. Typhimurium RDNC (n = 5)
14	Schwein und Rind	14	S. Typhimurium DT 104B low (n = 7), S. Infantis (n = 5), S. Typhimurium DT 012 (n = 1), S. Typhimurium DT 104 low (n = 1)
7	Geflügel	7	S. Saintpaul (n = 3), S. Infantis (n = 1), S. Paratyphi B d-Tartrat positiv (n = 1), S. Enteritidis PT 1 (n = 1), S. Senftenberg (n = 1)

**Resistenzen**

			GEN	AUG2
	STR	STR	STR	STR
TMP	TMP	NAL	NAL	NAL
SXT	SXT	AMP	AMP	AMP
SPE	SPE	SPE	SPE	SPE
SMX	SMX	SMX	SMX	SMX
S. Paratyphi B d-Tartrat positiv (n = 2)		S. Saintpaul (n = 3)		

**Geflügelfleisch****Resistenzen**

	CHL		CHL	CHL
	TET		TET	TET
	AMP		GEN	AUG2
	STR		STR	STR
	TMP		FFN	FFN
	SXT		AMP	AMP
	SPE		SPE	SPE
	SMX		SMX	SMX
S. Typhimurium DT 012 (n = 1)		S. Typhimurium RDNC (n = 2)		

**Hackfleisch aus Rind- und  
Schweinefleisch**

**Rinderhackfleisch**

**Legende:**

SMX	Sulphamethoxazol	GEN	Gentamycin
SPE	Spectinomycin	AUG2	Amoxicillin:Clavulansäure 2:1
SXT	Sulphamethoxazol/Trimethoprim	TET	Tetracyclin
TMP	Trimethoprim	CHL	Chloramphenicol
STR	Streptomycin		
AMP	Ampicillin		
NAL	Nalidixinsäure		
FFN	Florfenicol		

**Abbildung 4-8:** Multiresistente *Salmonella*-Stämme (n = 8), isoliert aus 39 *Salmonella*-positiven Hackfleisch- und Geflügelfleischproben

#### 4.4.7 Kolorimetrische Bestätigung mit O.B.I.S.

Es sollte überprüft werden, ob mit „O.B.I.S. *Salmonella* Test“ (Fa. Oxoid) die in der Routinediagnostik erforderliche Anzahl der vollständigen biochemischen Identifikationen *Salmonella*-präsumtiver Kolonien gesenkt werden könne (**Kap. 3.2.4.1**). So wurden 180 einzelne, präsumtive Kolonien getestet und es konnte gezeigt werden, dass der „O.B.I.S. *Salmonella* Test“ (Fa. Oxoid) ein zuverlässiges Screening-Verfahren darstellt. Sowohl einzelne Isolate von *Salmonella* spp. als auch *Citrobacter* spp. und *Proteus* spp. konnten, unabhängig der zu untersuchenden Matrix Hackfleisch oder Geflügelfleisch, eindeutig identifiziert werden. Im Vergleich mit den biochemischen, serologischen und molekularbiologischen Bestätigungsverfahren wurden zu 100 % übereinstimmende Ergebnisse erzielt (**Kap. 3.3.3**).

**Tabelle 4-26:** Kolorimetrische Bestätigung mit dem O.B.I.S. *Salmonella* Test

Präsumtive Kolonien (n)	NPA*	PYR**	<i>Salmonella</i> -Antiserum***	<i>invA</i> -PCR****	Api20E*****
60	-	-	+	+	<i>Salmonella</i> spp.
60	+	-	-	-	n. d.
60	-	+	-	-	n. d.

\* Phenylalanin-Deaminase-(NPA)-Aktivität

\*\* Pyroglutamyl-Aminopeptidase-(PYRase)-Aktivität

\*\*\* Serologische Bestätigung

\*\*\*\* Molekularbiologische Bestätigung

\*\*\*\*\* Biochemische Bestätigung

n. d. Nicht durchgeführt

## 5 Diskussion

### 5.1 Methodische Aspekte

#### 5.1.1 Zusammensetzung der Nährmedien

Die in den eigenen Untersuchungen eingesetzten Fertignährmedien sollten in ihrer Zusammensetzung den in den Referenzverfahren zitierten Rezepturen entsprechen. Daher musste auf Produkte unterschiedlicher Hersteller zurückgegriffen werden. So entsprach die Zusammensetzung des gepufferten Peptonwassers (Fa. Merck, **Kapitel 3.2.3**) der Rezeptur gemäß der amtlichen Standardmethode nach DIN EN 12824:1998. Zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung im Jahr 2001/2002 war ein im Sinne der horizontalen Norm modifiziertes BPW mit Caseinpepton kommerziell noch nicht zu beziehen. Dabei scheint Caseinpepton nicht unbedingt eine höhere biologische Wertigkeit als z. B. Proteosepepton aufzuweisen, zumal die Qualität eines Nährbodens im Allgemeinen trotz identischer Rezeptur von Hersteller zu Hersteller schwanken kann (REISSBRODT et al., 1995; BAYLIS et al., 2000).

Auch die Zusammensetzung des Selenit-Cystin-Mediums (Fa. Oxoid, **Kapitel 3.2.3**) entsprach der Rezeptur gemäß DIN EN 12824:1998. Die Salmonella-Anreicherungsbouillon nach Rappaport und Vassiliadis mit Sojamehlpepton (Fa. Merck, **Kapitel 3.2.3**) entsprach hingegen einer Rezeptur der veralteten Norm ISO 6579:1993. Zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung im Jahr 2001/2002 war ein im Sinne der horizontalen Norm modifiziertes RVS kommerziell noch nicht zu beziehen. Die Tetrathionat-Anreicherung nach Muller Kauffmann mit Novobiocin (Fa. Biokontrol, **Kapitel 3.2.3**) war hingegen vergleichbar mit der Rezeptur des Normentwurfs ISO/DIS 6579:2000. Desweiteren wurde der MKTTn-Fertignährboden der Fa. Biokontrol im Jahr 2000 im internationalen Ringversuch des europäischen Projektes SMT CT 96 2018 (Anhang C, DIN EN ISO 6579:2003) eingesetzt (persönliche Mitteilung, PD DR. HEINZ BECKER, Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch, LMU München, 2001). Auch die Zusammensetzung des BPLS-Agars (Fa. Oxoid, **Kapitel 3.2.3**) entsprach der Rezeptur gemäß DIN EN 12824:1998.

Der XLD-Agar (Fa. Sifin, **Kap.3.2.3**) entsprach der Rezeptur einer APHA-Empfehlung von 1992, die wiederum vergleichbar ist mit der XLD-Rezeptur gemäß dem neuen Standard DIN EN ISO 6579:2003.

### 5.1.2 Neues horizontales Referenzverfahren

In eigenen Untersuchungen sollte die Hypothese geprüft werden, ob „die neue Referenzmethode zu erwarten schlechter sei“. Der Entwurf ISO/DIS 6579:2000 war mehrfach diskutiert und überarbeitet worden, bevor im Jahr 2002 eine Übernahme dieser ISO-Norm durch CEN erfolgte.

Der Entwurf zur ISO/DIS 6579:2002 war ein „Final Draft International Standard (engl.)“, was bedeutet, dass keine über redaktionelle Fragen hinausgehende Kommentare und Änderungswünsche der Mitgliedstaaten mehr berücksichtigt wurden. Dem Entwurf hatten zwei Länder, darunter Deutschland, aus folgenden Gründen nicht zugestimmt: bemängelt wurde der Verzicht auf einen zweiten Ausstrich nach 48 h, die Empfehlung MKTTn bei 37 °C anstatt 43 °C zu bebrüten, die Empfehlung ein Shigellen-Selektivnährmedium einzusetzen und die Tatsache, dass der Nachweis typhoider Stämme nicht gewährleistet ist. Desweiteren gelang es nicht, im Rahmen der Revision einen Ringversuch zu starten, der tatsächlich das alte mit dem neuen Verfahren verglich. Auch der internationale Milchwirtschaftsverband (IDF) lehnte diesen Entwurf ab und entschloss sich im Jahr 2001 eine eigene Methode – die ISO 6785:2001 IDF 93 - zu empfehlen, die inhaltlich weitestgehend identisch mit der Norm DIN EN 12824:1998 ist (BECKER und MÄRTLBAUER, 2002).

Der XLD-Nährboden erscheint als Referenznährboden für die revidierte ISO-Methode 6579:2002 ungeeignet, weil er von TAYLOR (1965) XLD ursprünglich für den Bereich der klinischen Mikrobiologie entwickelt wurde, um Shigellen und andere pathogene Darmbakterien nachzuweisen. Für den spezifischen Nachweis von Salmonellen aus Lebensmitteln beschrieb TAYLOR zudem einen eigenständigen Selektivnährboden, den XLBG.

Auch VAN DER ZEE (2003) diskutierte die Problematik, dass XLD-Medium, eingesetzt als Referenznährboden, keine atypischen Stämme wie H<sub>2</sub>S-negative oder Laktose- und Saccharose-positive Stämme als *Salmonella*-präsumtive Kolonien nachweist. Daher wurde durch den Autor empfohlen, diese diagnostischen Lücken bei der Auswahl des zweiten Selektivnährbodens zu beachten und nach Möglichkeit einen geeigneten Nährboden auszuwählen.

Desweiteren ist zu berücksichtigen, dass auch aus flüssigen Selektivanreicherungen einzelne Serovaren nicht detektiert werden können. So beschrieben bereits RAPPAPORT et al. (1956) die Besonderheit, dass *S. Typhi* im sog. R-Medium nicht wächst. Ebenso ist beschrieben worden, dass *S. Paratyphi* in Tetrathionat-Anreicherung nicht wächst und *S. Anatum*-Stämme empfindlich auf eine Anreicherung in Selenit-Bouillon reagieren. Demnach empfahlen die Autoren die Selenit-Bouillon, weil sie am besten geeignet sei, um *S. Typhi* anzureichern.

Ferner beschrieben PETERZ et al. (1989), dass in RV-Medium sowohl aus eigener Herstellung als auch in Form von Fertignährböden das Wachstum des Stamms *S. Dublin* bei Inkubationstemperaturen von 43 °C vollständig unterdrückt wurde. Auch bei 42 °C konnte bei Fertignährmedien einzelner Hersteller eine Hemmung von *S. Dublin* beobachtet werden.

So bewerteten BECKER et al. (2003) das Protokoll nach ISO 6579:2002 und haben die Standardselektivanreicherungen RVS und MKTTn als nicht geeignet erachtet, um auch typhoide Stämme nachzuweisen. Die Autoren bezeichneten es als widersprüchlich, dass der „Scope“ des ISO-Protokolls einerseits den Nachweis von *S. Typhi* und *S. Paratyphi* einschließt und andererseits vor der geringen Sensitivität zum Nachweis von typhoiden Stämmen warnt.

### 5.1.3 Optimale Inkubationstemperaturen für die Tetrathionat-Anreicherung

In den eigenen Untersuchungen wurde nicht vom methodischen Vorgehen der ISO-Norm abgewichen, obwohl die empfohlene Inkubationstemperatur von 37 °C für MKTTn in der Literatur kontrovers diskutiert wird. Aus Gründen der Arbeitersparnis wurde darauf verzichtet, eine parallele MKTTn-Anreicherung bei zwei unterschiedlichen Temperaturen (37 °C und 43 °C) zu prüfen. In der Literatur finden sich unterschiedliche Empfehlungen und Erfahrungswerte.

Ursprünglich empfahl KAUFFMANN (1935) für die Anreicherung von Fäzes in MKTT-Medium eine 16 bis 20-stündige Inkubationsdauer bei 37 °C. D'AOUST (1981) sprach sich gegen eine Inkubationstemperatur von 43 °C speziell für MKTT aus, weil mit einer zu starken Hemmung des Salmonellen-Wachstums zu rechnen sei. In Untersuchungen anhand verschieden konzentrierter Inokula von *Salmonella*-Prüfstämmen, durchgeführt in den Jahren 1974 und 1977 sowohl von VASSILIADIS et al. als auch von VAN SCHOTHORST et al., konnte demonstriert werden, dass eine Inkubationstemperatur von 37 °C anstatt von 43 °C die Nachweisrate bei der Kultivierung in MKTT-Bouillon um bis zu 30 % erhöht (MACKEY, 1985). Auch die Food and Drug Administration (FDA) empfahl im Jahr 1992 eine Inkubationstemperatur von 35 °C für TT-Bouillon (BECKER et al., 1993). Zur Erhöhung der Sensitivität bei Untersuchungen von gering kontaminierten Proben empfahl REISSBRODT (1995) die Inkubationstemperatur auf 37 °C abzusenken.

Andererseits bewerteten BECKER et al. (2003) das Protokoll nach ISO 6579:2002 und erachteten den Ersatz der Selenit-Cystin-Bouillon durch MKTTn als nicht gerechtfertigt, weil die bisher vorhandenen Daten aus dem Bereich der mikrobiologischen Lebensmitteldiagnostik keinerlei Rückschlüsse über die Effizienz der modifizierten Tetrathionat-Anreicherung zulassen. Weder die Verringerung der Inkubationstemperatur auf 37 °C noch die Novobiocin-Substitution nach JEFFRIES (1959) sind ausreichend wissenschaftlich untersucht worden. PIETZSCH et al. (1975) erzielten bei der Untersuchung von 180 Volleproben im Vergleich mit Selenit-Cystin-Anreicherung die einheitlichsten Resultate mit einer Tetrathionat-Anreicherung nach

Muller Kauffmann bei 43 °C über 48 Stunden. Auch VAN LEUSDEN et al. (1982) empfahlen für eine MKTT-Anreicherung eine 24 bis 48-stündige Anreicherung bei 43 °C. Bei zu niedrigen Bebrütungstemperaturen kann sich ansonsten die Begleitflora zu stark vermehren. In der Untersuchung an 97 Vollei- und Eigelbproben von YDE und GHYSELS (1984) erzielte eine MKTT-Anreicherung bei 43 °C im Vergleich zu SC- und RV-Medium die höchste Nachweisrate von 96 %. MÜLLER et al. (1997) konnten anhand eines Monitorings von 5.000 Umgebungsproben aus dem Bereich der Geflügelproduktion zeigen, dass eine Anreicherung in MKTT (42 °C) eine Sensitivität von 99,1 % im Vergleich zu RV-Bouillon mit einer Sensitivität von nur 74,9 % erzielt. HOORFAR und MORTENSEN (2000) konnten anhand von 183 untersuchten Schweinekotproben belegen, dass eine Anreicherung in MKTTn (41,5 °C) gemäß ISO 6579-Rezeptur im Vergleich zur SC-Bouillon (41,5 °C) die Sensitivität eines 24-stündigen Anreicherungsverfahrens signifikant erhöht.

#### **5.1.4 Verschiedene Methoden zur artifiziiellen Kontamination von Lebensmittelmatrizes**

Die Methode der artifiziiellen Kontamination ist für die Evaluierung von mikrobiologischen Methoden von großer Bedeutung. Häufig liegen nativ kontaminierte Proben nicht in ausreichender Menge vor, um verschiedene Verfahren daran zu überprüfen. So entwickelten die Labore des „National Institute of Public Health“ in Bilthoven in Zusammenarbeit mit der Europäischen Kommission für „Standards, Measurements and Testing Programs“ zur Evaluierung des ISO 6579-Verfahrens Referenzmaterial in Form von Gelatine kapseln mit Milchpulver. Das Milchpulver wurde künstlich mit 5 Kbe *S. Typhimurium* kontaminiert. Der Nachteil der artifiziiellen Kontamination besteht im Allgemeinen jedoch darin, dass Labor-adaptierte Prüfstämme eingesetzt werden. So wurden alternativ subletal geschädigte Stämme in die Matrix eingimpft, um Feldisolate zu imitieren (IN'T VELD et al., 1996).

Das eigene Vorgehen entsprach einer neueren Methodik einer gemeinsamen Studie der kanadischen Untersuchungsämter („Health Protection Branch“, engl.) zur Validierung von *Salmonella*-Schnellnachweismethoden anhand des HPB-Referenzverfahrens (WARBURTON et al., 1994). Die Autoren wählten eine zweimalige Anreicherung des

Prüfstamms in Tryptose-Phosphat-Bouillon, um anschließend die Kultur dekadisch zu verdünnen und mit 0,5 ml der  $10^{-8}$ -Verdünnungsstufe 25 g Probe zu kontaminieren. Der erwartete *Salmonella*-Keimgehalt lag bei unter 1 KbE/g.

In der Literatur werden jedoch zahlreiche Variationen zum methodischen Vorgehen beschrieben. In älteren Studien von EDEL und KAMPELMACHER (1973) wurden 10 g Hackfleisch sowohl mit der hohen Dosis von  $10^9$  KbE einer künstlichen Begleitflora-Kultur als auch mit 0,1 g Milchpulver, welches wiederum einen subletal geschädigten *S. Utrecht*-Stamm enthielt, dotiert. Die Proben wurden drei Tage vor Untersuchungsbeginn vorbereitet und gekühlt gelagert. In neueren Studien wurden vorzugsweise geringe Einmischkonzentrationen pro g Lebensmittel gewählt. FELDSINE und FALBO-NELSON (1995) kontaminierten Proben von Fleischwaren und Meeresfrüchte mit lyophilisierten Stämmen und berechneten die Anzahl der eingemischten Zellen pro Gramm Lebensmittel mittels MPN-Verfahren. RICHTER et al. (2000) kontaminierten 223 Milch- und Weichkäseproben mit zum Teil hitzegeschädigten Prüfstämmen. Es wurden 1 bis 10 und 10 bis 100 KbE/25 g eingemischt. Eine erfolgreiche Hitzeschädigung der Stämme wurde über ein Anwachsen der Kontrollen in BPW sowie einer gleichzeitigen Wachstumshemmung in RVS bestätigt.

#### **5.1.5 Probenahmeverfahren am Geflügelschlachttierkörper: „Broiler Carcass Rinsing“**

Die gängigen Probenahmetechniken für die mikrobielle Untersuchung von Geflügelschlachttierkörpern oder Broilern sind das Abspülen („Carcass Rinsing“, engl.), die Hautexzision und das Tupfer-Verfahren. Das Abspülen wurde in der Literatur in vielen verschiedenen Varianten beschrieben (COX et al., 1981). In älteren Studien beschreiben VAN LEUSDEN et al. (1982) ein Verfahren nach VAN SCHOTHORST et al. (1972), bei dem der aufgetaute Geflügelbroiler im gepufferten Peptonwasser geschüttelt wird. Dabei kann das Auftauwasser wahlweise in die Voranreicherung überführt werden. VASSILIADIS et al. (1984) nutzten für die Untersuchung von Geflügel die Methode des Abspülens in 500 ml BPW. Danach wurde das Geflügel entnommen und die Bouillon bei 37 °C für 18–22 h inkubiert.

Für die eigenen Untersuchungen wurde die Abspülmethode gewählt, weil sie vor allem in neueren Studien als vorteilhaft bewertet wird. So verglichen MCEVOY et al. (2005) die Abspülmethode mit destruktiven Verfahren und Tupfermethode. Dabei erzielte eine modifizierte Abspülmethode eine höhere Nachweisrate als einseitig oder zweiseitig eingesetzte Tupfer. Durch das Abspülen des gesamten Tierkörpers wurde im Gegensatz zum Abtupfern von Teilbezirken die *Salmonella*-Wiederfindungsrate optimiert. JØRGENSEN et al. (2002) verglichen auch die unterschiedlichen Probenahmetechniken am Geflügelschlachttierkörper und erzielten differierende Ergebnisse hinsichtlich der Salmonellen-Nachweisrate. Der Broiler wurde in 310 ml BPW gespült, und davon wurde ein Aliquot von 25 ml zur weiteren Untersuchung entnommen. Dabei erwies sich die Abspülmethode in ihren Untersuchungen als signifikant schlechter wie die Methode der Halshautexzision.

Die eigene Methode entspricht einem neueren Vorgehen nach AHO (1992). Der Autor empfahl bei der Untersuchung von hergerichteten Tierkörpern das Abspülen und Kneten von ganzen Broilern. Der Tierkörper wird in 200 bis 500 ml 1 %-igem BPW gespült und von Hand für 3 Minuten geknetet. Diese Methode imitiert nämlich eine mögliche Kontamination sauberer Oberflächen in Betrieben oder Privathaushalten bei der Verarbeitung oder Zubereitung.

### 5.1.6 Berechnung der Ergebnisse

Die eigene Methode zur Prüfung der sechs verschiedenen selektiven Subkultivierungsmedien ist mit dem neuen Standardverfahren gemäß DIN EN ISO/TS 11133-2:2004 vergleichbar und demnach als ausreichend und aussagekräftig zu bewerten. Die Methode zur „Leistungsprüfung von Nährmedien“ nach DIN EN ISO/TS 11133-2:2004 beschreibt ein quantitatives und ein qualitatives Verfahren zur Erfassung der Produktivität und Spezifität von flüssigen und festen Nährmedien. Für selektive Subkultivierungsmedien wie XLD ist ein rein qualitatives Verfahren vorgesehen.

Gemäß SHERROD et al. (1995) wurde in den eigenen Untersuchungen das Auftreten einer präsumtiv erscheinenden Kolonie als falsch-positive Reaktion gewertet, wenn sie nicht als *Salmonella* spp. bestätigt werden konnte. Als falsch-negative Reaktion wurde

das Fehlen von *Salmonella*-Kolonien auf einem einzelnen Selektivnährboden gewertet, wenn zeitgleich Salmonellen mit einem oder mehreren Selektivnährböden nachgewiesen werden konnten.

Die Berechnung der Sensitivität und Spezifität für die Nährmedien wurde aus der Datenmatrix der Untersuchungen nativer Lebensmittelproben abgeleitet, die zunächst als unabhängige Stichprobe betrachtet wurde. Alle Proben haben die gleiche Wahrscheinlichkeit und werden einmal untersucht. Nach BEUMER et al. (1991) werden dabei die Sensitivität und die Spezifität einer Methode nachteilig von der Zahl der Falsch-Negativen und der Zahl der Falsch-Positiven beeinflusst.

Die Ergebnisse aus den Untersuchungen nativer Lebensmittelproben (n = 286) wurden weiterhin anhand eines verteilungsunabhängigen Tests als nichtparametrische Hypothese überprüft. Auch in aktuellen Arbeiten werden zunehmend Forschungsergebnisse anstatt mit einer deskriptiven Auswertung anhand nichtparametrischer Hypothesen geprüft und aufbereitet. So prüften CHAMPAGNE et al. (2005) eine Nullhypothese mit der Aussage, ob verschiedene Direktanreicherungsverfahren für den Nachweis von Salmonellen aus Schweinekot die gleiche Nachweisrate erbringen.

## **5.2 Diskussion der Ergebnisse**

### **5.2.1 Fehlerhafte Detektion einzelner Serovaren**

In eigenen Untersuchungen wurde anhand von ausgewählten typischen (n = 23), atypischen (n = 4) *Salmonella*-Prüfstämmen sowie Non-*Salmonella*-Prüfstämmen (n = 9) gezeigt, dass die sechs Selektivnährmedien im Mittel eine mäßige bis gute Produktivität aufwiesen und eher als elektiv, weniger als selektiv zu bewerten waren. Hingegen relativierte sich diese Beobachtung bei der Untersuchung nativ kontaminierter Proben (n = 286). So erwiesen sich BPLS und MM als besonders produktive Nährmedien („Salmonellen-Wachstum auf dem 1. und 2. Impfstrich“) im Vergleich zur Produktivität von XLD, XLT4, ASAP und OSCM („Wachstum von 5-10 Kolonien“).

Von den 23 *Salmonella*-Prüfstämmen, die typische kulturelle Merkmale aufwiesen, zeigten einige Stämme (n = 6) ein Wachstum von rauen Kolonien, d. h. von Kolonien in der so genannten R-Form („rough“, engl.). Werden die O-spezifischen Seitenketten an der Oberfläche der Zellwand gramnegativer Bakterien nicht entwickelt, führt dies zu einer veränderten Morphologie, d. h. zu unregelmäßig begrenzten, flachen Kolonien im Gegensatz zu den sonst glatten Kolonien in S („smooth“, engl.)-Form. Anzumerken ist, dass sich serologische und kulturmorphologische Rauformen nicht immer decken. Serologische Rauformen können mit den gegen die Antigen determinanten der Glattform gerichteten, spezifischen Antiseren nicht mehr reagieren (BURKHARDT, 1992). Nur mit dem Miller-Mallinson-Medium gelang nach 24-stündiger Subkultivierung ein zuverlässiger Nachweis charakteristischer Kolonien aller getesteten Prüfstämme (n = 36). Auf den übrigen festen Selektivmedien wurden die Prüfstämme von *S. Senftenberg*, *S. Derby*, *S. Dublin*, *Salmonella arizonae*, *Citrobacter freundii* und *Pseudomonas aeruginosa* hingegen fehlerhaft im Sinne von Falsch-Negativ bzw. Falsch-positiv detektiert. Die uneingeschränkte Einsatzfähigkeit von MM konnte somit in den eigenen Untersuchungen bestätigt werden.

Miller-Mallinson-Medium wurde entwickelt, um sowohl non-typhoide als auch typhoide Salmonellen-Stämme in klinischen und lebensmitteldiagnostischen Proben nachzuweisen (MILLER und MALLINSON, 2000). Der Einsatz von MM-Agar ist insofern von großem diagnostischem Interesse, als dass in der neuen horizontalen Referenzmethode explizit auf die Notwendigkeit eines effizienten Selektivnährmediums verwiesen wird. In der Norm DIN EN ISO 6579:2003 wird unter Punkt 4.4 gefordert, dass ein zweites festes Selektivnährmedium ausgewählt werden sollte, welches insbesondere zur Isolierung von Laktose-positiven Salmonellen einschließlich *Salmonella* Typhi und H<sub>2</sub>S-negativen Paratyphi A-Stämmen geeignet ist.

Kein fester Selektivnährboden ist für den alleinigen Gebrauch idealer Weise geeignet. Daher wird auch in der Literatur empfohlen, immer zwei unterschiedliche Nährmedien einzusetzen, um anhand der unterschiedlichen Nachweissysteme eine mögliche Vielzahl von unterschiedlich empfindlichen Serovaren nachzuweisen (REISSBRODT, 1995; VAN DER ZEE, 2003).

Der Prüfstamm *S. Senftenberg* (DSM 10062) konnte die im MM-Agar enthaltenen organischen Schwefelverbindungen, wie z. B. Cystein, sichtbar zu Schwefelwasserstoff abbauen. Aus anorganischen Schwefelverbindungen, wie z. B. Thiosulfat, welches ausschließlich in XLD und XLT4 enthalten ist, wird hingegen kein Schwefelwasserstoff freigesetzt. Nach MALLINSON et al. (2000) werden solche *Salmonella* spp. als sehr schwache („ultraweak“, engl.) H<sub>2</sub>S-Bildner bezeichnet. *Salmonella* spp., die sowohl aus anorganischen als auch organischen Schwefelverbindungen Schwefelwasserstoff freisetzen, werden je nach Koloniemorphologie als starker („strong“, engl.) oder schwacher („weak“, engl.) H<sub>2</sub>S-Bildner bezeichnet. Der Bakterienstamm *Salmonella* Senftenberg (DSM 10062) wurde bisher auf cysteinhaltigen Nährböden nicht überprüft (persönliche Mitteilung, DR. ELKE LANG, Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, 2002). Die non-typhoiden „weak“ und „ultraweak“ H<sub>2</sub>S-bildenden Stämme lassen sich im nordamerikanischen Raum zunehmend im Bereich der Geflügelfleischproduktion nachweisen (MILLER und MALLINSON, 2000).

Atypische *Salmonella*-Stämme, wie Stämme der Serovaren *S. Indiana* und *S. Senftenberg*, die kein H<sub>2</sub>S bilden, zeigten auch in umfangreichen Untersuchungen von WARBURTON et al. (1994) atypische kulturelle Merkmale auf XLD. In Untersuchungen von GARRICK und SMITH (1994) konnten mit XLD-Agar verschiedene H<sub>2</sub>S-negative Stämme von *S. Bredeney*, *S. Havana*, *S. Senftenberg* und *S. Typhimurium* auch nicht nachgewiesen werden.

ZEWDE (2001) untersuchte 221 Geflügelfleischproben anhand eines 24-stündigen Anreicherungsverfahrens in RV-Medium mit Subkultivierung auf XLD und dem chromogenen Rambach-Agar sowie dem OSCM. Es wurde kein zweites selektives Anreicherungsmedium verwendet. Mit Rambach-Agar konnten 28,95 % positive Proben nachgewiesen werden. Das entsprach einer Sensitivität von 100 % und einer Spezifität von 83,44 %. XLD und OSCM erwiesen sich als spezifischer, jedoch weniger sensitiv im Nachweis von Salmonellen. Dabei wurde das Serovarspektrum dieser Isolate nicht angegeben. Anhand ausgewählter Laborstämme wurden die Wachstumseigenschaften überprüft. *S. Indiana* konnte mit keinem der eingesetzten Nährmedien nachgewiesen werden.

In eigenen Untersuchungen zeigte ein ausgewählter atypischer *S. Dublin*-Stamm kein charakteristisches Wachstum auf ASAP und OSCM. Auch in den Untersuchungen von GRAY et al. (2003) wurde das Wachstum von *S. Dublin*-Prüfstämmen (n = 30) auf ASAP getestet und es konnte gezeigt werden, dass alle *S. Dublin*-Stämme, die unterschiedlicher genetischer Herkunft waren, auf ASAP keine typischen pinkfarbenen Kolonien bildeten. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass die meisten Stämme von *S. Dublin* eine C<sub>8</sub>-Esterase innerhalb von 24 h nicht in ausreichend großer Menge exprimieren können. Einige Stämme zeigten blass-rosafarbene Kolonien erst nach 72-stündiger Inkubation. Nach PEREZ et al. (2003) lässt es sich damit erklären, dass verschiedene Stämme aufgrund ihrer geographischen Herkunft - im Sinne der Erstisolierung - einige Enzyme nicht exprimieren.

In eigenen Untersuchungen zeigte ein ausgewählter Laktose-fermentierender *Salmonella arizonae*-Stamm kein charakteristisches Wachstum auf XLT4 und OSCM. Den Laktose-positiven Stämmen wird in der Literatur eher eine geringe Bedeutung beigemessen. D'AOUST (1981) beschreibt die Inzidenz von Biovarien, die Laktose fermentieren können oder Ureaseaktivität zeigen, zwar als zunehmend. Aber nach REISSBRODT (1995) ist nur mit bis zu 5 % atypischen *Salmonella*-Stämmen in der Diagnostik zu rechnen. Atypische seltene Stämme, die der Subspezies II bis VI angehören, könnten theoretisch in Probenmaterial von Schaf, Pute oder heterothermen Tieren vorkommen. KÜHN et al. (1994) konnten 98,4 % von 1.663 Lebensmittelisolaten, die im Jahr 1992 im nationalen Referenzlabor für Salmonellen untersucht wurden, der Subspezies I zuordnen. Auch wenn demnach sehr selten Stämme der Subspezies II bis VI nachgewiesen werden, müssen falsch-negative Ergebnisse einkalkuliert werden.

Die Spezies *Citrobacter freundii* und *Pseudomonas aeruginosa* führten zu falsch-positiven Ergebnissen auf BPLS, XLD und XLT4. *Citrobacter* spp. sind häufig in der Begleitflora von Hackfleisch enthalten. Die angezüchteten Kolonien lassen sich jedoch durch ihre Konsistenz auf dem MM-Medium von *Salmonella* spp. gut differenzieren. Nach MALLINSON et al. (2000) weisen *Citrobacter* spp. bereits nach 18-stündiger Inkubation häufig eine fadenziehende („stringy“, engl.) Konsistenz auf gegenüber der charakteristischen weichen („buttery“, engl.) Konsistenz von Salmonellen. Der Grund dafür sind das raschere Wachstum und somit schnellere Absterben von *Citrobacter* spp.

auf MM. Anhand von 1.622 nativ und 1.271 artifiziell kontaminierten Lebensmittel- und Umgebungsproben einschließlich der Nachuntersuchungen daraus, konnten auch WARBURTON et al. (1994) zeigen, dass *Citrobacter freundii* zu falsch-positiven Reaktionen auf XLD führt.

### 5.2.2 Ergebnisse aus dem Modellversuch

In eigenen Untersuchungen wurden 92 artifiziell kontaminierte Schweinehackfleischproben getestet. Dabei wurden die methodischen Verfahrensschritte der neuen horizontalen Referenzmethode gemäß DIN EN ISO 6579:2003 mit der alten horizontalen Referenzmethode § 64 LFGB L 00.00-20:1998 (gemäß DIN EN 12824:1998) unter besonderer Berücksichtigung drei neuer chromogener Selektivnährböden verglichen. Sowohl unabhängig von der eingemischten *Salmonella*-Konzentration von 1-10, 11-50 oder 51-200 KbE *S. Typhimurium*/25 g Hackfleisch als auch von den festen Selektivnährmedien, konnten in eigenen Untersuchungen bereits nach 24-stündiger Selektivanreicherung in RVS mit anschließender 24-stündiger Subkultivierung *Salmonella*-Wiederfindungsraten von jeweils 100 % erzielt werden. Eine Verlängerung der Inkubationsdauer um weitere 24 h erhöhte hingegen die *Salmonella*-Wiederfindungsraten von SC-Medium und MKTTn-Medium.

Auch EDEL und KAMPELMACHER (1969) beobachteten, dass bei der Untersuchung artifiziell kontaminierter Hackfleischproben im Gegensatz zu nativ kontaminierten Proben mehr uniforme Ergebnisse erzielt werden. VAN LEUSDEN et al. (1982) haben verschiedene Ursachen für das Auftreten von differierenden Ergebnissen bei der Untersuchung von artifiziell und nativ kontaminierten Proben benannt. Insbesondere die fachliche Kompetenz und die Sorgfalt des Laborpersonals sind entscheidend, weil native Matrices oft nur mit wenigen Salmonellen-Keimen kontaminiert sind.

### 5.2.3 Nachuntersuchung tiefgefrorener Proben

Bei 58 Proben (Hackfleisch  $n = 52$ , Geflügel  $n = 6$ ) der tiefgefrorenen Matrizes ( $n = 80$ ) handelte es sich um eine Nachuntersuchung zwischenzeitlich tiefgefroren gelagerter *Salmonella*-positiver Einzelproben. Die *Salmonella*-Wiederfindungsrate lag bei 34,6 % für nachuntersuchte *Salmonella*-positive Hackfleischproben und bei 33,3 % für nachuntersuchte *Salmonella*-positive Geflügelfleischproben. Auch EDEL und KAMPLEMACHER (1968) berichteten, dass nach Lagerung von Hackfleischproben bei  $-18\text{ °C}$  die Salmonellen-Wiederfindungsrate von 100 auf 30 % verringert wurde. Für die Nachuntersuchung tiefgefrorener Proben erwies sich in eigenen Untersuchungen eine Kombination der Selektivanreicherungen RVS und MKTTn mit den chromogenen Nährmedien als besonders geeignet. So konnten bereits nach verkürzter 24-stündiger Inkubationsdauer Salmonellen erneut nachgewiesen werden. Mit einer Anreicherung in SC-Medium gelang oft gar kein Nachweis von Salmonellen aus tiefgefrorenen Proben.

### 5.2.4 Methodischer Vergleich kultureller Nachweisverfahren von Salmonellen in frischem Fleisch und Innereien

In eigenen Untersuchungen wurden 286 nativ kontaminierte Hackfleisch- und Geflügelfleischproben einschließlich gewürzten Geflügelfleischzubereitungen und Innereien wie Hähnchenleber, -magen und -herzen untersucht. Es wurden aus 39 Hackfleisch- und Geflügelfleischproben Salmonellen isoliert. Verglichen wurden die methodischen Verfahrensschritte der neuen horizontalen Referenzmethode § 64 LFGB L 00.00-20:2004 (gemäß DIN EN ISO 6579:2003 bzw. ISO 6579:2002 bzw. ISO/DIS 6579:2000) mit der alten horizontalen Referenzmethode § 64 LFGB L 00.00-20:1998 (gemäß DIN EN 12824:1998) unter besonderer Berücksichtigung drei neuer chromogener Selektivnährböden. In eigenen Untersuchungen konnte abschließend gezeigt werden, dass die neue Referenzmethode nicht schlechter als die alte Methode ist ( $H_0$ ), also als der alten Referenzmethode gleichwertig erscheint. Die Aussagekraft dieser Hypothese ist jedoch einzuschränken. Statistisch gesehen ist es eine Fehlentscheidung, weil die aufgestellte Nullhypothese unberechtigterweise beibehalten wird – im Sinne eines mathematischen Fehlers 2. Art - und somit die sogenannte

Teststärke oder Trennschärfe („Power“, engl.) des durchgeführten Tests zu gering ist. Nach WALLIS (1980) ist die Power eines Tests definiert als die Wahrscheinlichkeit, die der Nullhypothese  $H_0$  gegenübergestellte richtige Alternativhypothese  $H_A$  als solche zu erkennen.

Dieses Resümee eigener Untersuchungen geht konform mit aktuellen Studien anderer Untersucher. FIELDSINE et al. (2003) verglichen im Rahmen einer Zusammenarbeit von 21 internationalen Laboren das kulturelle AOAC-Verfahren mit dem Protokoll nach ISO 6579:2002. Bei der Untersuchung von Frischkäse, Trockeneiprodukten, Hähnchen- und Geflügelfleisch konnten anhand von unabhängigen Stichproben keine statistisch signifikanten Unterschiede beobachtet werden.

ARROYO und ARROYO (1995) untersuchten 264 Geflügel- und Lamminnereien und erzielten die besten Ergebnisse mit einer Selektivanreicherung in RV bei 42 °C und einer Selektivanreicherung in MKTT bei 37 °C. In einer Selektivanreicherung in SC erwies sich das starke Wachstum der Begleitflora sowohl bei einer Bebrütung von 37 °C als auch 43 °C als störend. Mit MKTT gelang es außerdem das größte Serovar-Spektrum nachzuweisen.

FIELDSINE und FALBO-NELSON (1995) untersuchten 320 nativ und artifiziell kontaminierte Rotfleisch-, Weißfleisch-, Froschschenkel-, Meeresfrüchte- und Tierfutter-Proben mittels einer kulturellen Anreicherung nach BAM-Protokoll und einem Immundiffusionsverfahren nach AOAC-Standard und erzielten dabei eine Übereinstimmung von 96,9 %. Für die Untersuchung der einzelnen Matrices konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Methoden ermittelt werden.

Desweiteren ist anzumerken, dass die bisher in der Literatur beschriebenen Studien zu Vergleichsuntersuchungen von chromogenen Nährmedien mit herkömmlichen Selektivnährböden schwierig zu bewerten sind, weil immer wieder unterschiedliche Referenznährböden, Prüfstämme und Fragestellungen bearbeitet wurden (PEREZ et al., 2003). PIETZSCH et al. (1975) resümierten hingegen, dass bei mittelgradig und stark infiziertem Material die Wahl der Nachweismethode eine weniger wichtige Rolle als bei schwach infizierten Proben spielt. EDEL und KAMPELMACHER (1973) vertraten ferner die Ansicht, dass die personelle Kompetenz im Hinblick auf die Auswertung der festen

Selektivnährmedien recht unterschiedlich sein kann und somit zu deutlich variierenden Ergebnissen führte.

In älteren Studien zum Vergleich der Effizienz unterschiedlicher Referenzverfahren finden sich ausschließlich nur deskriptive Ergebnisse. Ein tatsächlicher methodischer Vergleich anhand einer abhängigen Stichprobe wurde in den hier aufgeführten Untersuchungen nicht abgeleitet.

So untersuchten ATANASSOVA et al. (1998) 2.016 frische und 240 künstlich kontaminierte Geflügelproben mittels einem kulturellen Verfahren gemäß ISO 6579:1993 und § 64 LFGB-Methode in Kombination mit Rambach-Agar. Eine Anreicherung in RVS (42 °C) und TBG (37 °C) erzielte beim Nachweis von Salmonellen ein zu 82,1 % übereinstimmendes Ergebnis. Die meisten Salmonellen konnten bei der Kombination RVS mit RA oder XLD nachgewiesen werden.

D'AOUST et al. (1992a) verglichen die ISO-Protokolle 6579:1981 und 3565:1975 mit dem Standardverfahren nach HPB anhand von 195 nativ kontaminierten Proben, davon überwiegend Fleisch- und Fleischerzeugnisse. In Kombination mit BPLS-Agar wurden im Vergleich zu SC-Bouillon die meisten positiven Proben bereits nach 24-stündiger Inkubation mit MKTT (43 °C) nachgewiesen. Desweiteren bewertete BLOOD (1985) die Beimpfungsverfahren gemäß den ISO-Protokollen 6579:1981 und 3565:1975 als fragwürdig, denn die Empfehlung nach EDEL und KAMPELMACHER (1969) den Oberflächensaum der Selektivanreicherung mit der Öse abzuimpfen, wurde bisher wissenschaftlich nicht belegt. Der Oberflächensaum zwischen Bouillon und Glaswand soll den Autoren zu Folge die besten Wachstumsbedingungen für Salmonellen gewähren. Desweiteren ist das Ein-Ösen- Ausstrichverfahren über zwei feste Nährböden in der Literatur als nicht effizient belegt worden.

### **5.2.5 Eignung flüssiger Anreicherungsmedien**

In eigenen Untersuchungen waren von 286 nativ kontaminierten Hackfleisch- und Geflügelfleischproben insgesamt 39 (13,6 %) mit Salmonellen kontaminiert. Die höchste Nachweisrate gelang mit einer Selektivanreicherung in RVS (97,4 %), gefolgt von MKTTn (94,9 %) und SC (38,5 %). Die uneingeschränkte Einsatzfähigkeit von

RVS und MKTTn zur kulturellen Anreicherung verschiedenener Fleischmatrizes konnte somit in eigenen Untersuchungen demonstriert werden.

Auch VAN DER ZEE (2003) erachtete das RVS-Medium als besonders geeignet für die Untersuchung von Lebensmitteln. So ersetzte die International Organization of Standardization (ISO) in neuerer Zeit im ISO-Nachweisverfahren RV durch RVS und SC durch MKTTn. Ebenso plant die AOAC zukünftig in ihrer Methode SC durch RV zu ersetzen. Selenitbouillons werden hingegen am häufigsten in der Salmonellendiagnostik verwendet und zwar insbesondere für die direkte Anreicherung von klinischen Proben.

Andere Autoren konnten ebenso die Überlegenheit des RVS-Mediums in eigenen Untersuchungen demonstrieren. So konnten JØRGENSEN et al. (2002) bei der Untersuchung von 241 Geflügelproben mit einer RV-Anreicherung mehr Salmonellen nachweisen als mit SC-Bouillon. Insgesamt gesehen erachten die Autoren den Einsatz von zwei Selektivanreicherungen als vorteilhafter.

HAMMACK et al. (2001) beschrieben die Ergebnisse aus einer Studie, an der eine Kooperation von 23 Laboren teilnahm. Die Effizienz von RV (42 °C), TT (35 und 43 °C) und SC (35 °C) sollte anhand von gering artifiziell kontaminierten Eipulver-, Trockenhefe-, Pfeffer-, Gummi- und Milchpulver-Proben untersucht werden. Von 870 Proben konnten insgesamt 269 positive Proben mit SC nachgewiesen werden, 268 mit TT (35 °C), 265 mit TT (43 °C) und 249 mit RV. So empfahlen die Autoren RV Medium in Kombination mit einer TT-Anreicherung (35 °C) einzusetzen. In einer älteren Studie von HAMMACK et al. (1999) wurden RV, SC und TT anhand von artifiziell mit 0,04 bis 0,4 KBE *Salmonella*/g kontaminierten Gewürz-, Milchprodukte- und Ei-Proben verglichen. Die Nachweisraten der drei Selektivanreicherungen zeigten hierbei keinen signifikanten Unterschied. Mit einer bei 35 °C inkubierten TT-Anreicherung konnten die meisten Salmonellen wieder gefunden werden. HAMMACK et al. (1999) empfahlen für die Untersuchung von schwach kontaminierten Lebensmitteln ebenso eine kombinierte Selektivanreicherung aus TT bei 35 °C und RV bei 42 °C.

Auch D'AOUST und MAISHMENT (1997) konnten in Untersuchungen von 165 Lebensmittelproben zeigen, dass ein Wachstum der Begleitflora bei einer Anreicherung

in Selenitbouillon signifikant stärker ausgeprägt war als in einer Tetrathionat-Anreicherung.

In älteren Studien wurden vergleichbare Beobachtungen gemacht. JUNE et al. (1995) überprüften die Effizienz von SC-, TT- und RV-Medium anhand verschiedener Rezepturen und Inkubationsbedingungen mittels nativ und artifiziell kontaminierter Fleischrohware und anderen hochgradig kontaminierten Lebensmitteln. In einem ersten Protokoll wurde die Produktivität der Selektivanreicherungen mittels MPN-Verfahren bestimmt. In einem zweiten Protokoll wurde die Nachweisrate verschiedener Anreicherungsverfahren verglichen. Mit TT-Anreicherung bei 43 °C und RV-Medium bei 42 und 43 °C konnten signifikant mehr Salmonellen aus Froschschenkeln und Salat nachgewiesen werden. Hingegen wurden aus Wurst und Schweinefleisch signifikant weniger Salmonellen mit einer SC-Anreicherung nachgewiesen. Auch bei der Untersuchung von Geflügel erwies sich sowohl die SC-Anreicherung als auch die TT-Anreicherung bei 35 °C als schlechter geeignet. Die Autoren erzielten gegenüber zwei kommerziellen Trockennährböden von Difco und Oxoid insgesamt die besten Ergebnisse mit RV-Medium aus eigener Herstellung, welches bei 42 °C inkubiert wurde.

DAVIES und WRAY (1994) evaluierten SM ID Agar als Subkultivierungsmedium anhand von 500 nativ kontaminierten veterinärmedizinischen Umgebungs- und Tierfutterproben. Unabhängig von dem eingesetzten Subkultivierungsmedium konnten in Kombination mit einer RVS-Anreicherung die meisten positiven Proben nachgewiesen werden. Die Nachweisrate verringerte sich in Kombination mit einer SC-Anreicherung.

Bereits 1987 forderten BECKERS et al. im Rahmen einer Untersuchung der „*Salmonella* Working Group“ der Europäischen Union den Ersatz von MKTT durch RV-Medium. RV-Medium sei einfacher herzustellen und Hand zu haben im Labor, kostengünstiger und wird in einem kleineren Volumen von 10 ml eingesetzt.

PATIL und PARHARD (1986) wiederum stellten fest, dass bei einer Begleitflora, die überwiegend aus *E. coli* und anderen Coliformen Keimen besteht, ein Einsatz der MKTT-Anreicherung bessere Ergebnisse erzielt, wobei der Salmonellennachweis aus

einer von *Proteus* spp. dominierten Begleitflora mit der SC-Anreicherung erfolgreicher war.

Schon 1983 beschrieb VASSILIADIS das RV-Medium als besonders geeignet für die Untersuchung von Fleisch, Fleischerzeugnissen und Abwässern. In verschiedenen Studien konnte die signifikante Überlegenheit von RV-Medium im Gegensatz zu MKT-Medium gezeigt werden. Desweiteren wurde RV mit TT- und SC-Anreicherung anhand von nativ kontaminierten Fleisch- und Tierfutterproben verglichen. Auch hierbei erzielte eine RV-Anreicherung signifikant bessere Ergebnisse.

In einer älteren Studie von RIPABELLI et al. (1997) wurden die Immunomagnetische Separation (IMS) mit einer 24-stündigen kulturellen Anreicherung in RV- und SC-Medium verglichen. Bei der Untersuchung von 137 Proben rohem Fleisch und Fleischerzeugnissen von Huhn und Schwein erzielte SC-Medium insgesamt die höchsten Nachweisraten. Der Vergleich von SC, IMS und RV konnte jedoch statistisch nicht abgesichert werden. Mit RV-Medium konnten einzelne Serovaren nicht nachgewiesen werden.

TONGPIM et al. (1984) schlussfolgerten hingegen, dass der Einsatz von MKTT-Medium gemäß ISO-Rezeptur die Nachweisrate von Salmonellen in Fleisch erhöht. In ihren Untersuchungen wurde jedoch sowohl für RV-Medium als auch für MK-Medium eine gemeinsame Inkubationstemperatur von 43 °C gewählt.

Für die Untersuchung von Hackfleischproben empfahlen EDEL und KAMPELMACHER bereits 1973 eine 18-stündige Voranreicherung in BPW mit nachfolgender Anreicherung in Tetrathionatbouillon nach EDEL und KAMPELMACHER für 48 h bei 43 °C. Die Subkultivierung für 24 und 48 h erfolgte auf BPLS.

### **5.2.6 Eignung fester Subkultivierungsmedien**

In eigenen Untersuchungen von 286 nativ kontaminierten Fleischproben erwies sich eine Kombination mit ASAP als überlegen, weil bereits nach verkürzter Anreicherungszeit eine absolute *Salmonella*- Nachweisrate von 97,4 % erzielt wurde. Im Vergleich zu den herkömmlichen Nährmedien BPLS, XLD und XLT4 gelang mit den neuen chromogenen Nährmedien MM, ASAP und OSCM bereits nach verkürzter

Anreicherungszeit in RVS eine relativ höhere Nachweisrate. Auch andere Autoren können den Einsatz von chromogenen Selektivmedien für die Untersuchung von Fleischproben empfehlen.

MILLER und MALLINSON (2000) erzielten bei der Untersuchung von 86 Proben von Fleisch und Fleischerzeugnissen eine signifikant höhere Sensitivität mit den Selektivnährböden XLT4 und MM im Vergleich zu BS, HE und XLD. Dabei erwies sich MM als vergleichbar spezifisch wie XLT4, jedoch deutlich sensitiver, weil MM-Medium auch atypische und typhoide Salmonellen erfasst.

Im Rahmen eines Forschungsvorhabens zum Vorkommen von Salmonellen bei deutschem Nutzgeflügel und Geflügelfleisch wurde eine Modifikation des Protokolls nach ISO 6579 empfohlen. Um eine hohe Sensitivität zu gewährleisten, wurde eine Selektivanreicherung in TBG-Bouillon und in RV-Medium sowie zur Subkultivierung XLD und Rambach-Agar eingesetzt (WICHMANN-SCHAUER et al., 2000).

In einer älteren Arbeit von SHERROD et al. (1995) konnte hingegen kein deutlicher Vorteil aufgezeigt werden, der einen Ersatz der herkömmlichen Selektivnährböden BS, XLD und HEA gemäß AOAC- und BAM-Empfehlung durch die neuen Nährböden XLT4, Rambach-Agar oder EF-18 sinnvoll erscheinen lässt. Die Autoren untersuchten 440 frische Rohwaren wie Wurst, Geflügelteile, Froschschenkel und artifiziell kontaminierte Shrimps, Austern, Eigelb und Salat.

### **5.2.7 Verlängerung der Anreicherungszeiten um weitere 24 Stunden**

In eigenen Untersuchungen konnte statistisch betrachtet zwischen einer verlängerten und verkürzten Anreicherungszeit kein signifikanter Unterschied gezeigt werden. Hinsichtlich des Einflusses der Inkubationszeit auf den Nachweiserfolg von Salmonellen aus Lebensmittel- und Umgebungsproben bestehen widersprüchliche Ansichten einzelner Autoren.

D'AOUST et al. (1992b) konnten bei einem Vergleich der Produktivität mehrerer Selektivanreicherungen nach 24-stündiger und 48-stündiger Inkubation keinen bedeutenden Anstieg der Salmonellen-Nachweisrate durch eine verlängerte Inkubation um weitere 24 h erreichen. Untersucht wurden 963 Lebensmittelproben mit hohem und

niedrigem  $a_w$ -Wert in TBG-, MKTT-, RV- und SC-Anreicherung bei 43 bzw. 37 °C Inkubationstemperatur. In älteren Studien von HARVEY und PRICE (1981) erhöhte die Verlängerung der Inkubationszeit um weitere 24 Stunden bei Rappaport-Medium die Nachweisrate nur um 4 %. Daher sahen die Autoren eine 24-stündige Anreicherungszeit als ausreichend an. Bereits 1936 beschrieb LEIFSON erstmalig, dass eine Bebrütungsdauer von nur 18 bis 24 h bei 37 °C für Selenit-Milk (M)-Medium ausreichend sei.

Hingegen haben BECKER et al. (2003) eine verkürzte Anreicherungszeit als fragwürdig erachtet, weil in der Literatur oftmals von einer Erhöhung der *Salmonella*-Nachweisrate nach Verlängerung um weitere 24 h berichtet wird. So untersuchten MÜLLER et al. (2000) artifiziell kontaminiertes, gewolfenes Schweinefleisch mittels MSR-V-Medium, § 64 LFGB-Methode und BU-Methode. Die Autoren resümierten, dass die hohe Sensitivität der § 64 LFGB-Methode im Vergleich zur BU-Methode nach Allgemeiner Verwaltungsvorschrift bedingt würde durch eine verlängerte Anreicherungszeit in RVS. Nach älteren Studien von D'AOUST (1981) führte eine Erhöhung der Inkubationstemperatur und eine Verlängerung der Inkubationsdauer um weitere 24 h zu einer Erhöhung der *Salmonella*-Nachweisrate. Auch von VASSILIADIS et al. (1985) wurde resümiert, dass es ein sicheres Verfahren darstellt, wenn bei der Untersuchung von Abwasserproben sowohl für 24 h als auch für weitere 24 h inkubiert wird. PIETZSCH et al. (1975) berichteten, dass durch die zweite Subkultur insbesondere das Isolierungsergebnis künstlich infizierter Proben bei Verwendung der Selenit-Cystin-Anreicherung entscheidend verbessert wurde. In älteren Studien von EDEL und KAMPELMACHER (1969, 1973) zu artifiziell und nativ kontaminierten Hackfleischproben konnte gezeigt werden, dass eine 48-stündige Verlängerung die Salmonellen-Nachweisrate erhöht. Dies traf insbesondere für stark mit Begleitflora kontaminierte Proben zu.

### 5.2.8 Serovar- und Resistenzspektrum der Isolate

In eigenen Untersuchungen konnte ein repräsentatives Serovar- und Resistenzspektrum aus nativen Lebensmittelmatrizes im Laufe eines Jahres isoliert werden. Aus 39 *Salmonella*-positiven Hackfleisch- und Geflügelfleischproben konnten 43 Salmonellen-Stämme isoliert werden, unter denen sich 8 unterschiedliche Serovare und 2 nicht weiter typisierbare Salmonellen-Stämme befanden. Unter den 43 Isolaten dominierte der Serovar *S. Typhimurium* (n = 21) mit den Subtypen DT 104 B low, DT 104 L, DT 012 und RDNC. Die Durchführung einer Resistenzbestimmung gemäß § 64 LFGB L 00.00-20a zeigte, dass sich einzelne Stämme der Serovare *S. Paratyphi B d*-Tartrat-positiv und *S. Saintpaul*, die aus der Matrix „Geflügelfleisch“ isoliert wurden, durch den Besitz multipler Resistenzen auszeichneten. Einzelne Stämme der Serovare *S. Typhimurium* Phagentyp DT 012 und RDNC, die mehrfach aus der Matrix „Rinder- und Schweinehackfleisch“ isoliert werden konnten, zeichneten sich ebenso durch eine Multiresistenz aus.

Nach JØRGENSEN et al. (2002) definiert sich ein Keim als multiresistent, wenn er unempfindlich auf vier oder mehr Antibiotika reagiert. In den Arbeiten von JØRGENSEN et al. (2002) erwiesen sich 46 % der Stämme, die von 241 englischen Geflügelbroilern isoliert wurden, als multiresistent. In England und Wales ist der multiresistente Stamm *S. Typhimurium* DT 104 nach *S. Enteritidis* PT 4 der am zweithäufigsten verbreitete Stamm (MANSFIELD und FORSYTHE, 2000). Die erworbene Resistenz gegen Ciprofloxacin ist dabei zurückzuführen auf die Verfütterung von Enrofloxacin in der Geflügelproduktion. Das zunehmende Auftreten von resistenten Salmonellen ist auch von humanmedizinischer Bedeutung (THRELFALL et al., 1996).

Hingegen konnte in Untersuchungen von BLAU et al. (2005) gezeigt werden, dass in amerikanischen Milchviehherden nur 7,3 % von 3.709 Kotproben mit Salmonellen kontaminiert waren. 12,2 % der *Salmonella*-Isolate waren resistent gegen ein einzelnes Antibiotikum. Nur 4,8 % waren resistent gegen mehr als ein Antibiotikum. Die Unempfindlichkeit gegen Tetracyclin war dabei am häufigsten anzutreffen. Auch in den Niederlanden konnte in den Jahren 1996 bis 2000 die Zunahme von *S. Paratyphi B* Biovar Java-Isolaten aus Geflügelfleisch beobachtet werden. Der prozentuale Anteil von Biovar Java-Isolaten stieg sprunghaft von 2 auf 60 %. Im humanmedizinischen

Bereich wurden nur 0,3 % Biovar Java-Infektionen diagnostiziert. Dennoch ließ sich mittels PFGE-Profil eine genetische Übereinstimmung von 50 % der Klone darstellen (VAN PELT et al., 2003).

Auch DORN et al. (2001) beschreiben das gehäufte Auftreten von Biovar Java-Isolaten aus Schlachtgeflügel, die dem Nationalen Referenzlabor für Salmonellen eingesendet wurden. Dabei bieten lange Produktions- und Verteilungsketten von Geflügelerzeugnissen gute Bedingungen für die Verbreitung von *S. Paratyphi B*. Die biochemische Differenzierung von Tartrat-fermentierenden Stämmen bereitet methodische Schwierigkeiten. Es ist beschrieben worden, dass einige Stämme in Abhängigkeit eines Permease-Mangels die Fähigkeit zur Tartrat-Fermentation verlieren. Andere Stämme exprimieren das Enzym erst nach 48-stündiger Inkubation. Daher entwickelten MALORNY et al. (2003b) eine Multiplex-PCR für den Nachweis der Gene *ttdA* und *ttdB*, um die diagnostische Sensitivität zu erhöhen. Im Rahmen des europäischen Surveillanceprogramms „Enter-net“ wurden die Resistenzspektren von Isolaten, die in 27.000 Fällen im Jahr 2000 diagnostiziert werden konnten, verglichen. 40 % der Stämme wiesen eine einfache Resistenz auf, 18 % der Stämme waren multiresistent. 51 % der multiresistenten Stämme gehörten zum Serovar Typhimurium. 20 % der resistenten Stämme wiesen eine Unempfindlichkeit gegen Ampicillin, Streptomycin, Sulfonamid oder Tetracyclin auf. Eine Ciprofloxacin-Resistenz wurde nur in 0,5 % der Fälle beobachtet und war immer an eine Nalidixinsäureresistenz gekoppelt. Nalidixinsäureresistenzen traten zu 14 % auf (THRELFALL et al., 2003).

In Untersuchungen von BÜLTE et al. (2000) wurden in einem Zeitraum von sechs Jahren (1994 bis 2000) aus insgesamt 528 nativ kontaminierten Geflügelfleischproben Salmonellen nachgewiesen und bis zu 88,9 % der Isolate dem *S. Paratyphi B*-Stamm, überwiegend Biovar Java, zugeordnet. Die Tartrat-positiven Varianten, die früher dem Serovar Java zugeordnet wurden, jedoch nun serologisch zur Paratyphi B-Gruppe gehören, können typhöse Krankheitsverläufe auslösen.

## 6 Schlussfolgerungen

- Statistisch betrachtet konnte zwischen der alten und der neuen Referenzmethode kein signifikanter Unterschied gezeigt werden. Demnach ist die neue Referenzmethode als gleichwertig anzusehen.
- Rappaport-Vassiliadis-Sojamehlpepton-Medium (RVS) ist die am meisten geeignete Selektivanreicherung, um Fleisch und Fleischerzeugnisse auf Salmonellen zu untersuchen.
- Die neuen chromogenen *Salmonella*-Nährmedien AES-Salmonellen-Agar-Platte (ASAP), Miller-Mallinson-Medium (MM) und Oxoid-*Salmonella*-Chromogen-Medium (OSCM) ermöglichen eine sichere und zeitsparende Erfassung von Salmonellen aus Hackfleisch- und Geflügelfleischproben. Ein Einsatz dieser Nährböden als zweites festes Selektivnährmedium bei Untersuchungen nach ISO 6579:2002 ist somit zu empfehlen.
- Nur mit dem MM-Medium gelang der Nachweis charakteristischer *Salmonella*-Kolonien sowohl von den ausgewählten Prüfstämmen der Serovare *S.* Senftenberg, *Salmonella arizonae*, *S.* Dublin als auch von *S.* Derby.

## 7 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit sollte der aktuelle und umstrittene Änderungsentwurf der horizontalen Norm zum Nachweis von Salmonellen aus Lebensmitteln und Futtermitteln ISO/DIS 6579:2000 mit dem noch geltenden Referenzverfahren nach § 64 LFGB kritisch verglichen werden. Gleichzeitig sollten die neuen chromogenen Selektivnährmedien AES-Salmonellen-Agar-Platte (ASAP), Oxoid *Salmonella* Chromogen-Medium (OSCM) und Miller-Mallinson-Agar (MM) hinsichtlich ihrer Effizienz geprüft werden. Von 286 nativen Hackfleisch- und Geflügelfleischproben waren insgesamt 39 (13,6 %) mit Salmonellen kontaminiert. Die höchste Nachweisrate gelang mit einer Selektivanreicherung in RVS (97,4 %), gefolgt von MKTTn (94,9 %) und SC (38,5 %). Im Vergleich zu den herkömmlichen Nährmedien BPLS, XLD und XLT4 gelang mit den neuen chromogenen Nährmedien MM, ASAP und OSCM bereits nach verkürzter Anreicherungszeit in RVS eine höhere Nachweisrate. Statistisch betrachtet konnte zwischen der alten und der neuen Referenzmethode kein signifikanter Unterschied gezeigt werden. Demnach ist die neue Referenzmethode als gleichwertig anzusehen. Sowohl unabhängig von der eingemischten *Salmonella*-Konzentration von 1-10, 11-50 oder 51-200 KbE *S. Typhimurium*/25 g Hackfleisch als auch von den im Versuch eingesetzten festen Selektivnährmedien, konnte bereits nach 24-stündiger Selektivanreicherung in RVS mit 24-stündiger Subkultivierung die höchste *Salmonella*-Wiederfindungsrate von jeweils 100 % erzielt werden. Nur mit dem MM-Medium gelang der Nachweis charakteristischer *Salmonella*-Kolonien sowohl von den ausgewählten Prüfstämmen der Serovare *S. Senftenberg*, *Salmonella arizonae*, *S. Dublin* als auch von *S. Derby*. Drei Non-*Salmonella*-Prüfstämme führten zu falsch-positiven Ergebnissen auf BPLS, XLD und XLT4. In eigenen Untersuchungen konnte ein repräsentatives Serovar- und Resistenzspektrum aus nativen Lebensmittelmatrizes im Laufe eines Jahres isoliert werden. Aus 39 *Salmonella*-positiven Hackfleisch- und Geflügelfleischproben konnten 43 Salmonellen-Stämme isoliert werden. Es dominierte der Serovar *S. Typhimurium* (n = 21) mit den Subtypen DT 104 B low, DT 104 L, DT 012 und RDNC. Einzelne Stämme der Serovare *S. Paratyphi B d-Tartrat-positiv* und *S. Saintpaul*, die aus der Matrix „Geflügelfleisch“ isoliert wurden, waren multiresistent.

## 8 Summary

In this study the disputed draft ISO/DIS 6579:2000 of the horizontal method for the detection of *Salmonella* from human food and animal feed was compared critically with the standard method according to § 64 LFGB. The efficiency of three new chromogenic plating media, AES *Salmonella* Agar plate (ASAP), Oxoid *Salmonella* Chromogen Medium (OSCM) and Miller Mallinson Medium (MM) was also tested. About 39 (13,6 %) of 286 naturally contaminated samples of minced meat and fresh poultry were *Salmonella* spp. positive. RVS broth yielded the highest recovery of *Salmonella* spp. and was superior (97,4 %) to MKTTn broth (94,9 %) and SC broth (38,5 %). After inoculating for 24 hours only in RVS broth the new chromogenic plating media MM, ASAP and OSCM produced the best results compared with BPLS, XLD and XLT4. No significant difference was obtained by comparing the ISO/DIS 6579:2000 draft to the conventional cultural method. Therefore, the draft is no less effective than the conventional method. A 24-hours-enrichment in RVS broth yielded a *Salmonella* recovery of 100 % from artificially contaminated minced meat (1-10 cfu/11-50 cfu/51-200 cfu *S. Typhimurium* into 25 g). Only MM could detect atypical *Salmonella* test strains of *S. Senftenberg*, *Salmonella arizonae*, *S. Dublin* and *S. Derby*. BPLS, XLD and XLT4 failure to detect three non-*Salmonella* test strains. In own investigations a representative spectrum of common serotypes and antimicrobial drug resistance was isolated from food samples during the course of one year. From 39 naturally contaminated minced meat and fresh poultry samples 43 *Salmonella* strains could be isolated. *S. Typhimurium* (n = 21) with the subtypes DT 104B low, DT 104 L, DT 012 and RDNC prevailed. Strains of serotype d-tartrate-positive *Salmonella* Paratyphi B and *Salmonella* Saintpaul which could be isolated from fresh poultry, were multiresistant.

## 9 Anhang

**Table 9-1:** Reisolierung (n [%]) von Salmonellen aus artifiziell kontaminierten Hackfleischproben (n = 92) in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer und der Nährmedien: Ausgangsinokulum (n = 25) von 1-10 KbE S. Typhimurium/25 g Hackfleisch

Inku- baion	BPLS		XLD		XLT4		IMM		ASAP		OSCM		
	RVS	MKTTn	SC	RVS	SC	RVS	SC	RVS	SC	RVS	SC	RVS	SC
24h/24h	6 (24,0)	25 (100)	7 (28,0)	25 (100)	8 (32,0)	25 (100)	12 (48,0)	25 (100)	7 (28,0)	25 (100)	10 (40,0)	25 (100)	20 (80,0)
24h/48h	0	-	1 (32,0)	-	4 (48,0)	-	3 (60,0)	-	1 (32,0)	-	2 (48,0)	-	0
48h/24h	0	-	5 (48,0)	-	0 (80,0)	-	4 (96,0)	-	2 (40,0)	-	1 (96,0)	-	1 (84,0)
48h/48h	4 (40,0)	-	0	-	2 (56,0)	-	0	-	5 (60,0)	-	1 (56,0)	-	0

**Legende:** siehe unten

**Tabelle 9-2:** Reisolierung (n [%]) von Salmonellen aus artifiziell kontaminierten Hackfleischproben (n = 92) in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer und der Nährmedien: Ausgangsinokulum (n = 41) von 11-50 KbE S. Typhimurium/25 g Hackfleisch

Inkubation	BPLS		XLD		XLT4		Nährmedien MM				ASAP		OSCM					
	SC	RVS	MKTIn	SC	RVS	MKTIn	SC	RVS	MKTIn	SC	RVS	MKTIn	SC	RVS	MKTIn			
24h/24h	5	41	24	6	41	39	10	41	34	12	41	38	9	41	36	10	41	41
24h/48h	(12,0)	(100)	(58,5)	(14,6)	(100)	(95,0)	(24,4)	(100)	(82,9)	(29,3)	(100)	(92,7)	(22,0)	(100)	(87,8)	(24,4)	(100)	(100)
	0	-	1	0	-	0	1	-	4	7	-	1	3	-	2	2	-	-
48h/24h	2	-	4	2	-	1	1	-	0	1	-	0	2	-	0	4	-	-
	(61,0)		(61,0)	(19,5)		(97,6)	(26,8)		(92,7)	(46,3)		(95,1)	(29,3)		(92,7)	(29,3)		
48h/48h	4	-	0	1	-	0	4	-	0	1	-	0	0	-	0	2	-	-
	(17,0)		(70,7)	(19,5)		(97,6)	(29,3)		(48,8)			(34,2)	(39,0)		(39,0)	(39,0)		
	(51,0)		(22,0)			(39,0)			(51,2)			(43,9)						

**Legende:** siehe unten

**Table 9-3:** Reisolierung (n [%]) von Salmonellen aus artifiziell kontaminierten Hackfleischproben (n = 92) in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer und der Nährmedien: Ausgangsinokulum (n = 26) von 51-200 KbE S. Typhimurium/25 g Hackfleisch

Inkubation	BPLS		XLD		XLT4		Nährmedien MM				ASAP		OSCM		
	SC	RVS	MKTn	SC	RVS	MKTn	SC	RVS	MKTn	SC	RVS	MKTn	SC	RVS	MKTn
24h/24h	9	26	23	8	26	11	26	16	26	26	10	26	9	26	26
24h/48h	(34,6) 0	(100) -	(88,5) 0	(30,8) 3	(100) -	(42,3) 2	(100) -	(61,5) 1	(100) -	(100) -	(38,5) 2	(100) -	(34,6) 3	(100) -	(100) -
48h/24h	2	-	2	(42,3) 1	-	(50,0) 4	-	(88,5) 3	(65,4) 4	-	(46,2) 3	-	(46,2) 4	-	-
48h/48h	(42,3) 5	-	(96,2) 0	(46,2) 1	-	(65,4) 1	-	(100) -	(80,8) 1	-	(57,7) 1	-	(61,5) 1	-	-
	(61,5)			(50,0)		(69,2)		(84,6)			(61,5)		(65,4)		

**Legende:** siehe unten

**Legende zu Tabelle 9-1, Tabelle 9-2, Tabelle 9-3:**

24h/24h	24-stündige flüssige Selektivanreicherung und 24-stündige Subkultivierung auf festen Selektivnährböden
24h/48h	24-stündige flüssige Selektivanreicherung und 48-stündige Subkultivierung auf festen Selektivnährböden
48h/24h	48-stündige flüssige Selektivanreicherung und 24-stündige Subkultivierung auf festen Selektivnährböden
48h/48h	48-stündige flüssige Selektivanreicherung und 48-stündige Subkultivierung auf festen Selektivnährböden

**Tabelle 9-4:** Nachweishäufigkeit (n) von Salmonellen aus 39 nativ kontaminierten Hackfleisch- und Geflügelfleischproben in Abhängigkeit von Kultivierungsdauer und -nährmedium

Subkultivierung 24 und 48 h	Selektivanreicherung					
	SC		MKTTn		RVS	
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
<b>BPLS</b>	9	3	23	5	32	3
<b>XLD</b>	7	2	31	2	35	2
<b>XLT4</b>	9	6	35	2	35	3
<b>MM</b>	12	2	35	1	37	1
<b>ASAP</b>	8	4	36	0	38	0
<b>OSCM</b>	7	5	33	1	36	1

## 10 Literaturverzeichnis

AAMLID, K. H., G. LEE, R. G. PRICE, A. C. RICHARDSON, B. V. SMITH und S. A. TAYLOR (1989): Development of improved chromogenic substrates for the detection and assay of hydrolytic enzymes. *Chem. Ind.* 20, 106-108

ACKERMANN, H. (1998): *BiAs. Biometrische Analyse von Stichproben. Version 7.0*  
Hochheim-Darmstadt : Epsilon-Verlag

AHO, M. (1992): Problems of *Salmonella* Sampling. *Int. J. Food Microbiol.* 15, 225-235

ALPERS, K. und A. JANSEN (2004): Infektionen mit Salmonellen beim Menschen. in: M. HARTUNG (Hrsg.) *Epidemiologische Situation der Zoonosen in Deutschland im Jahr 2003*, Berlin : BfR Wissenschaft, 15-18

ANDREWS, W. (1992): *Manual of food quality control 4. Rev. 1. Microbiological analysis*, 14/4 Rev. 1, Rome : Food and Agriculture Organization of the United Nations

ANONYMUS (1997a): Zwei Salmonellose-Ausbrüche durch *S. Typhimurium* in benachbarten Landkreisen Thüringens. *Epid. Bull.* 24, 162-163

ANONYMUS (1997b): Salmonellose: 90 Erkrankungen nach Verzehr von Speiseeis. *Epid. Bull.* 38, 261

ANONYMUS (1998a): Salmonellose-Ausbruch nach Eisverzehr. *Epid. Bull.* 31, 221

ANONYMUS (1998b): Gruppenerkrankung verursacht durch *Salmonella* Enteritidis. *Epid. Bull.* 4, 20

ANONYMUS (1998c): *Salmonella*-Bareilly-Infektionen durch Hartkäse. *Epid. Bull.* 44, 309-311

ANONYMUS (2000a): Reptilien als Haustiere: Gefahr der *Salmonella*-Infektion. *Epid. Bull.* 21, 169

- ANONYMUS (2000b): Salmonellose-Geschehen in einem Jugendlager nach Verzehr von Tiramisu. *Epid. Bull.* 36, 290
- ANONYMUS (2002a): Überregionaler Ausbruch von *Salmonella* Goldcoast im Mai 2001. *Epid. Bull.* 18, 148-150
- ANONYMUS (2002b): *Salmonella* Oranienburg in Schokolade: Internationaler Ausbruch von Oktober bis Dezember 2001. *Epid. Bull.* 3, 17-20
- ANONYMUS (2003a): Infektionsgeschehen von besonderer Bedeutung: Salmonellose. *Epid. Bull.* 33, 268
- ANONYMUS (2003b): Hinweis auf das gehäufte Auftreten von *Salmonella*-Agona-Infektionen bei Kleinkindern. *Epid. Bull.* 29, 224
- ANONYMUS (2004a): Erkrankungshäufung durch *Salmonella* Brandenburg ausgehend von einem Ferienhotel. *Epid. Bull.* 45, 383-386
- ANONYMUS (2004b): Zu einem überregionalen Ausbruch von *Salmonella*-Give-Infektionen im Jahr 2004. *Epid. Bull.* 45, 386-388
- ANONYMUS (2004c): Zu einer Häufung von *Salmonella* Enteritidis mit erfolgreichem Nachweis des Erregers im Lebensmittel. *Epid. Bull.* 30, 149-151
- ANONYMUS (2005): The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Antimicrobial Resistance in the European Union in 2004, 21 December 2005. *The EFSA Journal*, 310
- ANONYMUS (2006a): Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on “Risk assessment and mitigation options of *Salmonella* in pig production”. *The EFSA Journal* 341, 1-131
- ANONYMUS (2006b): Aktuelle Statistik meldepflichtiger Infektionskrankheiten. *Epid. Bull.* 13, 100
- ANONYMUS (2006c): Annex III of the Opinion on “Risk assessment and mitigation options of *Salmonella* in pig production”. *The EFSA Journal*, 341

- ARROYO, G. und J. A. ARROYO (1995): Efficiency of different enrichment and isolation procedures for the detection of *Salmonella* serotypes in edible offal. J. Appl. Bacteriol. 79, 360-367
- ATANASSOVA, V., J. ALTEMEIER, K.-P. KRUSE und B. DOLZINSKI (1998): Nachweis von *Salmonella* und *Campylobacter* aus frischem Geflügelfleisch. Fleischwirtsch. 78, 364-365
- BARTH, S. und R. BAUERFEIND (2005): Virulence plasmids of *Salmonella enterica* – incidence and properties. Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. 118, 8-23
- BAUMGART, J. (1997): Morphologische und kulturelle Eigenschaften von Mikroorganismen. In: BAUMGART, J. (Hrsg.) *Mikrobiologische Untersuchung von Lebensmitteln* 3. Ergänzungslieferung, Hamburg : Behr's Verlag, 1-2
- BAUMGART, J. (2002): Fleisch und Fleischerzeugnisse. In: BAUMGART, J. (Hrsg.) *Mikrobiologische Untersuchung von Lebensmitteln* 18. Aktualisierungslieferung, Hamburg : Behr's Verlag, 1-29
- BAYLIS, C. L., S. MACPHEE und R. P. BETTS (2000): Comparison of two commercial preparations of buffered peptone water for the recovery and growth of *Salmonella* bacteria from foods. J. Appl. Microbiol. 89, 501-510
- BECKER, H., F. BIS und G. TERPLAN (1993): Kultureller Nachweis von Salmonellen in Rohmilch. Teil 1: Literaturübersicht. Arch. Lebensmittelhyg. 44, 138-143
- BECKER, H. und E. MÄRTLBAUER (2002): Revision des horizontalen Nachweisverfahrens für Salmonellen ISO 6579. Hyg. Rep. 3, 15-17
- BECKER, H., S. EBERHARDT und E. MÄRTLBAUER (2003): Comparative Studies on the Detection of *Salmonellae* in Milk and Milk Products Using a Horizontal (ISO 6785:2002) and a Vertical (ISO 6785/IDF 93:2001) International Standard. Arch. Lebensmittelhyg. 54, 118-121
- BECKERS, H. J., D. ROBERTS, O. PIETZSCH, M. VAN SCHOTHORST, P. VASSILIADIS und E. H. KAMPELMACHER (1987): Replacement of Muller-Kauffmann's tetrathionate brilliant green bile broth by Rappaport-Vassiliadis' magnesium chloride malachite

- green broth in the standard method for the detection of *salmonellae*. Int. J. Food Microbiol. 4, 59-64
- BERGHOLD, C., C. KORNSCHÖBER und S. WEBER (2003): A regional outbreak of *S. Enteritidis* phage type 5, traced back to the flocks of an egg producer, Austria. Euro Surveill. 8, 195-198
- BEUMER, R. R. , E. BRINKMAN und F. M. ROMBOUTS (1991): Enzyme-linked immunoassays for the detection of *Salmonella* spp.: a comparison with other methods. Int. J. Food Microbiol. 12, 363-374
- BLACKBURN, C. DE W. (1993): Rapid and alternative methods for the detection of *salmonellas* in foods. J. Appl. Bacteriol. 75, 199-214
- BLAU , D. M., B. J. MC CLUSKEY, S. R. LADELY, D. A. DARGATZ, P. J. FEDORKA-CRAY, K. E. FERRIS und M. L. HEADRICK (2005): *Salmonella* in Dairy Operations in the United States: Prevalence and Antimicrobial Drug Susceptibility. J. Food Protect. 68, 696-702
- BLOOD, R. M. (1985): Techniques for the isolation of *salmonellae* and the quality control of enrichment and selective media. Int. J. Food Microbiol. 2, 33-39
- BRENNER, D. J.(1984): Enterobacteriaceae. In: KRIEG, N. R. und J. G. HOLT (Hrsg.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume 1* Baltimore : Williams & Wilkins, 408-420
- BUCHHOLZ, U., B. BRODHUN, S. O. BROCKMANN, C. M. DREWECK, R. PRAGER, H. TSCHÄPE und A. AMMON (2005): An Outbreak of *Salmonella* München in Germany Associated with Raw Pork Meat. Int. Food Protect. 68, 273-276
- BÜLTE, M. und P. JAKOB (1995): The use of a PCR-generated *invA* probe for the detection of *Salmonella* spp. in artificially and naturally contaminated foods. Int. J. Food Microbiol. 26, 335-344
- BÜLTE, M., S. MASSING, P. HATTENDORF, C. DORN und R. HELMUTH (2000): Gehäufte Nachweis von *Salmonella* Paratyphi B bei Geflügelfleisch. Hyg. Mikrobiol. 4, 23

- BURGESS, F., C. L. LITTLE, G. ALLEN, K. WILLIAMSON und R. T. MITCHELL (2005): Prevalence of *Campylobacter*, *Salmonella*, and *Escherichia coli* on the External Packaging or Raw Meat. *Int. Food Protect.* 68, 469-475
- BURKHARDT, F. (1992): *Mikrobiologische Diagnostik* 1. Auflage, Stuttgart : Thieme-Verlag
- BUSSE, M. (1995): Media for *salmonella*. *Int. J. Food Microbiol.* 26, 117-131
- CHAMPAGNE, M.-J., A. RAVEL und D. DAIGNAULT (2005): A Comparison of Sample Weight and Culture Methods for the Detection of *Salmonella* in Pig Feces. *J. Food Microbiol.* 68, 1073-1076
- COOKE, V. M., R. J. MILES, R. G. PRICE und A. C. RICHARDSON (1999): A Novel Chromogenic Ester Agar Medium for Detection of *Salmonellae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 807-812
- COX, N. A., J. E. THOMSON und J. S. BAILEY (1981): Sampling of broiler carcasses for *Salmonella* with low volume water rinse. *Poult. Sci.* 60, 768-770
- COX, J. M. (1993): Lysine-Mannitol-Glycerol Agar, a Medium for the Isolation of *Salmonella* spp., Including *S. typhi* and Atypical Strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 2602-2606
- DAVIES, R. H. und C. WRAY (1994): Evaluation of SMID agar for identification of *salmonella* in naturally contaminated veterinary samples. *Lett. Appl. Microbiol.* 18, 15-17
- D'AOUST, J. Y. (1981): Update on Preenrichment and Selevtive Enrichment Conditions for Detection of *Salmonella* in Foods. *J. Food Protect.* 44, 369-374
- D'AOUST, J. Y. und C. MAISHMENT (1979): Preenrichment Conditions for Effective Recovery of *Salmonella* in Foods and Feed Ingredients. *J. Food Protect.* 42, 153-157
- D'AOUST, J. Y., A. M. SEWELL und D. W. WARBURTON (1992a): A comparison of standard cultural methods for the detection of foodborne *Salmonella*. *Int. J. Food Microbiol.* 16, 41-50

- D'AOUST, J. Y., A. M. SEWELL und A. JEAN (1992b): Efficiency of prolonged (48 h) selective enrichment for the detection of foodborne *Salmonella*. *Int J. Food Microbiol.* 15, 121-130
- DORN, C., A. SCHROETER, A. MIKO, D. PROTZ und R. HELMUTH (2001): Gehäufte Einsendungen von *Salmonella* Paratyphi B-Isolaten aus Schlachtgeflügel an das Nationale Referenzlabor für Salmonellen. *Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr.* 114, 179-183
- DUSCH, H. und M. ALTWEGG (1993): Comparison of Rambach Agar, SMI-ID Medium, and Hektoen Enteric Agar for Primary Isolation of Non-Typhi *Salmonellae* from Stool Samples. *J. Clin. Microbiol.* 31, 410-412
- DUSCH, H. und M. ALTWEGG (1995): Evaluation of Five New Plating Media for Isolation of *Salmonella* Species. *J. Clin. Microbiol.* 33, 802-804
- EDEL, W. und E. H. KAMPELMACHER (1968): Comparative Studies on *Salmonella*-Isolation in Eight European Laboratories. *Bull. Wld. Hlth. Org.* 39, 487-491
- EDEL, W. und E. H. KAMPELMACHER (1969): *Salmonella* isolation in Nine European Laboratories Using a Standardized Technique. *Bull. Wld. Hlth. Org.* 41, 297-306
- EDEL, W. und E. H. KAMPELMACHER (1973): Comparative studies on the isolation of "sublethally injured" *salmonellae* in nine European laboratories. *Bull. Wld. Hlth. Org.* 48, 167-174
- EIGNER, U., R. REISSBRODT, R. HAMANN und A.-M. FAHR (2001): Evaluation of a New Chromogenic Medium for the Isolation and Presumptive Identification of *Salmonella* Species from Stool Specimens. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 20, 558-565
- ELLERBROEK, L., H. WICHMANN-SCHAUER, M. HAARMANN, F. DELBECK, R. FRIES, R. HELMUTH, G. MARTIN und I. NICKOLAI (2001): Vorkommen von Salmonellen bei deutschem Nutzgeflügel und Geflügelfleisch. *Fleischwirtsch.* 81, 205-208
- FEHLHABER, K. und T. ALTER (1999): Mikrobielle Folgen prämortaler Belastungen bei Schlachtschweinen. *Fleischwirtsch.* 79, 86-90

- FELDSINE, P. T. und M. T. FALBO-NELSON (1995): Comparison of modified immunodiffusion and Bacteriological Analytical Manual (BAM) methods for the detection of *Salmonella* in raw flesh and highly contaminated food types. J. AOAC Int. 78, 993-997
- FELDSINE, P. T., A. H. LIENAU, S. C. LEUNG, L. A. MUI, F. HUMBERT, M. BOHNERT, K. MOOIJMAN, S. SCHULTEN, P. IN'T VELD, P. ROLLIER, R. LEUSCHNER und K. CAPPS (2003): Detection of *Salmonella* in Fresh Cheese, Poultry Products, and Dried Egg Products by the ISO 6579 *Salmonella* culture procedure and the AOAC Official Method: Collaborative study. J. AOAC Int. 86, 275-295
- FOCK, R. (1995): Vorwort. In: KÜHN, H. und H. TSCHÄPE (Hrsg.) *Salmonellosen des Menschen* RKI-Schriften 3/1995, München : Medizin-Verlag, 4
- FREYDIERE, A.-M. und Y. GILLE (1991): Detection of *Salmonellae* by Using Rambach Agar and by a C8 Esterase Spot Test. J. Clin. Microbiol. 29, 2357-2359
- GÄRTNER, E. (1888): Über die Fleischvergiftung in Frankenhäusern a. Kyffh. und der Erreger derselben. Korrespondenzblatt des Allgemeinen ärztlichen Vereins von Thüringen 17, 573-600
- GAILLOT, O., P. DI CAMILLO, P. BERCHE, R. COURCOL und C. SAVAGE (1999): Comparison of CHROMagar *Salmonella* Medium and Hektoen Enteric Agar for Isolation of *Salmonellae* from Stool Samples. J. Clin. Microbiol. 37, 762-765
- GARRICK, R. C. und A. D. SMITH (1994): Evaluation of Rambach agar for the differentiation of *Salmonella* species from other Enterobacteriaceae. Lett. Appl. Microbiol. 18, 187-189
- GRAY, S., J. GLANCY, C. O'HARE, G. DORAN und M. CORMICAN (2003): Failure To Detect *Salmonella enterica* Serovar Dublin on Aes Laboratoire *Salmonella* Agar Plate. J. Clin. Microbiol. 41, 4003
- HAEGHEBAERT, S., P. SULEM, L. DEROUDEVILLE, E. VANNERROY-ADENOT, O. BAGNIS, P. BOUVET, F. GRIMONT, A. BRISABOIS, F. LE QUERREC, C. HERVY, E. ESPIÉ, H. DE VALK und V. VAILLANT (2003): Two outbreaks of *Salmonella* Enteritidis phage type 8

linked to the consumption of Cantal cheese made with raw milk, France 2001. Euro Surveill. 8, 151-156

HALLMANN, L. (1953): *Bakteriologische Nährböden* 1. Auflage, Stuttgart : Thieme-Verlag

HAMMACK, T. S., R. M. AMAGUANA, G. A. JUNE, P. S. SHERROD und W. H. ANDREWS (1999): Relative Effectiveness of Selenite Cystine Broth, Tetrathionate Broth, and Rappaport-Vassiliadis Medium for the Recovery of *Salmonella* spp. from Foods with a Low Microbial Load. J. AOAC Int. 62, 16-21

HAMMACK, T. S., R. M. AMAGUANA und W. H. ANDREWS (2001): Rappaport-Vassiliadis Medium for Recovery of *Salmonella* spp. from Low Microbial Load Foods: Collaborative Study. J. AOAC Int. 84, 65-83

HARTUNG, M. (2004): Mitteilungen der Länder über *Salmonella*-Nachweise in Deutschland. In: HARTUNG, M. (Hrsg.) *Epidemiologische Situation der Zoonosen in Deutschland im Jahr 2003* Berlin : BfR-Wissenschaft, 21-39

HARTUNG, M. (2006): Ergebnisse der Zoonoseerhebung 2004 bei Lebensmitteln. Fleischwirtsch. 86, 155-161

HARVEY, R. W. S. und T. H. PRICE (1981): Comparison of selenite F, Muller-Kauffmann tetrathionate and Rappaport's medium for *salmonella* isolation from chicken giblets after pre-enrichment in buffered peptone water. J. Hyg. Camb. 87, 219-224

HENSEL, M. (2001): Pathogenitätsinseln in *Salmonella enterica*. Hyg. Mikrobiol. 1, 17-20

HOORFAR, J. und A. V. MORTENSEN (2000): Improved culture methods for isolation of *Salmonella* organisms from swine feces. AJVR 61, 1426-1429

HUMPHREY, T. (2001): *Salmonella* Typhimurium definitive type 104. A multi-resistant *Salmonella*. Int. J. Food. Microbiol. 67, 173-186

- IN'T VELD, P. H., N. G. VAN STRIJP-LOCKEFEEER, A. H. HAVELAAR und E. A. MAIER (1996): The certification of a reference material for the evaluation of the ISO method for the detection of *Salmonella*. J. Appl. Bacteriol. 80, 496-504
- JEFFRIES, L. (1959): Novobiocin-tetrathionate broth: a medium of improved selectivity for the isolation of *salmonellae* from faeces. J. Clin. Pathol. 12, 568-571
- JØRGENSEN, F., R. BAILEY, S. WILLIAMS, P. HENDERSON, D. R. A. WAREING, F. J. BOLTON, J. A. FROST, L. WARD und T. J. HUMPHREY (2002): Prevalence and numbers of *Salmonella* and *Campylobacter* spp. on raw, whole chickens in relation to sampling methods. Int. J. Food Microbiol. 76, 151-164
- JUDICIAL COMMISSION OF THE INTERNATIONAL COMMITTEE ON SYSTEMATICS OF PROKARYOTES (2005): The type species of the genus *Salmonella* Lignieres 1900 is *Salmonella enterica* (ex Kauffmann and Edwards 1952) Le Minor and Popoff 1987, with the type strain LT2 T, and conservation of the epithet *enterica* in *Salmonella enterica* over all earlier epithets that may be applied to this species. Opinion 80. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 55, 519-520
- JUNE, G. A., P. S. SHERROD, T. S. HAMMACK, R. M. AMAGUANA und W. H. ANDREWS (1995): Relative Effectiveness of Selenite Cystine Broth, Tetrathionate Broth, and Rappaport-Vassiliadis Medium for the Recovery of *Salmonella* from Raw Flesh and Other Highly Contaminated Foods: Precollaborative Study. J. AOAC Int. 78, 375-380
- KAUFFMANN, F. (1935): Weitere Erfahrungen mit dem kombinierten Anreicherungsverfahren für Salmonellabacillen. Ztschr. Hyg. 117, 26-32
- KAUFFMANN, F. und P. R. EDWARDS (1952): Classification and nomenclature of Enterobacteriaceae. Int. Bull. Bacteriol. Nomencl. Taxon. 2, 2-8
- KAYSER, F. H. (1998): Allgemeine Aspekte der medizinischen Mikrobiologie. In: F. H. KAYSER, K. A. BIENZ, J. ECKERT und R. M. ZINKERNAGEL (Hrsg.) *Medizinische Mikrobiologie* Stuttgart : Thieme, 29

- KRUG, W. und N. REHM (1983): *Nutzen-Kosten-Analyse der Salmonellenbekämpfung* Band 131, Schriftenreihe des Bundesministeriums für Jugend, Familie und Gesundheit, Stuttgart : Kohlhammer-Verlag
- KÜHN, H., B. WONDE, W. RABSCH und R. REISSBRODT (1994): Evaluation of Rambach Agar for Detection of *Salmonella* Subspecies I to VI. *Appl Environ. Microbiol.* 60, 749-751
- KÜHN, H. (1995): Vorkommen und epidemische Verbreitung. In: KÜHN, H. und H. TSCHÄPE (Hrsg.) *Salmonellosen des Menschen* RKI-Schriften 3/1995, München : Medizin-Verlag, 19-35
- LANG, N. L., A. MARI und J. A. M. LEES-SMITH (2001): An Evaluation of five Media for the Isolation and presumptive Identification of *Salmonella* from Foods. Oxoid Ltd., Basingstoke, UK
- LEIFSON, E. (1936): New selenite enrichment media for the isolation of typhoid and paratyphoid (*Salmonella*) bacilli. *Amer. J. Hyg.* 24, 423-432
- LE MINOR, L. (1984): Genus III. *Salmonella Lignières 1900, 389<sup>AL</sup>*. In: KRIEG, N. R. und J. G. HOLT (Hrsg.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume 1* Baltimore : Williams & Wilkins, 427-458
- LE MINOR, L. und M. Y. POPOFF (1987): Request for an opinion. Designation of *Salmonella enterica* sp. nov., nom. Rev., as the type and only species of the genus *Salmonella*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37, 465-468
- LIESEGANG, A., R. PRAGER, W. STRECKEL, W. RABSCH, B. GERICKE, G. SELTMANN, R. HELMUTH und H. TSCHÄPE (1997): Wird der *Salmonella-enterica*-Stamm DT 104 des Serovars Typhimurium der neue Epidemietyp in Deutschland? *Inf. ep. Forschung* I/97, 6-10
- LÖFFLER, F. (1892): Über Epidemien unter den im hygienischen Institut zu Greifswald gehaltenen Mäusen und über die Bekämpfung der Feldmausplage. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene, Abteilung I.* 11, 129-141

- LOPALCO, P. L., C. GERMINARIO, V. DI MARTINO, L. FRISOLI, A. PAGANO und S. BARBUTI (2000): Epidemiologic study and cost analysis of an *Salmonella enteritidis* epidemic. Ann. Ig. 12, 279-285
- MAC DONALD, N. und J. COWDEN (2004): Salmonellosis outbreak on a cruise ship travelling from Germany around the UK. Euro Surveill. 8 : 09/09/2004
- MACKEY, B. M. (1985): Quality control monitoring of liquid selective enrichment media used for isolating *salmonellae*. Int. J. Food Microbiol. 2, 41-48
- MAIJALA, R., T. JOHANNSON und J. HIRN (1992): Growth of *Salmonella* and competing flora in five commercial Rappaport-Vassiliadis (RV)-media. Int. J. Microbiol. 19, 1-8
- MALLINSON, E. T., R. G. MILLER, C. E. DE REZENDE, K. E. FERRIS, J. DEGRAFT-HANSON und S. W. JOSEPH (2000): Improved Plating Media for the Detection of *Salmonella* Species with Typical and Atypical Hydrogen Sulfide Production. J. Vet. Diagn. Invest. 12, 83-87
- MALLINSON, E. T. und R. G. MILLER (2003): New opportunities in *Salmonella* detection and control. In: *Microbiological Methods Forum Newsletter* 23 , Gloucestershire : Campden & Chorleywood Food Research Association, 8-15
- MALORNY, B., J. HOORFAR, M. HUGAS, A. HEUVELINK, P. FACH, L. ELLERBROEK, C. BUNGE, C. DORN und R. HELMUTH (2003a): Interlaboratory diagnostic accuracy of a *Salmonella* specific PCR-based method. Int. J. Food. Microbiol. 89, 241-249
- MALORNY, B., C. BUNGE und R. HELMUTH (2003b): Discrimination of *d*-Tartrate-Fermenting and –Nonfermenting *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Isolates by Genotypic and Phenotypic Methods. J. Clin. Microbiol. 41, 4292-4297
- MANAFI, M. und B. WILLINGER (1994): Comparison of three rapid methods for identification of *Salmonella* spp.. Lett. Appl. Microbiol. 19, 328-331
- MANAFI, M. (1996): Fluorogenic and chromogenic enzyme substrates in culture media and identification tests. Int. J. Food. Microbiol. 31, 45-58

- 
- MANSFIELD, L. P. und S. J. FORSYTHE (2000): Detection of *salmonellae* in food. Rev. Med. Microbiol. 11, 37-46
- MCEVOY, J. M., C. W. NDE, J. S. SHERWOOD und C. M. LOGUE (2005): An evaluation of Sampling Methods for the Detection of *Escherichia coli* and *Salmonella* on Turkey carcasses. J. Food Protect. 68, 34-39
- MCNEMAR, Q. (1947): Note on sampling error of the differences of the differences between correlated proportions or percentages. Psychometrika 12, 153-154
- MILLER, R. G., C. R. TATE, E. T. MALLINSON und J. A. SCHERRER (1991): Xylose-Lysine-Tergitol 4: An Improved Selective Agar Medium for the Isolation of *Salmonella*. Poult. Sci. 70, 2429-2432
- MILLER, R. G., C. R. TATE und E. T. MALLINSON (1994): Improved XLT4 Agar: Small Addition of Peptone to Promote Stronger Production of Hydrogen-Sulfide by *Salmonellae*. J. Food Protect. 57, 854-858
- MILLER, R. G. und E. T. MALLINSON (1999): *Salmonella* preferential media. U. S. Patent 5871944
- MILLER, R. G. und E. T. MALLINSON (2000): Improved Detection of *Salmonella* of Nontyphoid and Typhoid *Salmonellae* with Balanced Agar Formulations. J. Food Protect. 63, 1443-1446
- MINET, J., A. GOUGEON, S. JOBERT und M. CORMIER (2001): User-friendly Chromogenic *Salmonella* Media in Clinical Routine Practice. AES Laboratoire, Combourg, France
- MOAT, A. G. , J. W. FOSTER und M. P. SPECTOR (2002): *Microbial Physiology* 4. Auflage, New York : Wiley-Liss
- MOHAMMED, A., H. BECKER und G. TERPLAN (1996): Vergleichende Untersuchungen zum Nachweis von Salmonellen in äthiopischem Hüttenkäse (Ayib) mit verschiedenen kulturellen Verfahren. Arch. Lebensmittelhyg. 47, 81-104

- MOOIJMAN, K. A. (2004): The use of semi-solid media for the detection of *Salmonella* spp. in poultry faeces and other matrices. DOC ISO/TC 34 SC 9 N 681 – Annex 1, Ausgabe 17-12-2004, 1-14
- MOSSEL, D. A. A. und C. B. STRUIJK (1993): Workshop on risk assessment of human exposure to pathogenic microorganisms. Int. J. Food Microbiol. 18, 239-244
- MÜLLER, K., A. KÄSBOHRER und T. BLAHA (1997): Modifikation des ISO 6579 Salmonellennachweises für Monitoringuntersuchungen in der Geflügelproduktion. Fleischwirtsch. 77, 563-567
- MÜLLER, R., H.-W. WARNECKE und E. MEYER (2000): Salmonellennachweis: Vergleichende Untersuchungen der Sensitivität verschiedener Methoden. Fleischwirtsch. 80, 84-87
- MULLER, L. (1923): Un nouveau milieu d'enrichissement pour la recherche du bacille typhique et des paratyphiques. Comp. rend. Soc. Biol. 89, 434-437
- MURRAY, R. G. E. (1984): Kingdom Procaryotae Murray, 1968, 252<sup>AL</sup>. In: KRIEG, N. R. und J. G. HOLT (Hrsg.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume 1* Baltimore : Williams & Wilkins, 35-36
- NORTH, W. R. und M. T. BARTRAM (1953): The Efficiency of Selenite Broth of Different Compositions in the Isolation of *Salmonella*. Appl. Microbiol. 1, 130-134
- NORTH, W. R. (1961): Lactose pre-enrichment method for the isolation of *Salmonella* from dried egg albumen.. Appl. Microbiol. 9, 188-195
- O`BRIEN, S. J. und H. DE VALK (2003): *Salmonella* – “old” organism, continued challenges. Euro Surveill. 8, 29-31
- PALUMBO, S. A. und J. A. ALFORD (1970): Inhibitory Action of Tetrathionate Enrichment Broth. Appl. Microbiol. 20, 970-976
- PATIL, M. D. und N. M. PARHAD (1986): Growth of *salmonellas* in different enrichment media. J. Appl. Bacteriol. 61, 19-24

- PEREZ, J. M., P. CAVALLI, C. ROURE, R. RENAC, Y. GILLE und A. M. FEYDIERE (2003): Comparison of Four Chromogenic Media and Hektoen Agar for Detection and Presumptive Identification of *Salmonella* Strains in Human Stools. *J. Clin. Microbiol.* 41, 1130-1134
- PERRY, J. D., M. FORD, J. TAYLOR, A. L. JONES, R. FREEMAN und F. K. GOULD (1999): ABC Medium. A New Chromogenic Agar for Selective Isolation of *Salmonella* spp.. *J. Clin. Microbiol.* 37, 766-768
- PETERZ, M., C. WIBERG und P. NORBERG (1989): The effect of incubation temperature and magnesium chloride concentration on growth of *salmonella* in home-made and in commercially available dehydrated Rappaport-Vassiliadis broths. *J. Appl. Bacteriol.* 66, 523-528
- PIETZSCH, O., F. J. KRETSCHMER und E. BULLING (1975): Vergleichsuntersuchungen über *Salmonella*-Anreicherungsverfahren. *Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig.* 232, 232-246
- POPOFF, M. Y., J. BOCKEMÜHL und L. L. GHEESLING (2004): Supplement 2002 (no 46) to the Kauffmann-White scheme. *Res. Microbiol.* 155, 568-570
- POUPART, M. C., M. MOUNIER, F. DENIS, J. SIROT, C. COUTOURIER und F. VILLEVAL (1991): A new chromogenic ready to use medium for *Salmonella* detection, Abstract No. 1254. In: *Abstracts of the 5th European Congress of Clinical Microbiology and Infection Diseases*
- RAHN, K., S. A. DE GRANDIS, R. C. CLARKE, S. A. MCEWEN, J. E. GALÁN, C. GINOCCHIO, R. CURTISS und C. L. GYLES (1992): Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. *Mol. Cell. Probes* 6, 271-279
- RAMBACH, A. (1990): New plate Medium for Facilitated Differentiation of *Salmonella* spp. from *Proteus* spp. and other Enteric Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 301-303
- RAPPAPORT, F., N. KONFORTI und B. NAVON (1956): A new enrichment medium for certain *salmonellae*. *J. Clin. Pathol.* 9, 261-266

- REEVES, M. W., G. M. EVINS, A. A. HEIBA, B. D. PLIKATYS und J. J. 3 RD. FARMER (1989): Clonal nature of *Salmonella typhi* and its genetic relatedness to other *salmonellae* as shown by multilocus enzyme electrophoresis and proposal of *Salmonella bongori* comb. nov.. J. Clin. Microbiol. 27, 313-320
- REISSBRODT, R. (1995): Conventional and alternative methods for isolation and identification of *Salmonella* – an overview. Biotest Bulletin 5, 143-156
- REISSBRODT, R., W. BEER, R. MÜLLER und H. CLAUS (1995): Characterization of Casein Peptones by HPLC Profiles and Microbiological Growth Parameters. Acta Biotechnol. 15, 223-232
- REUTER, G. (1970): Mikrobiologische Analyse von Lebensmitteln mit selektiven Medien. Arch. Lebensmittelhyg. 2, 30-35
- RICHTER, J., H. BECKER und E. MÄRTLBAUER (2000): Improvement in Salmonella detection in milk and dairy products: Comparison between the ISO method and the Oxoid SPRINT *Salmonella* test. Lett. Appl. Microbiol. 31, 443-448
- RIJPENS, N., L. HERMAN, F. VEREECKEN, G. JANNES, J. DE SMEDT und L. DE ZUTTER (1999): Rapid detection of stressed *Salmonella* spp. in dairy and egg products using immunomagnetic separation and PCR. Int. J. Food Microbiol. 46, 37-44
- RIPABELLI, G., M. L. SAMMARCO, A. RUBERTO, G. IANNITTO und G. M. GRASSO (1997): Immunomagnetic separation and conventional culture procedure for detection of naturally occurring *Salmonella* in raw pork sausages and chicken meat. Lett. Appl. Microbiol. 24, 493-497
- ROSZAK, D. B. und R. R. COLWELL (1987): Survival strategies of bacteria in the natural environment. Microbiol. Rev. 51, 365-379
- ROURE, C., J. M. PEREZ, P. CAVALLI und A. M. FREYDIERE (2001): Abstract C 170. In: *Abstr. 101<sup>st</sup> Gen. Meet. Am. Soc. Microbiol.*, p. 188
- RUIZ, J., M. L. NUNEZ, I. LORENTE, J. PÉREZ, E. SIMARRO und J. GOMEZ (1996a): Performance of Six Culture Media for Isolation of *Salmonella* Species from Stool Samples. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 15, 922-926

- 
- RUIZ, J., M. L. NÚÑEZ, J. DIAZ, M. A. SEMPERE, J. GÓMEZ und M. A. USERA (1996b):  
Note: Comparison of media for the isolation of lactose-positive *Salmonella*. J. Appl.  
Bacteriol. 81, 571-574
- SADOVSKI, A. Y. (1977): Technical note: Acid sensitivity of freeze injured *salmonellae*  
in relation to their isolation from frozen vegetables by pre-enrichment procedure. J.  
Fd. Technol. 12, 85-91
- SCHLEGEL, H. G. (2004): *Geschichte der Mikrobiologie 2*. korr. Aufl., Halle (Saale) :  
Deutsche Akademie der Naturforscher Leopoldina
- SCHMIDT-LORENZ, W. (1980): *Sammlung von Vorschriften zur mikrobiologischen*  
*Untersuchung von Lebensmitteln 2*. Lieferung, Weinheim : Verlag Chemie
- SELBITZ, H.-J., H.-J. SINELL, A. SZIEGOLEIT und J. KLEER (1995): *Das Salmonellen-*  
*Problem, VET-Special* Jena : Gustav Fischer Verlag
- SHERROD, P. S., R. M. AMAGUANA, W. H. ANDREWS, G. A. JUNE und T. S. HAMMACK  
(1995): Relative Effectiveness of Selective Plating Agars for Recovery of *Salmonella*  
Species from Selected High-Moisture Foods. J. AOAC Int. 78, 679-690
- SMITH, T. (1891): Special Report on the Cause and Prevention of Swine Plague: Results  
of Experiments. Washington : Government Printing Office
- STOCK, K. und A. STOLLE (2001): Incidence of *Salmonella* in Minced Meat Produced in  
a European Union-Approved Cutting Plant. J. Food Protect. 64, 1435-1438
- SWANENBURG, M., H. A. P. URLINGS, J. M. A. SNIJDERS, D. A. KEUZENKAMP und F. VAN  
KNAPEN (2001): *Salmonella* in slaughter pigs: prevalence, serotypes and critical  
control points during slaughter in two slaughterhouses. Int. J. Food Microbiol. 70,  
243-254
- TATE, C. R., R. G. MILLER, E. T. MALLINSON und L. W. DOUGLAS (1990): The Isolation  
of *Salmonellae* from Poultry Environmental Samples by several Enrichment  
Procedures Using Plating Media with and without Novobiocin. Poult. Sci. 69, 721-  
726

- TAYLOR, W. I. (1965): Isolation of *shigellae* 1. Xylose lysine agars; new media for isolation of enteric pathogens. *Am. J. Clin. Pathol.* 44, 471-475
- THRELFALL, E. J., J. A. FROST, L. R. WARD und B. ROWE (1996): Increasing spectrum of resistance in multiresistant *Salmonella typhimurium*. *Lancet* 347, 1053-1054
- THRELFALL, E. J., I. S. T. FISHER, C. BERGHOLD, P. GERNER-SCHMIDT, H. TSCHÄPE, M. CORMICAN, I. LUZZI, F. SCHNIEDER, W. WANNET, J. MACHADO und G. EDWARDS (2003): Antimicrobial drug resistance in isolates of *Salmonella enterica* from cases of salmonellosis in humans in Europe in 2000: results of international multi-centre surveillance. *Euro Surveill.* 8, 41-45
- TIETJEN, M. und D. Y. C. FUNG (1995): *Salmonellae* and Food Safety. *Crit. Rev. Microbiol.* 21, 53-83
- TINDALL, B. J., P. A. D. GRIMONT, G. M. GARRITY und J. P. EUZÉBY (2005): Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55, 521-524
- TONGPIM, S., R. R. BEUMER, S. K. TAMINGA und E. H. KAMPELMACHER (1984): Comparison of modified Rappaport's medium (RV) and Muller-Kauffmann (MK-ISO) for the detection of *Salmonella* in meat products. *Int. J. Food Microbiol.* 1, 33-42
- TSCHÄPE, H. und H. KÜHN (1995): Einleitung. In: KÜHN, H. und H. TSCHÄPE (Hrsg.) *Salmonellosen des Menschen* RKI-Schriften 3/1995, München : Medizin-Verlag, 5-18
- TSCHÄPE, H. und J. BOCKEMÜHL (2002): Lebensmittelübertragene Salmonellose in Deutschland. *Bundesgesundheitsbl.* 45, 491-496
- VAN DER ZEE, H. (2003): Media for the isolation of *Salmonella*. In: CORRY, J. E. L., G. D. W. CURTIS und R. M. BAIRD (Hrsg.) *Handbook of Culture Media for Food Microbiology* 37. Auflage, Amsterdam : Elsevier
- VAN LEUSDEN, F. M., M. VAN SCHOTHORST und H. J. BECKERS (1982): The standard *Salmonella* isolation method. In: J. E. L. CORRY, D. ROBERTS und F. A. SKINNER (Hrsg.) *Isolation and identification methods for food poisoning organisms* SAB Technical Series No. 17, London : Academic Press, 35-49

- VAN PELT, W., H. VAN DER ZEE, W. J. B. WANNET, A. W. VAN DE GIESSEN, P. J. MEVIUS, N. M. BOLDER, R. E. KOMIJN and Y. T. H. P. VAN DUYNHOVEN (2003): Explosive increase of *Salmonella* Java in poultry in the Netherlands: Consequences for public health. *Euro Surveill.* 8, 31-35
- VAN PELT, W., D. MEVIUS, H. G. STOELHORST, S. KOVATS, A. W. VAN DE GIESSEN, W. WANNET and Y. T. H. P. DUYNHOVEN (2004): A large increase of *Salmonella* infections in 2003 in the Netherlands: hot summer or side effect of the avian influenza? *Euro Surveill.* 9, 3-4
- VAN SCHOTHORST, M. und F. M. VAN LEUSDEN (1972): Studies on the isolation of injured *salmonellae* from foods. *Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. A* 221, 19-29
- VASSILIADIS, P. (1983): The Rappaport-Vassiliadis (RV) enrichment medium for the isolation of salmonellas: An overview. *J. Appl. Bacteriol.* 54, 69-76
- VASSILIADIS, P., E. PATERAKI, N. PAPAOKI, N. PAPAICONOMOU, J. A. PAPADAKIS und D. TRICHOPOULOS (1976): Nouveau procédé d'enrichissement de *Salmonella*. *Ann. Microbiol. Inst. Pasteur* 127B, 195-200
- VASSILIADIS, P., V. KALAPOTHAKI, CH. MAVROMMATI und D. TRICHOPOULOS (1984): A comparison of the original Rappaport medium (R medium) and the Rappaport-Vassiliadis medium (RV medium) in the isolation of *salmonellae* from meat products. *J. Hyg. Camb.* 93, 51-58
- VASSILIADIS, P., CH. MAVROMMATI, V. KALAPOTHAKI, G. CHRONAS und M. EFSTRATIOU (1985): *Salmonella* isolation with Rappaport-Vassiliadis enrichment medium seeded with different sized inocula of pre-enrichment cultures of meat products and sewage polluted water. *J. Hyg. Camb.* 95, 139-147
- VÉRON, M. und F. GASSER (1963): Sur la detection del'hydrogene sulfure product par certaines Enterobacteriacees dans le milieux de diagnostic rapid. *Ann. Inst. Pasteur* 105, 524-534

VON ALTROCK, A., A. SCHUTTE und G. HILDEBRANDT (2000): Results of the German investigation in the EU Project “*Salmonella* in Pork (Salinpork)”- 2. Investigations in a slaughterhouse. Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. 113, 225-233

WALLIS, W. A. (1980): The Statistical Research Group, 1942-1945. With Comments. Journal of the American Statistical Association 75, 320-335

WARBURTON, D. W., B. BOWEN, A. KONKLE, C. CRAWFORD, S. DURZI, R. FOSTER, C. FOX, L. GOUR, G. KROHN, P. LACASSE, G. LAMONTAGNE, S. MCDONAGH, V. ARLING, J. MACKENZIE, E. C. D. TODD, J. OGGEL, R. PLANTE, S. SHAW, N. P. TIWARI, Y.

TROTTIER und B. D. WHEELER (1994): A comparison of six different plating media used in the isolation of *Salmonella*. Int. J. Food Microbiol. 22, 277-289

WEENK, G. (2003): Microbiological assessment of culture media: comparison and statistical evaluation of methods. In: CORRY, J. E. L., G. D. W. CURTIS und R. M. BAIRD (Hrsg.) *Culture Media for Food Microbiology* 37. Auflage, Amsterdam : Elsevier, 1-23

WICHMANN-SCHAUER, H., L. ELLERBROEK, F. DELBECK, M. HAARMANN, G. MARTIN, I. NICKOLAI und U. PAULAT (2000): Nachweis von *Salmonella* in Geflügelfleisch-Proben: Erfahrungen mit einer Modifikation des ISO 6579. Fleischwirtsch. 80, 90-93

WICHMANN-SCHAUER, H., ELLERBROEK, L., F. DELBECK, S. FORSTER, R. FRIES, M. HAARMANN, R. HELMUTH und U. METHNER (2001): Vorkommen von Salmonellen bei deutschem Nutzgeflügel und Geflügelfleisch. Fleischwirtsch. 81, 83-87

WILSON, D. (2004): *Salmonella* outbreak linked to food outlet in northeast England. Euro Surveill. 33 : 12/08/2004

- WINFIELD, M. D. und E. A. GROISMAN (2003): Role of Nonhost Environments in the Lifestyles of *Salmonella* and *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol. 69, 3687-3694
- YDE, M. und G. GHYSELS (1984): Performance of Several Enrichment Media in the Isolation of Salmonellae from Liquid Egg Products. J. Food Protect. 47, 217-219
- ZEWDE, G. (2001): Nachweis von Salmonellen in Geflügelfleisch. Fleischwirtschaft 81, 93-95
- ZIEMER, C. J. und S. R. STEADHAM (2003): Evaluation of the specificity of *Salmonella* PCR primers using various intestinal bacterial species. Lett. Appl. Microbiol. 37, 463-469

## Zitierte Rechtsvorschriften, Normen und Normvorschläge

AMTLICHE SAMMLUNG VON UNTERSUCHUNGSVERFAHREN NACH § 64 LFGB L 00.00-20  
SEPTEMBER 1998: Untersuchung von Lebensmitteln: Horizontales Verfahren für den  
Nachweis von Salmonellen (Übernahme der gleichnamigen Deutschen Norm DIN EN  
12824, Februar 1998)

AMTLICHE SAMMLUNG VON UNTERSUCHUNGSVERFAHREN NACH § 64 LFGB L 00.00-20A  
NOVEMBER 1999: Untersuchung von Lebensmitteln: Endgültige Bestätigung von  
Salmonellen

AMTLICHE SAMMLUNG VON UNTERSUCHUNGSVERFAHREN NACH § 64 LFGB L 00.00-20  
DEZEMBER 2004: Untersuchung von Lebensmitteln und Futtermitteln: Horizontales  
Verfahren für den Nachweis von Salmonellen (Übernahme der gleichnamigen  
Deutschen Norm DIN EN ISO 6579, März 2003)

AMTLICHE SAMMLUNG VON UNTERSUCHUNGSVERFAHREN NACH § 64 LFGB L 00.00-20A  
DEZEMBER 2004: Untersuchung von Lebensmitteln: Endgültige Bestätigung von  
Salmonellen

AMTLICHE SAMMLUNG VON UNTERSUCHUNGSVERFAHREN NACH § 64 LFGB L 00.00-52  
JULI 2000: Untersuchung von Lebensmitteln: Verfahren zum Nachweis von  
Salmonellen in Lebensmitteln mit der Polymerase-Kettenreaktion (Übernahme der  
gleichlautenden Deutschen Norm DIN 10135, Ausgabe November 1999).

AMTLICHE SAMMLUNG VON UNTERSUCHUNGSVERFAHREN NACH § 64 LFGB L 00.00-54  
JULI 2000: Untersuchung von Lebensmitteln - Vorbereitung von Untersuchungsproben  
und Herstellung von Erstverdünnungen und von Dezimalverdünnungen für  
mikrobiologische Untersuchungen von Lebensmitteln - Teil 1: Allgemeine Regeln für  
die Herstellung von Erstverdünnungen und Dezimalverdünnungen (Übernahme der  
gleichnamigen Deutschen Norm DIN EN ISO 6887-1, Ausgabe April 1999)

AMTLICHE SAMMLUNG VON UNTERSUCHUNGSVERFAHREN NACH § 64 LFGB L 06.00-19  
MAI 1984: Untersuchung von Lebensmitteln - Bestimmung der aeroben Keimzahl bei  
30 °C in Fleisch und Fleischerzeugnissen, Tropfplattenverfahren (Übernahme der  
gleichnamigen Deutschen Norm DIN 10161, Ausgabe Februar 1984)

- DEUTSCHER NORM ENTWURF PREN ISO 6579 JUNI 2000: Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln: Horizontales Verfahren zum Nachweis von *Salmonellen* spp. (ISO/DIS 6579:2000), Deutsche Fassung
- DEUTSCHE NORM DIN EN ISO 6579 MÄRZ 2003: Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln, Horizontales Verfahren zum Nachweis von *Salmonella* spp. (ISO 6579:2002), Deutsche Fassung
- DEUTSCHE NORM DIN EN ISO 16140 SEPTEMBER 2003: Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln – Arbeitsvorschrift für die Validierung alternativer Verfahren (ISO 16140:2003); Deutsche Fassung EN ISO 16140:2003
- DEUTSCHE VORNORM DIN ISO/TS 11133-2 OKTOBER 2004: Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln – Anleitung für die Vorbereitung und Herstellung von Nährmedien – Teil 2: Praktische Anleitung zur Leistungsprüfung von Nährmedien (ISO/TS 11133-2:2003); Deutsche Fassung CEN ISO/TS 11133-2:2003
- ENTWURF ALLGEMEINE VERWALTUNGSVORSCHRIFT ÜBER DIE DURCHFÜHRUNG DER AMTLICHEN ÜBERWACHUNG DER EINHALTUNG DER HYGIENEVORSCHRIFTEN FÜR LEBENSMITTEL TIERISCHEN URSPRUNGS (AVV LEBENSMITTELHYGIENE – AVV LMH), Stand: 16. Juni 2005
- INTERNATIONAL STANDARD ISO 6785:2001 IDF 93:2001: Milk and milk products: Detection of *Salmonella* spp.. 2. Auflage, 2001-05-15
- KYPRIANOU, M. (2005): Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 der Kommission vom 15. November 2005 über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel. Amtsblatt der Europäischen Union L 338/1 vom 22.12.05
- NORDIC COMMITTEE ON FOOD ANALYSIS UDC 579.842.14, No 71, 4TH EDITION 1991: SALMONELLA BACTERIA. DETECTION IN FOODS.

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen meiner Dissertation und Umsetzung meiner Ziele maßgeblich beigetragen haben.

Herrn Univ.-Prof. Dr. Michael Bülte danke ich recht herzlich für die Vergabe des Themas und die vielen Stunden seiner Zeit, die er mir bei der Betreuung und Korrektur dieser Arbeit gewidmet hat sowie für die Möglichkeit zur wissenschaftlichen Weiterbildung am Institut.

Herrn Dr. Klaus Failing danke ich sehr für seine engagierte Beratung und die geduldig gewährte Hilfe bei den statistischen Berechnungen.

Frau Dr. Petra Hattendorf danke ich für ihre Richtung weisende Einführung in die Thematik.

Den technischen Mitarbeitern des Instituts, insbesondere Frau Margot Lechner und Herrn Walter Rupp – der bereits mit Herrn Rambach persönlich zu Mittagstisch saß – danke ich sehr für die praktische Unterweisung und stets zuverlässige Unterstützung im Labor sowie für die humorvolle Arbeitsatmosphäre.

Herrn Univ.-Prof. Dr. Christoph Lämmler gilt mein besonderer Dank für seine entscheidende Unterstützung in der „heißen“ Endphase.

Herrn Univ.-Prof. em. Dr. Edward Mallinson danke ich recht herzlich für den netten, langjährigen Briefkontakt, stete Diskussionsbereitschaft und seine außerordentliche Unterstützung bei der Herstellung von MM.

Der Firma AES Laboratoire Chemunex und der Firma Oxoid sei gedankt für die großzügige, kostenlose Bereitstellung der vielen chromogenen Nährmedien. Der Firma Merck KGaA Darmstadt danke ich für ihr fortlaufendes Interesse an meiner Arbeit.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Dr. Rolf Reissbrodt für spontane Hilfsbereitschaft und das Zusenden seiner umfangreichen Publikationssammlung bedanken.

Frau Dr. Jennifer Hirschfeld sei recht herzlich gedankt für ihre Kameradschaft und unermüdliches Beschaffen von Literatur („*Such und Hilf*“).

All meinen Freunden, den Geschwistern und unseren Familien danke ich für Verständnis, Rücksichtnahme und moralische Unterstützung in der langen Zeit der Umsetzung dieses Dissertationsvorhabens. Diese Arbeit wäre jedoch nie ohne die frühzeitige Förderung und finanzielle Unterstützung im Studium durch meine Eltern zustande gekommen.

Meiner Mutter danke ich sehr für ihr Vertrauen. Meinem verstorbenen Vater habe ich insbesondere meinen Sinn für „Angewandte Zoologie“ und das „Werkeln im Labor“ zu verdanken.

Mein stärkster Rückhalt war und ist mein Mann Holger. Nach Studium, Examen und ersten Berufsjahren ist es uns nun gelungen, auch diese Hürde gemeinsam zu nehmen („*Let's go West – Is it heaven? No, it's Iowa.*“).

*Und auch mein Schatten, der beste schwarze Labrador von allen – Bootsmann - und mein Sonnenschein – Alrun - dürfen an dieser Stelle nicht unerwähnt bleiben!*