

**Probenahmen**

# Eigenkontrollen erhöhen die Sicherheit

Moderne Analytik zum Nachweis von EHEC in Lebensmitteln

Nach Angaben des Robert-Koch-Instituts (RKI) wurden im Jahr 2013 in Deutschland 1621 durch EHEC verursachte Erkrankungen gemeldet. Dies entspricht der bisher zweithöchsten Fallzahl seit der Epidemie im Jahr 2011. EHEC gelten als Lebensmittel assoziierte Zoonose-Erreger. Proben von Patienten werden im Verdachtsfall untersucht. Liegen Ausbruchsfälle vor, erfolgen insbesondere amtlicherseits Probenahmen von verdächtigen Lebensmitteln. Vorsorglich lassen Lebensmittelunternehmen im Rahmen der Eigenkontrolle Proben in spezialisierten Dienstleistungslaboren auf STEC, VTEC, EHEC untersuchen.

Von Burkhard Schütze

Für die Keime VTEC, STEC, EHEC existieren unterschiedliche Bezeichnungen. Enterohaemorrhagische *Escherichia coli* (EHEC) gelten als humanpathogen. Für Verwirrung sorgt häufig die uneinheitliche wissenschaftliche Nomenklatur. Die Bezeichnung Enterhämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC) nimmt Bezug auf die Erkrankung, die durch das Shiga-Toxin 1 (Stx1), welches identisch mit dem von *Shigella dysenteriae* Typ 1 ist und dem ähnlichen Shiga-Toxin 2 (Stx2) verursacht werden können. Früher wurden die bakteriell gebildeten Toxine im Labor mit Zellkulturen von Verozellen nachgewiesen. Daher kommt der Begriff Verotoxin-bildende *E. coli* (VTEC). Das Verotoxin wurde später als Shigatoxin bezeichnet und die Bezeichnung Shigatoxin-bildende *E. coli* (STEC) verwendet. Gemeint ist letztendlich derselbe Problemkeim.

Beim Menschen werden im EHEC-Erkrankungsfall Shigatoxine im Darm gebildet und können zur entsprechenden Symptomatik führen. Ärzte und Medien sprechen daher meist von EHEC. Bei Untersuchungen von Lebens-

mitteln und in Gesetzestexten zur Lebensmittelsicherheit wird hingegen von STEC oder VTEC gesprochen. Denn gegenwärtig ist noch nicht in allen Einzelheiten bekannt, welche Eigenschaften einen STEC (VTEC) zum EHEC machen, also zur Erkrankung führen. Alle STEC (VTEC) werden als potenzielle beziehungsweise mutmaßliche EHEC betrachtet. In Lebensmitteln sind Shigatoxine übrigens nicht nachweisbar.

**EHEC können sehr ernste Erkrankungen beim Menschen verursachen**

Enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC) nehmen unter der Gruppe der enterovirulenten *E. coli* eine Sonderstellung ein. Patienten können neben Gastroenteritis (Magen-Darm-Entzündungen) auch hämorrhagische Colitis (Darmblutungen) und vor allem das gefürchtete hämolytisch-urämische Syndrom (HUS) sowie eine thrombotisch-thrombozytopenische Purpura (TTP) entwickeln. Blutzellen werden durch die Shigatoxine zerstört und verstopfen Kapillarblutgefäße, besonders der Niere. Die Ge-

fahr eines akuten Nierenschadens ist Grund für die vergleichsweise hohe Sterblichkeit. Für die überlebenden HUS-Patienten ist nicht selten eine aufwändige Therapie und Nachsorge nötig. Oft in Form lebenslanger Dialyse. In manchen Fällen hilft nur eine Organtransplantation. Jede im Labor diagnostizierte Infektion ist nach § 7 Infektionsschutzgesetz (IfSG) meldepflichtig. Sie wird aufgrund ihrer Schwere im Vergleich zu allen anderen *E.-coli*-Pathogruppen von den Gesundheitsämtern separat erfasst.

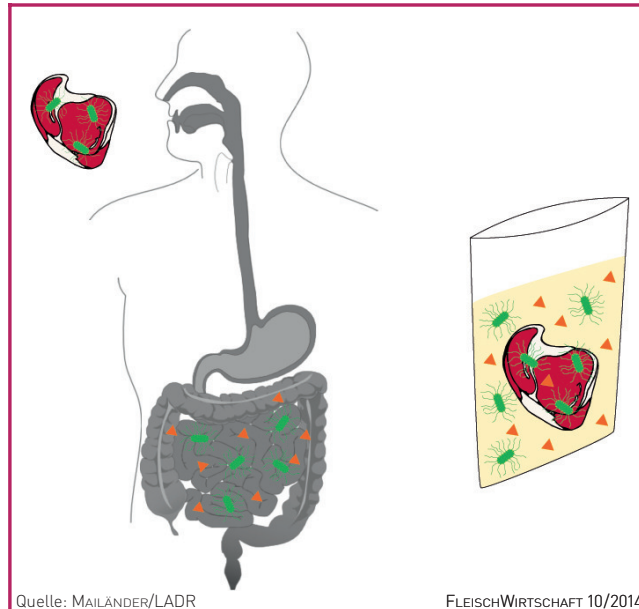
**Rohe Lebensmittel und Tierkörper häufig belastet**

Während der HUS-Epidemie im Jahr 2011 standen verstärkt pflanzliche Lebensmittel wie Salate, Sprossen oder nicht pasteurisierte Säfte im Fokus der Lebensmittelkontrolle. Hauptauslöser für Lebensmittelinfektionen durch STEC bleiben jedoch tierische Lebensmittel wie Rohmilchprodukte oder unzureichend gegartes Fleisch. Epidemiologische Studien zeigten auffällig hohe Nachweisraten. Gerade Wiederkäuer gelten als Reservoir. Im Kot

von Rindern, Schafen und Ziegen aus deutschen Beständen lassen sich regelmäßig pathogene Stämme isolieren. Insbesondere in den warmen Sommermonaten und bei Jungtieren deren Pansenfunktion noch nicht voll ausgeprägt ist, sind die Belastungen erhöht. Schlachttiere sind besonders exponiert. Das Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) weist im Rahmen ihrer Zoonosenberichterstattung 2012 darauf hin, dass Fleisch von Wildwiederkäuern sehr hohe Nachweisraten (16,1% VTEC-positive, 2012) zeigt und als potentielle Quelle für Infektionen besonders bedeutsam ist. Fleisch von Wildtieren stellt demnach ein noch größeres Risiko dar im Vergleich mit der Lebensmittelgewinnung durch Viehhaltung und Schlachtung (5,7% VTEC-positive, 2012) und sollte nur durcherhitzt verzehrt werden. Das BfR merkt an, dass die aus tierischen Lebensmitteln isolierten Serogruppen mit denen von EHEC-Erkrankungen in den meisten Fällen übereinstimmen und für einen Großteil der HUS-Erkrankungen verantwortlich sind.

**Lebensmittelproben - Nachweis von EHEC im Labor**

Die Untersuchungen von Lebensmittelproben auf EHEC sind komplex. Grundsätzlich können zwei Wege beschrieben werden. Ist die Probe im Labor angekommen, kann erstens der Nachweis des in einer Anreicherungsbouillon gebildeten Shigatoxins (Stx) mit einem immunologischen Verfahren (ELISA) erfolgen, oder zweitens können mittels PCR die Gene nachgewiesen werden, die für die Shigatoxinproduktion (stx1/stx2) verantwortlich sind. PCR-Ergebnisse sollten in einem spezialisierten Labor nach einem Tag, ELISA-Ergebnisse spätestens nach zwei Tagen vorliegen. Die EHEC-Analytik stellt insgesamt hohe Anforderungen an die Prüflaboratorien. Mittels der Polymerasekettenreaktion (PCR) werden verschiedene Gen-Abschnitte, bei denen der Zusammenhang



Quelle: MAILÄNDER/LADR

FLEISCHWIRTSCHAFT 10/2014

Abb. 1: Die Toxiinfektion durch EHEC (grün) wird im Labor beschleunigt nachgestellt und zum immunenzymatischen Nachweis der Toxine (orange) verwendet.

## Durch EHEC verursachte Erkrankungen steigen wieder an

Tab. 1: Durch Lebensmittelkeime verursachte Erkrankungen in den Jahren 2011 bis 2013

	2011	2012	2013
Campylobacter-Enteritis	71 311	62 626	63 195
Salmonellose	24 517	20 699	18 828
Yersiniose	3 396	2 687	2 563
<b>EHEC (ohne HUS)</b>	<b>4 906</b>	<b>1 529</b>	<b>1 609</b>
HUS	880	69	76
Listeriose	338	411	458
Norovirus-Erkrankungen	116 124	112 364	88 702

Quelle: Robert-Koch-Institut, Epidemiologisches Bulletin Nr. 3; 20.01.2014

FLEISCHWIRTSCHAFT 10/2014

## Bestimmung der Serogruppe ist wichtige Information

Tab. 2.: Ausgewählte molekularbiologisch nachweisbare Pathogenitätsfaktoren darmpathogener *E. coli*

Pathogenitätsfaktor	<i>E.-coli</i> -Pathovar
stx1-/stx2-Gen	STEC, Shiga-Toxin bildende <i>E. coli</i> [(EHEC) Enterohämorrhagische <i>E. coli</i> ]
Stx1-/stx2-Gen und eae-Gen	STEC, Shiga-Toxin bildende <i>E. coli</i> [(EHEC) Enterohämorrhagische <i>E. coli</i> ]
eae-Gen	EPEC (enteropathogene <i>E. coli</i> )
Invasin plasmid antigen H ipaH-Gen	EIEC (enteroinvasive <i>E. coli</i> )

Quelle: SCHÜTZE

FLEISCHWIRTSCHAFT 10/2014

mit Erkrankungen aufgeklärt wurde, selektiv vervielfältigt und anschließend nachgewiesen. STEC haben also die Eigenschaft zur Shigatoxinbildung. Die von EHEC produzierten Shigatoxine werden – wie bereits ausgeführt – zwei Hauptgruppen (Stx 1 und Stx 2) zugeordnet. Schwere Erkrankungen, wie z.B. das HUS, werden überwiegend durch Stx 2 produzierende EHEC hervorgerufen. Zudem können andere *E.-coli*-Pathovaren und Pathogenitätsfaktoren erkannt werden. Die Untersuchung auf das Vorhandensein des Intimin-codierenden eae-Gens ist wichtig, (eae steht für *E. coli* attaching and effacing), da es mit STEC-Stämmen verbunden ist, die sehr ernste Krankheitsverläufe hervorrufen können. Das eae-Gen kodiert das Membranprotein Intimin, das für die Anlagerung bzw. das Effacement der Erreger an die

Epithelzellen der Darmwand verantwortlich ist.

Wird hingegen das codierende Gen des Pathogenitätsfaktors eae alleine, also ohne stx1-/stx2-Gene, nachgewiesen, können Enteropathogene *E. coli*, sogenannte EPEC, vorliegen, die insbesondere Durchfall bei Kindern verursachen können. Im Routinebetrieb sind für Lebensmittelunternehmen die Ergebnisse der PCR-Methoden schnell verfügbar. Untersuchte Produkte können zügig für den Verkauf freigegeben werden oder bei Verdachtsfällen gelangen kontaminierte Chargen erst gar nicht in den Verkehr.

Werden in x g Lebensmittel keine stx-Gene nachgewiesen, ist folglich STEC nicht nachgewiesen worden. Die Lebensmittelprobe zeigt dann keine Auffälligkeiten hinsichtlich EHEC und weitere Untersuchungen sind nicht nötig.

Der mutmaßliche Nachweis von STEC ist erfolgt, sofern stx-Gene in x g Lebensmittel nachgewiesen werden. Wird zudem noch der Pathogenitätsfaktor eae identifiziert, so sind mutmaßliche STEC, die Läsionen durch Anheftung und Zerstörung des menschlichen Darms verursachen können, in der Probe nachgewiesen worden. Auffällige PCR-Ergebnisse sollten (müssen) bestätigt werden, denn DNA-Material kann langlebig und aus abgestorbenen Bakterienzellen stammen. Hierzu ist die Isolierung der vermehrungsfähigen Bakterien nötig, damit entsprechende Isolierungs- und Bestätigungsverfahren durchgeführt werden können. Bestätigungsverfahren sind jedoch aufwendig und teuer. Aufgrund der, in der Regel, stark vorhandenen Begleitflora, gestaltet sich die Isolierung jedoch häufig schwierig. Sofern eine Iso-

lierung der Bakterienkolonien im Labor nicht erreicht wurde, können aber die Gene der als besonders kritisch erachteten Serogruppen O157, O111, O26, O103 und O145 molekularbiologisch bestimmt werden. Um auszuschließen, dass stille Gensequenzen vorliegen, die von der Bakterienzelle nicht aktiv zur Toxinproduktion eingesetzt werden, bietet sich zur Absicherung auch weiterhin der aufwändige immunchemische Nachweis der Shigatoxine nach Voranreicherung an. Genau wie bei der Toxiinfektion im menschlichen Darm werden gegebenenfalls mit STEC kontaminierte Lebensmittelproben in Nährlösungen inkubiert und zur Shigatoxinproduktion angeregt.

Das tatsächliche Vorhandensein von STEC in untersuchten Lebensmittelproben ist letztlich aber erst dann gesichert, wenn Bakterienkolonien isoliert und mittels molekularbiologischer und/oder serologischer Verfahren als STEC bestätigt wurden.

Das RKI bemerkt im Infektionsepidemiologischen Jahrbuch für Deutschland, dass nur bei einem Viertel aller Meldedfälle im Jahr 2013 eine erfolgreiche Serotypisierung der Erreger im Patientenmaterial durchgeführt werden konnte. Die Bestimmung der Serogruppe ist aber eine wichtige Information um Ausbruchsorte zu ermitteln und Epidemien einzudämmen. Wie bereits erwähnt, existieren zahlreiche gefährliche Serovaren. Nicht selten liegt die Anforderung im Labor vor, lediglich auf O157 zu untersuchen, da dieses Serovar besonders bekannt ist. Eine Untersuchung auf beispielsweise nur eine Serogruppe wie O157:H7, kann zu falsch negativen Befunden führen.

## Deutschlands einzige Wochenzeitung für die gesamte Branche

Testen Sie jetzt kostenlos die afz! Einfach unter [www.afz.de/testen](http://www.afz.de/testen) bestellen und drei Ausgaben gratis lesen.

- Nachrichten:** Auf den Punkt gebracht
- Regional:** Ganz nah dran
- Märkte:** Aktuell notiert und interpretiert
- Praxis:** Fachgerecht zerlegt und serviert

Kennen Sie schon die iPad-App der afz? Kostenlos für Abonnenten im App-Store!



fleischwirtschaft  
de + com



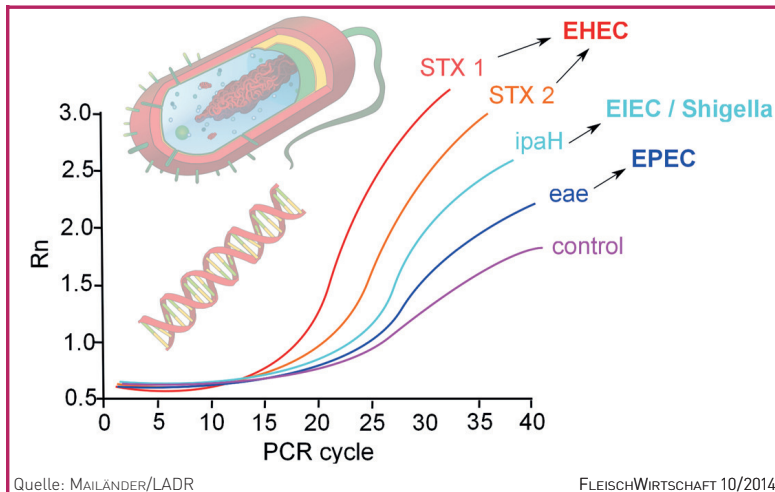


Abbildung 2: Mittels real-time PCR lassen sich zahlreiche Genabschnitte parallel nachweisen, so dass mehrere Pathotypen auf DNA-Ebene in einem Lauf erfasst werden.

### Verstärkte Eigenkontrollen erhöhen die Lebensmittelsicherheit

Verantwortungsvolle Lebensmittelunternehmen führen regelmäßig eigene Hygienekontrollen in ihren Produktionsstätten durch. *E. coli* gilt hier als wichtiger Indikatorkeim. Der Nachweis von *E. coli* aus Umfeld- oder Lebensmittelproben korreliert jedoch nicht mit dem eventuellen Vorhandensein von EHEC, ebenso wenig wie der Nachweis von *E. coli* in Lebensmitteln. Die meisten Stämme von *E. coli* lösen nämlich keine Krankheiten aus. Sie kommen natürlicherweise im Darm von Warmblütern unter anderem auch dem Menschen vor. Ihr Nachweis wird daher als Indika-

tor für fäkale Kontaminationen und Hygienemängel angesehen.

Auf STEC wird im Rahmen von Lebensmittel-Eigenkontrollen verhältnismäßig selten untersucht, häufiger hingegen auf pathogene Erreger wie Salmonellen und *Listeria monocytogenes*. Gesetzlich ist derzeit die Untersuchung von Sprossen auf STEC vorgeschrieben. Im Anhang I, mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel der VO (EG) 2073/2005 ist auf Shiga-Toxin bildende *E. coli* (STEC) O157, O26, O111, O103, O145 und O104:H4 gemäß DIN CEN ISO/TS 13136 zu untersuchen. Diese Untersuchungsmethode mit den entsprechenden Bestätigungsverfahren ist derzeit noch nicht weit ver-

ursachen können.

### Behörden kontrollieren

Da der vergleichsweise geringe finanzielle Mehraufwand von routinemäßigen Laboranalysen auf STEC in keinem Verhältnis zum betriebswirtschaftlichen oder volkswirtschaftlichen Schaden von Produktkräften und Personenschäden steht, kontrolliert auch die behördliche Lebensmittelüberwachung Risikolebensmittel und -betriebe. Für die Überwachung bedeutet dies, dass tierische Lebensmittel insbesondere Wildfleisch im Rahmen des bundesweiten Zoonosen-Monitorings verstärkt untersucht werden. Auch die Untersuchungen von Roh-

milchkäsen führen immer wieder zu auffälligen Befunden und Rückrufen. Allein im August 2014 wurde vom BVL in den Lebensmittelwarnungen auf zwei Rohmilchkäsen mit Kontamination von EHEC hingewiesen, einmal erfolgte der Nachweis von *E. coli* stx O26:H11 und einmal von Verotoxin bildenden *E. coli*. Zwei Ausbruchsgeschehen mit mehreren Erkrankten sind 2013 im jährlichen Report der Europäischen Kommission RASFF (Rapid Alert System for Food and Feed) aufgeführt. Acht Menschen erlitten das gefährliche HUS-Syndrom. Die Erkrankungsfälle in Schweden und Dänemark wurden auf den Verzehr von tiefgefrorenen Hamburgern bzw. Hackfleisch, das mit *E. coli* O157:H7 kontaminiert war, zurückgeführt.

Die Europäische Union hat sich die höchsten Standards für Lebensmittelsicherheit auf die Fahne geschrieben. Gesetzgeber können jedoch nur auf bekannte Risiken reagieren und Untersuchungsämter nur stichprobenartig eigene Untersuchungen durchführen. Die Verantwortung ob ein Lebensmittel sicher für den menschlichen Verzehr ist, trägt am Ende immer der Unternehmer, der das Lebensmittel in den Verkehr bringt. Die Untersuchung von Lebensmitteln für den Nachweis von Shiga-toxin bildenden *Escherichia coli* (STEC) sollte nach DIN EN ISO/TS 13136 in entsprechenden Dienstleistungslaboren erfolgen.



**Dr. Burkhard Schütze**

ist Diplom-Biologe und Gegenprobensachverständiger. Schütze arbeitet seit 1998 im Labor der LADR GmbH, ist hier seit 2006 Laborleiter für den akkreditierten Bereich Lebensmittelanalytik mit dem Schwerpunkt Mikrobiologie der Lebensmittel.

Anschrift des Verfassers  
Dr. Burkhard Schütze, LADR GmbH – MVZ – Dr. Kramer & Kollegen, Lauenburger Straße 67, 21502 Geesthacht, B.schuetze@ladr.de

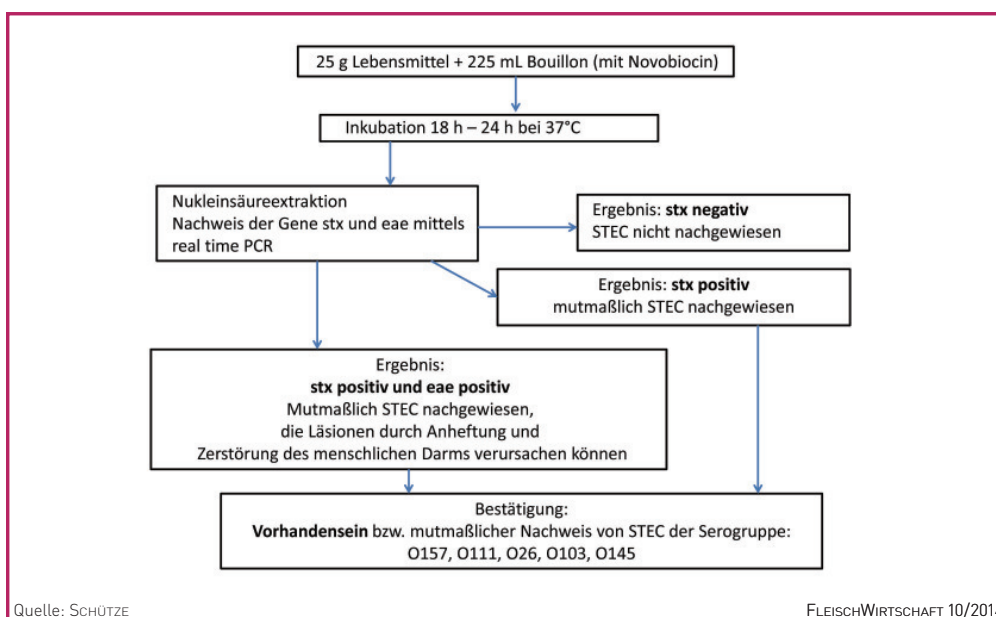


Abb. 3: Ablaufschema für den Nachweis von STEC (Shiga-toxin bildende *Escherichia coli*)