

Neue Tendenzen in der Lebensmitteluntersuchung

E. KLINGSBICHEL und D. JENEWEIN

Der Nachweis von pathogenen Keimen in Lebensmitteln mit herkömmlichen kulturellen Methoden ist in manchen Matrices schwierig. Die PCR (Polymerase Kettenreaktion), eine molekularbiologische Methode, bietet einige Vorteile gegenüber kulturellen Methoden. Es existieren bereits einige kommerziell erhältliche Tests für den Nachweis von Salmonellen, enteropathogenen *E.coli*, Listerien und anderen pathogenen Mikroorganismen mittels PCR.

Vor allem bei der Detektion von enterohämorrhagischen *E.coli* bietet die molekularbiologische Methode neben anderen Vorteilen wie der erhöhten Sensitivität, Verkürzung der Untersuchungszeit, der Wiederholbarkeit oder Vermeidung von zusätzlichen biochemischen Tests, die Möglichkeit, Pathogenitätsfaktoren bzw. deren Gene direkt nachzuweisen. Damit wird es erstmals realisierbar, andere Serotypen als O157 zu detektieren.

Rohmilch und Hackfleisch stellen die beiden Vehikel dar, die für eine Kontamination mit EHEC (enterohämorrhagische *E.coli*) vornehmlich genannt werden. Neben den Virulenzfaktoren *hlyA*, und *eae*, die häufig in enterohämorrhagischen *E.coli* gefunden werden, sind es vor allem die Gene *stx1* (Shiga-like Toxin 1) und *stx2*, die zum Nachweis von Shigatoxin-produzierenden *Escherichia coli* herangezogen werden.

Im Rahmen der Teilnahme an internationalen Ringversuchen (PHLS, Public Health Laboratory Service) ist es gelungen, die entsprechenden Gene nachzuweisen. Campylobacteriosen sind nach den Salmonellosen die am zweithäufigsten gemeldeten bakteriellen Lebensmittelinfektionen in Österreich. Als Hauptrisikofaktoren gilt der Genuß von Rohmilch, und ungenügend erhitztem Geflügel. Für den Menschen pathogen sind die

zwei Species *Campylobacter jejuni* und *Campylobacter coli*.

Die Detektion von *Campylobacter jejuni* bzw. *Campylobacter coli* in Lebensmitteln ist vor allem in der Rohmilch schwierig. Campylobacter bildet sogenannte VBNC (viable-but-nonculturable) Zellen aus, die mit Standard-Kulturmethoden nicht mehr detektiert werden können, obwohl sie unter günstigen Umweltbedingungen potentiell pathogen sein können. Die PCR-Technologie bietet hier die Möglichkeit, auch solche Zellen zu bestimmen. Es wurde eine seminested PCR entwickelt (Manuskript in Vorbereitung), die es erlaubt, mit einem Amplifikationsschritt das *flaA*-Gen von *Campylobacter jejuni* und *Campylobacter coli* nachzuweisen. Dieses Gen codiert für ein Protein des Flagellums von Campylobacter. Das Verfahren beinhaltet eine selektive Voranreicherung (modifizierte Campylobacter Selektivbouillon CCDA nach PRESTON), Extraktion der genomischen DNA, Amplifikation der Genabschnitte, Visualisierung der DNA-Fragmente durch Gelelektrophorese.

Anhand von Geflügel- und Rohmilchproben konnte gezeigt werden, dass das seminested PCR-System geeignet ist, die Kontamination mit *Campylobacter jejuni* und *Campylobacter coli* zu ermitteln.

Nachfolgende *Abbildung 1* zeigt, dass mit der Standard-Kulturmethode (selektive Voranreicherung in modifizierter Campylobacter Selektivbouillon CCDA nach PRESTON, Isolierung mit Campylobacter blood-free selective Agar, Bestätigung durch Latex-Agglutination mit Dryspot Campylobacter Test) im Falle von Rohmilch keine Campylobacteriaceen isoliert werden konnten. Mit der molekularbiologischen Methode jedoch konnten 4 von 31 Proben (12,9 %) als kontaminiert bestimmt werden.

Die Geflügelproben setzten sich zusammen aus ganzem Geflügel, Geflügelkeulen, Hühnerbrust, Hühnerfilet, und Hühnerflügel. Mit Kulturmethoden gelang es, *Campylobacter ssp.* in 6 von 30 Proben zu detektieren (20 %). Mit der molekularbiologischen Methode hingegen war die Anzahl der positiven Proben 19 (63 %). Es konnte sowohl im ganzen Geflügel, als auch in Geflügelteilen *Campylobacter* nachgewiesen werden.

Mit der PCR-Technologie werden auch tote Zellen erfasst. Es ist daher nicht möglich, Aussagen darüber zu machen, ob die Proben, in denen mit der kulturellen Methode kein Campylobacter detektiert wurde, noch potentiell pathogen sind. Es könnte sich um VBNC-Zellen handeln, die kulturell nicht mehr isoliert werden können, aber bei Inkorporation Durchfall verursachen können.

Es könnte sich aber auch um bereits tote Mikroorganismen handeln, die kein Risiko mehr darstellen.

Die Kontamination dieser Proben mit Campylobacter, und damit die Kontamination dieser Betriebe steht jedoch außer Zweifel, sodass mit entsprechenden Nachproben die kulturelle Bestätigung gelingen kann.

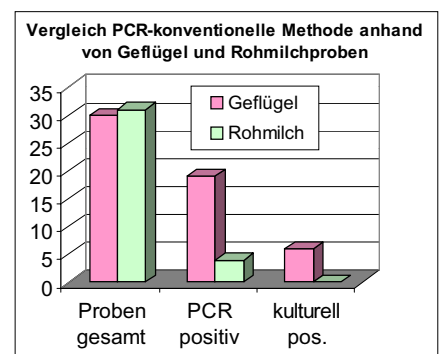


Abbildung 1: Nachweis von *Campylobacter jejuni* und *Campylobacter coli* in Rohmilch- und Geflügelproben

Autoren: Dr. Elisabeth KLINGSBICHEL, Bundesanstalt für Lebensmitteluntersuchung, Technikerstr. 70, 6020 INNSBRUCK