

Aus dem Institut für Lebensmittelhygiene
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

**Bakterieller und viraler
Kontaminationsstatus von Pazifischen
Felsenaustern (*Crassostrea gigas*)-
einjähriges Monitoring des „Berliner
Angebots“**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Katharina Bärbel Inge Möhl
Tierärztin aus Northeim

Berlin 2008
Journal-Nr.: 3233

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Leo Brunnberg
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Goetz Hildebrandt
Zweiter Gutachter: PD Dr. Kerstin Borchers
Dritter Gutachter: PD Dr. Lüppo Ellerbroek

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

oysters, food contamination, microbial contamination, norovirus, hepatitis a virus, polymerase chain reaction

Tag der Promotion: 08.09.2008

Teilergebnisse der Untersuchungen wurden in einem Vortrag im Rahmen der 47. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft vorgestellt (Garmisch Partenkirchen, 26.-29. September 2006).

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <<http://dnb.ddb.de>> abrufbar.

ISBN: 978-3-86664-472-4

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2008

Dissertation, Freie Universität Berlin

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

Coverbild: © ExQuisine - Fotolia.com

© **mbv** 2008

Nordendstr. 75 - 13156 Berlin – 030-45494866
verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Für Tante Elisabeth

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Literaturübersicht	2
2.1	Vorkommen ausgewählter Erreger in Austern	2
2.1.1	Virale Erreger	2
2.1.2	<i>Salmonella</i> spp.	24
2.1.3	Unspezifischer Keimgehalt und Indikatorkeime	27
2.1.4	Verdauenserreger	32
2.1.5	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	35
2.1.6	RT-PCR	36
2.1.7	Primer	36
2.1.8	Spezifität	37
2.1.9	Sensitivität.....	39
2.1.10	Die Auster	41
2.1.11	Rechtliche Rahmenbedingungen.....	62
3	Materialien und Methoden	65
3.1	Probenmaterial.....	65
3.2	Methoden	66
3.2.1	Probennahme im Betrieb	66
3.2.2	Molekularbiologische Untersuchungen	66
3.2.3	Bakteriologische Untersuchungen	72
4	Ergebnisse	82
4.1	Bakterieller Kontaminationsstatus der untersuchten Proben	82
4.1.1	Aerobe Gesamtkeimzahl.....	82
4.1.2	Aerob wachsende Milchsäurebakterien	83
4.1.3	Laktobazillen	83
4.1.4	Enterobakteriazeen.....	83
4.1.5	Pseudomonaden.....	84

4.1.6	Aeromonaden	84
4.1.7	<i>Clostridium perfringens</i>	85
4.1.8	Koagulase positive Staphylokokken	85
4.1.9	Enterokokken	85
4.1.10	Coliforme Keime	85
4.1.11	<i>Bacillus cereus</i>	85
4.1.12	Hefen	85
4.1.13	Schimmelpilze.....	85
4.1.14	Belastung der Proben mit <i>Escherichia coli</i>	86
4.1.15	<i>Salmonella</i> spp.	86
4.1.16	<i>Listeria monocytogenes</i>	86
4.2	Viraler Kontaminationsstatus der untersuchten Proben.....	87
4.2.1	Nachweis von Norovirus-RNA	87
4.2.2	Nachweis von Hepatitis A-Virus-RNA	87
5	Diskussion	88
5.1	Mikrobielle Belastung der untersuchten Proben	88
5.1.1	Verderbserreger.....	88
5.2	Nachweis von Indikatorkeimen	89
5.2.1	Bakterien als Indikatorkeime	90
5.3	Art und Herkunft des Probenmaterials.....	91
5.4	Materialien und Methoden	93
6	Schlussfolgerungen	96
6.1	Belastung der Austern mit Noro- und Hepatitis A-Viren.....	96
6.2	Nachweis von Indikatorkeimen	98
6.2.1	Bakteriophagen als Indikatoren einer fäkalen Kontamination.....	99
7	Zusammenfassung	102
7.1	Bakterieller und viraler Kontaminationsstatus von Pazifischen Felsenaustern - einjähriges Monitoring des „Berliner Angebots“	102

8	Summary	104
8.1	Bacterial and viral contamination of Pacific Rock Oysters (<i>Crassostrea gigas</i>) – one year monitoring of the “Berlin-Supply”	104
9	Literatur	106
10	Anhang	126
10.1	Nährmedien und Reagenzien für die bakteriologische Untersuchung	126
10.1.1	Herstellung der Nährböden, Verwendung.....	126
10.1.2	Nähr- und Differenzierungsmedien für die bakteriol. Untersuchungen	127
10.1.3	Geräte und Verbrauchsmaterialien für die bakteriologische Untersuchung.....	153
10.2	Geräte und Materialien für die molekularbiologischen Untersuchungen	154
10.2.1	Probenaufbereitung	154
10.2.2	RNA-Extraktion	154
10.2.3	RT-PCR	154
10.2.4	Amplifikationskontrolle	155
10.2.5	Norovirus Real-Time PCR	157
10.2.6	HAV Real-Time PCR	158
10.2.7	Positivkontrollen.....	158
10.3	Geräte und Verbrauchsmaterialien für die molekularbiol. Untersuchungen	158
10.4	Ergebnistabellen	160
10.5	Abbildungsverzeichnis	179
10.6	Tabellenverzeichnis	180
11	Danksagung	181
12	Selbständigkeitserklärung	182

Abkürzungsverzeichnis

- °C Grad Celsius
- µg Mikrogramm
- µl Mikroliter
- Abb. Abbildung
- Abs. Absatz
- bp Basenpaare
- bzw. beziehungsweise
- C. *Clostridium*
- ca. circa
- CDC Centers for Disease Control and Prevention
- cm Zentimeter
- DAP Deutsches Akkreditierungssystem Prüfwesen GmbH
- DGHM Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie
- d. h. das heißt
- DNA desoxyribonucleid acid (Desoxyribonukleinsäure)
- dNTP Desoxynukleotidtriphosphat
- E. *Escherichia*
- et al. et alii
- evtl. eventuell
- EWG Europäische Wirtschaftsgemeinschaft
- FAO Food and Agricultural Organization
- g Gramm
- GG Genogruppe
- GKZ Gesamtkeimzahl
- h Stunde
- HAV Hepatitis A-Virus
- ICMSF International Commission on Microbiological Specifications for Foods

- ISO International Organization
for Standardization
- kB Kilobasen
- KbE Kolonie bildende Einheiten
- kd Kilodalton
- kg Kilogramm
- l Liter
- LFGB Lebensmittel-, Bedarfsgegen-
stände- und Futtermittelgesetz-
buch
- m Meter
- M Molar
- mg Milligramm
- min Minute
- Mio. Millionen
- ml Milliliter
- mm Millimeter
- mMol Millimol
- MPN Most Probable Number
- mRNA Messenger RNA
- µl Mikroliter
- NV Norovirus
- nm Nanometer
- ORF Open Reading Frame
- PCR Polymerase chain reaction
- pfu Plaque Forming Unit
- pH pondus hydrogenii
- pmol Pikomol
- ppm parts per million
- ppt parts per trillion
- resp. respective
- RKI Robert Koch Institut
- RNA ribonucleic acid (Ribonuklein-
säure)
- RT Reverse Transkriptase
- S. *Salmonella*
- sec Sekunde
- sog. so genannt

- spp. Spezies
- *Staph.* *Staphylococcus*
- STIKO Ständige Impfkommission des
RKI
- Tab. Tabelle
- u. und
- u. a. unter anderem
- v. a. vor allem
- vgl. vergleiche
- VO Verordnung
- WHO World Health Organisation
- z. B. zum Beispiel

1 Einleitung

Die Aquakultur befasst sich mit der kontrollierten Aufzucht von aquatischen, im Wasser lebenden Organismen. Diese umfassen per definitionem nicht nur Fische, sondern auch Muscheln, Krebstiere und Pflanzen, insbesondere Algen. Seit 1970 ist die Aquakultur - im Vergleich zur Fischerei auf der einen Seite und der traditionellen Landwirtschaft auf der anderen Seite - der am schnellsten wachsende Sektor in der Nahrungsmittelproduktion. Auch Austern aus Aquakulturen stellen einen wichtigen Wirtschaftszweig dar und die Produktionszahlen in diesem Bereich steigen weltweit stetig weiter. Die Spezies mit dem größten, globalen Produktionsvolumen in der Aquakultur ist die Pazifische Felsenauster *Crassostrea gigas*. Gerade ihre Vermehrung in großem Umfang birgt in vielen Fällen ernsthafte mikrobiologische Risiken, zum einen wegen der hohen Kontaminationsgefahr und zum anderen wegen der leichten Verderblichkeit von Schalentieren. Als mikrobiologische Hazards kommen bakterielle und virale Erreger in Frage. Eine Kontamination ist sowohl im Erzeugungsgebiet, aber auch beim Transport, der Weiterbehandlung und der Lagerung der Tiere denkbar.

Erst die Entwicklung der PCR-Technik ermöglichte es, in den letzten Jahren auch Virusnachweise in größerem Umfang durchzuführen. Mit Hilfe solcher Statuserhebungen können epidemiologisch relevante Daten zu Vorkommen und Bedeutung virusassoziierter Lebensmittelvergiftungen gewonnen werden. Dabei stehen sowohl Infektionen mit Hepatitis A-Viren als auch Norovirusinfektionen im Mittelpunkt des Interesses, zumal Infektionen mit diesen Erregern in Deutschland als meldepflichtige Erkrankungen durch das Infektionsschutzgesetz (IfSG) erfasst werden. Seit der Einführung der Meldepflicht für Noroviruserkrankungen beim Menschen weisen die steigenden Zahlen der nachgewiesenen Fälle auf die erhebliche Bedeutung dieses pathogenen Agens hin.

Angesichts des hohen Risikos galt die vorliegende Erhebung sowohl dem Nachweis von Noro- und Hepatitis A-Viren, als auch der Erfassung des bakteriellen Keimstatus in Pazifischen Felsenaustern (*Crassostrea gigas*). Gleichzeitig wurden beim Nachweis der Noroviren verschiedene PCR Nachweismethoden gegenübergestellt und bezüglich ihrer Sensibilität und Sensitivität miteinander verglichen.

2 Literaturübersicht

2.1 Vorkommen ausgewählter Erreger in Austern

2.1.1 Virale Erreger

2.1.1.1 Noroviren als Auslöser von Gastroenteritiden beim Menschen

Gastroenteritiden stellen weltweit eines der wichtigsten Gesundheitsprobleme dar. Mit der Einführung neuer, sensitiver Untersuchungsmethoden zeigte sich, dass Noroviren Hauptverursacher von Ausbrüchen akuter, nichtbakterieller Gastroenteritiden beim Menschen sind. Bis zu 93 % dieser Erkrankungen bei Erwachsenen, etwa 30 % bei Kindern und 60-85 % aller Ausbrüche humaner Gastroenteritiden innerhalb der Vereinigten Staaten, Europa und Japan konnten auf Noroviren zurückgeführt werden (LOPMAN et al. 2003, FANKHAUSER et al. 2002, INOUE et al. 2000). Besonders Einrichtungen der Gemeinschaftsverpflegung, Gemeinschaftseinrichtungen wie Altenheime, Schulen, Kranken- und Waisenhäuser, Kindertagesstätten und im besonderen Maße auch Kreuzfahrtschiffe sind von den Ausbrüchen gefährdet (WIDDOWSON et al. 2004, GREEN et al. 2002, FANKHAUSER et al. 2002, GLASS et al. 2000). Anders als bei Infektionen mit Rotaviren sind alle Altersgruppen betroffen (DE WIT et al. 2001, SETHI et al. 1999). Nach den Daten des Infektionsschutzgesetzes in Deutschland erkranken jedoch Kinder unter 5 Jahren und ältere Personen über 70 Jahre besonders häufig (RKI 2007). Das Virus ist hochkontagiös und hinterlässt nur eine kurze Immunität. Des Weiteren schützen die Antikörper gegen einen Stamm nicht zwangsläufig auch vor einer Infektion mit einem anderen, heterologen Stamm (MATSUI und GREENBERG 2000, PARRINO et al. 1977). Wiederholt auftretende Norovirus-Infektionen bei Erwachsenen sprechen ebenfalls dafür, dass es nicht zu einer dauerhaften und belastbaren Immunität kommt (FANKHAUSER et al. 2002, ROCKX et al. 2002). Derzeit ist keine Vaccine erhältlich, die Schutz vor einer Infektion bietet (ESTES et al. 2000).

Noroviren verfügen über eine ausgeprägte Umweltstabilität, bleiben auf Oberflächen für Wochen bis Monate lebensfähig und besitzen nur eine eingeschränkte Empfindlichkeit gegenüber Desinfektionsmitteln. Der Erreger überlebt 0°C, 60°C und Chlorierung von 10 ppm.

2.1.1.1.1 Erreger

Noroviren, vor 2004 noch als „Norwalk-Like“-Viren bezeichnet, wurden 1972 entdeckt (DOLIN et al. 1972 und KAPIKIAN et al. 1972) und gehören zur Familie der *Caliciviridae* (VAN REGENMORTEL et al. 2000). Ihr Familienname leitet sich vom griechischen κάλυκας für Kelch ab und weist auf die tassenförmig vertieften Strukturen der Icosaederseitenflächen hin (s. Abbildung 1).

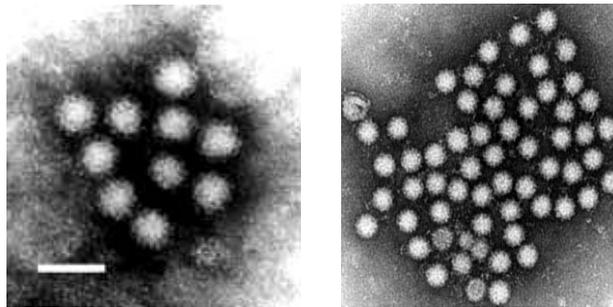


Abbildung 1: Noroviren im elektronenmikroskopischen Bild. © 1994 Veterinary Sciences Division, F.P. Williams, US EPA

Die Familie wird in vier Genera unterteilt: Die Genera Vesivirus und Lagovirus umfassen nur tierpathogene Erreger. Humanpathogene Viren sind gemäß einer Festsetzung des „International Committee on Taxonomy of Viruses“ (ICTV) den Gattungen Norovirus (NV) und Sapovirus (SV) zugeordnet. Die Genera unterscheiden sich vor allem in ihrem Genomaufbau. Eine direkte Serotypisierung ist nicht möglich, da die Züchtung in Zellkultur bei den humanpathogenen Caliciviren zurzeit noch nicht möglich ist (DUIZER et al. 2004).

Noroviren besitzen einen Durchmesser von 35 bis 39 nm. Im elektronenmikroskopischen Bild weisen sie eine unscharfe, fast runde Struktur auf. Sie besitzen, wie alle Vertreter der Familie, ein unbehülltes, ikosaedrisches Kapsid, welches aus 180 Einheiten eines Proteins besteht und ein Molekulargewicht von 59 kD besitzt. Neben diesem Kapsidprotein kann man von den Partikeln ein lösliches Polypeptid mit einem Molekulargewicht von 30 kD gewinnen. Hierbei handelt es sich um ein proteolytisch erzeugtes Fragment des Kapsidproteins, dessen Funktion unbekannt ist.

Das Genom der Noroviren besteht aus einer einzelsträngigen RNA mit positiver Polarität. Es ist an den 3' Enden polyadenyliert und weist eine Länge von etwa 7,5 kB auf. An den 5'-Enden der RNA ist kovalent ein kleines, viruscodiertes Protein gebunden, das dem VPG der Picornaviren entspricht (VPG = virales Protein, genomassoziiert) (s. 2.1.1.2.1).

In den 5'- und 3'-Bereichen der genomischen RNA befinden sich kurze, nicht translatierbare Sequenzfolgen. Die Anordnung der offenen Leserahmen unterscheidet die Vertreter der unterschiedlichen Gattungen. Bei den Noroviren findet man drei getrennte ORF (Open Reading Frames). ORF1 ist für die Synthese des Vorläuferproteins der Nichtstrukturproteine verantwortlich. Es wird durch die Aktivität einer Serinprotease autokatalytisch gespalten, wodurch neben der Protease für das VPG-Protein auch eine Helicase und die RNA-abhängige RNA-Polymerase entstehen. Letztere ist für die Synthese der Negativstranggenome verantwortlich, von denen im Replikationszyklus die RNA-Genome der Nachkommenviren abgelesen werden. ORF2 und ORF3 codieren das Major (VP1) und Minor (VP2) Kapsidprotein (GREEN et al. 2001). Das VP1-Protein bildet zwei Domänen: P (protruding, P1 und P2) und S (shell). Die meisten zellulären Interaktionen und immunologischen Reaktionen finden dabei wohl an der P2 Subdomäne statt, die über die virale Oberfläche hinausragt (CHAKRAVARTY et al. 2005). Das Kapsidprotein bildet also nicht nur ein äußeres Stützgerüst für das Virus, sondern enthält darüber hinaus Bindungsstellen und Determinanten zur viralen Pheno- und Serotypisierung. Die Funktion des VP2 steht mit der up-Regulierung der VP1 Expression und der Stabilisation des VP1 in der Virusstruktur in Verbindung (BERTOLOTTI-CIARLET et al. 2003).

Wie die meisten einzelsträngigen RNA-Viren weisen Noroviren eine ausgeprägte Genomvariabilität auf (KATAYAMA et al. 2002, ANDO et al. 2000, GREEN et al. 2000). Sie zeigen Antigendrift und auch Antigen shift durch genetische Rekombination zwischen den unterschiedlichen Stämmen. Antigen shift bezeichnet den Austausch genetischer Informationen zwischen verschiedenen Virusarten oder -subtypen. Dazu müssen die Viren ein segmentiertes Genom besitzen, damit einzelne Segmente zwischen den Viren innerhalb der gleichen Zelle während der Vermehrung ausgetauscht werden können; der genetische Vorgang selbst wird *reassortment* bzw. Reassortierung genannt. Antigendrift ist die langsame, kontinuierliche und punktuelle Veränderung von immunitätsbildenden Oberflächenstrukturen (Antigenen) von Viren. Im Gegensatz zur Antigen shift passiert die Antigendrift zufällig und in kleinerem Rahmen durch Kopierfehler (Punktmutationen) während der Replikation. Als Folge der Entwicklung der Reverse Transkription Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) und Gensequenzierung ist es heute möglich, die Viren voneinander zu unterscheiden und Verwandtschaftsgrade zwischen den einzelnen Stämmen zu erkennen und zu verstehen (KATAYAMA et al. 2002, ANDO et al. 2000).

Bisher konnten fünf Norovirus Genogruppen durch molekulare Charakterisierung der kompletten Kapsid-Gensequenzen unterschieden werden (KARST et al. 2003, OLIVER et al. 2003, FANKHAUSER et al. 2002). Die Noroviren der Genogruppen III und V wurden in Mäusen und Kühen gefunden. Die Stämme der Genogruppen I, II und IV wurden mit Ausnahme des Stammes GII/11 (porciner Stamm) beim Menschen nachgewiesen. Dabei sind ausschließlich Genotypen der Genogruppe I und insbesondere der Genogruppe II am Norovirus-Infektionsgeschehen beteiligt. Die Erfassung der Zirkulation von Genotypvarianten ist Gegenstand weltweiter Untersuchungen. Besonders auffallend war, dass der Anstieg in den Saisons 2002/03, 2004/05, 2006/07 fast ausschließlich mit dem Auftreten antigener Driftvarianten des Genotyps GII/4 korrelierte. In den Wintern mit niedrigerer Norovirus-Aktivität wurde das Ausbruchsgeschehen stets durch die Kozirkulation differenter Genotypen der Genogruppe I und II bestimmt. Für Januar 2008 zeigen die bisherigen Daten des RKI, dass fast ausschließlich nur noch Driftvarianten des Genotyps GGII/4 das Infektionsgeschehen bestimmen. Somit sind erneut antigene Driftvarianten des Genotyps GII/4 für die erhöhten Norovirus-Infektionen verantwortlich (RKI 2008). Der Mensch stellt für alle genannten Norovirus-Stämme das einzige Reservoir dar. Wie in Abbildung 2 dargestellt, wurden bisher 14 verschiedene Genotypen in der Genogruppe GI und 17 Genotypen in der Genogruppe GII anhand von Kapsid-Gensequenzen identifiziert (KAGAYAMA et al. 2004).

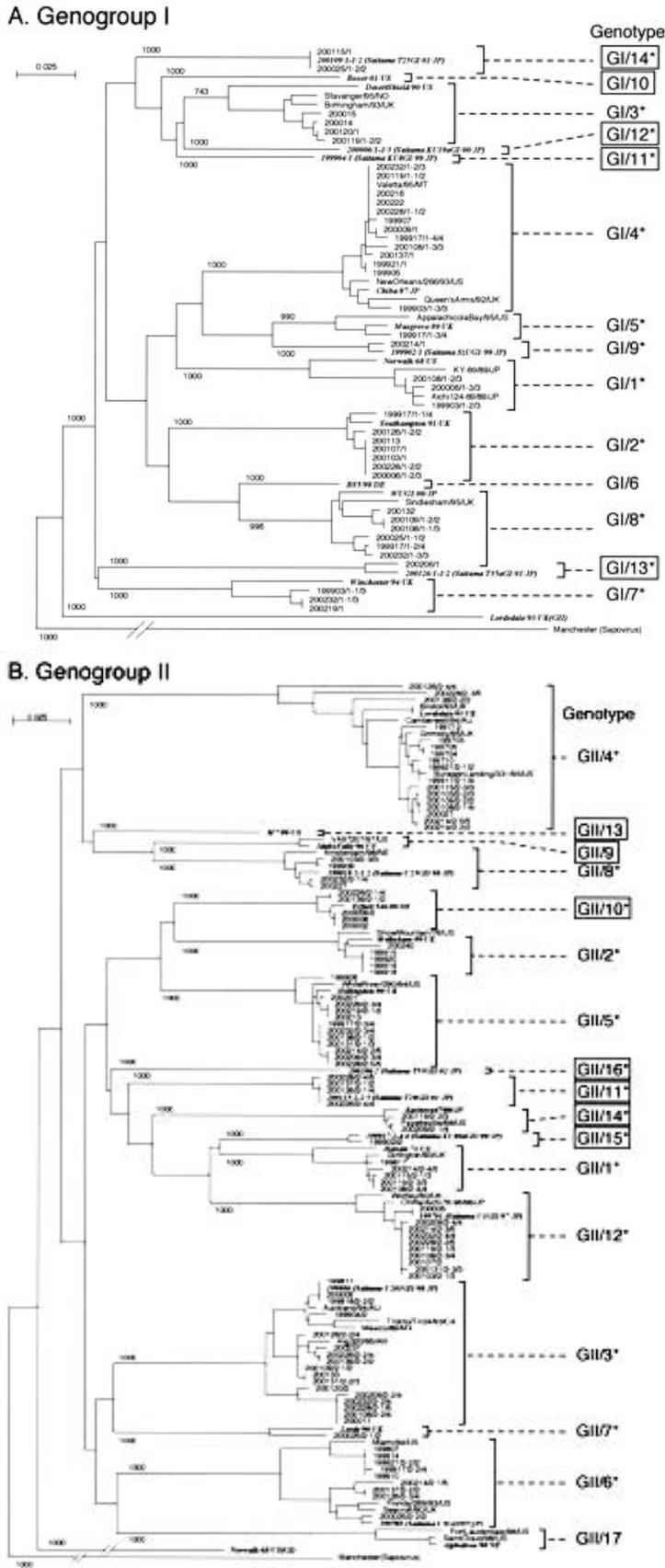


Abbildung 2: Phylogenetisches Dendrogramm der Norovirus Genogruppen I und II. Die Einteilung basiert auf der genetischen Variabilität in der Kapsid N-terminal/shell (N/S) Domäne (KAGAYAMA et al. 2004).

Den initialen Schritt im Vermehrungszyklus bildet die Translation der Nichtstrukturproteine unter Verwendung des Plusstrang-RNA-Genoms als mRNA. Durch autokatalytische Spaltung desselben entsteht die virale RNA-abhängige RNA-Polymerase mit Hilfe derer dann vom Virusgenom zwei unterschiedliche Kopien des Negativstrangs gebildet werden: ein Gegenstrang zur genomischen RNA, der als Matrize für die Synthese der neuen Virusgenome dient, sowie eine Kopie, welche die Bereiche zum 3'-Ende des Genoms orientierten Leserahmen überspannt und etwa 2.500 Basen umfasst. Von diesen subgenomischen RNA-Negativsträngen werden die subgenomischen mRNAs gebildet, von denen dann die Kapsidproteine und das Protein des Leserahmens ORF3 translatiert werden. Die Kapsidproteine verbinden sich zu Vorstrukturen der Viruspartikel, in welche dann die virale RNA eingelagert wird (MODROW et al. 2003a)

2.1.1.1.2 Vorkommen und Auftreten in Deutschland

Noroviren sind weltweit verbreitet. Infektionen treten ganzjährig mit einer saisonalen Häufung in den Monaten Oktober bis März auf. Nach der Einführung des IfSG wurden dem RKI bis Ende 2006 293.994 Norovirus-Infektionen nach Referenzdefinition übermittelt. In der Saison 2001/2002 waren es 14.423 gemeldete Infektionen. In der folgenden Saison 2002/2003 wurden dem RKI bereits 5mal so viele Infektionen berichtet (n = 72.329). 2003/2004 ist die Fallzahl dann auf mehr als die Hälfte zurückgegangen, lag jedoch doppelt so hoch wie in der Saison 2001/2002 (n = 29.918). Das RKI führte die Häufung in diesem Jahr auf die neu zirkulierende Virusvariante Jam(boree)-II/4 zurück (RKI 2004).

Wie schnell sich hocheffektive Infektionsketten beim Menschen ausbilden können, zeigen die Zahlen des Robert-Koch-Instituts aus dem Jahre 2006 (s. Abbildung 3). Hier kam es ab der 40. Kalenderwoche binnen drei Wochen zu einer Verdreifachung der Ausbrüche in Deutschland. Zwischen der 40. und 43. Meldewoche ist die Zahl der wöchentlich übermittelten Erkrankungen von 378 auf 1.315 gestiegen (RKI 2007). Zudem ist von einer erheblichen Untererfassung der Erkrankungen auszugehen, da die Zahl der Patienten, die keinen Arzt aufsuchen oder deren Erkrankung nicht labordiagnostisch abgeklärt wird, sehr hoch ausfällt. Die ausgeprägte Variabilität des Virus-Genoms erschwert zudem den Nachweis und trägt zu einer raschen Verbreitung des Erregers in der Bevölkerung bei.

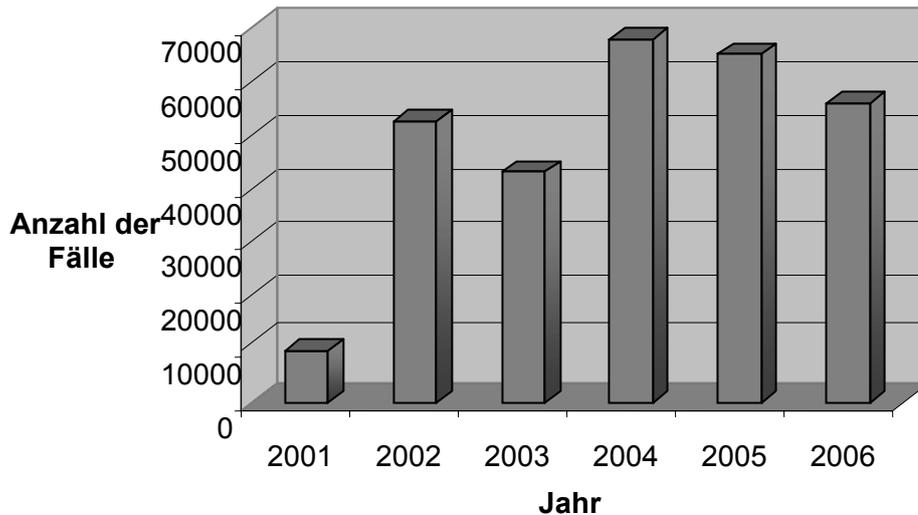


Abbildung 3: Gemeldete Norovirus-Fälle in Deutschland (Daten: RKI 2001-2006)

2.1.1.1.3 Reservoir und Übertragung

Der Mensch stellt das einzige Reservoir für die humanpathogenen Norovirus-Stämme dar (DE WIT et al. 2001, SETHI et al. 1999). Ein Zusammenhang zwischen den tierpathogenen Caliciviren Vesivirus und Lagovirus und den Erkrankungen beim Menschen besteht bisher nicht (RKI 2007).

Die Viren werden von den Erkrankten sehr zahlreich mit dem Stuhl oder Vomitus ausgeschieden (HÖHNE und SCHREIER 2004). Auch nach Abklingen der klinischen Symptome scheiden die Patienten für etwa 48 Stunden, im Einzelfall auch bis zu drei Wochen, Virusteilchen aus. Die häufigste Kontaminationsquelle stellen somit fäkale Partikel und Vomitusteilchen dar (MÄDE et al. 2006). Die infektiöse Dosis liegt bei etwa 10-100 Viruspartikeln (BREESE et al. 2002, KRUSE et al. 2002).

Neben der Übertragung von Mensch zu Mensch zählen kontaminierte Lebensmittel und Trinkwasser zu den möglichen Infektionsquellen (MEAD et al. 1999, CLIVER 1997). Die Zahl der Erkrankungen, die sich auf eine Infektion mit kontaminierten Lebensmitteln oder Trinkwasser zurückzuführen lässt, ist nicht genau bekannt (CROEMANS 1997). Man rechnet jedoch mit 16 % bis zu 57 % der Gesamtfallzahl (FANKHAUSER et al. 2002, MEAD et al. 1999).

2.1.1.1.4 Klinische Symptomatik

Die durch humanpathogene Caliciviren verursachten Gastroenteritiden verlaufen überwiegend mild und transient. Die Krankheitsdauer beträgt zwei bis drei Tage (MODROW et al. 2003a). Die Infektionen zeichnen sich zudem durch eine kurze Inkubationszeit (6-50 Stunden), schwallartiges Erbrechen und heftige Diarrhöe in hoher Frequenz aus (GOTZ et al. 2001, KAPLAN et al. 1982, ADLER et al. 1969). Die Körpertemperatur ist dabei meist normal oder nur leicht erhöht, häufig treten Kopfschmerzen, Mattigkeit und abdominale Schmerzen auf. Es sind zudem leichte und asymptomatische Verläufe dokumentiert.

2.1.1.1.5 Diagnostik

Für den Nachweis von Noroviren stehen heute drei verschiedene Methoden zur Verfügung:

- Amplifikation viraler Nukleinsäuren (RT-PCR)
- Nachweis viraler Proteine (Antigen-EIA)
- Elektronenmikroskopischer Nachweis von Viruspartikeln

Die RT-PCR bietet ein ausreichend sensitives und spezifisches System zur Detektion von Noroviren in humanen Stuhlproben sowie auch in Umgebungs- und Lebensmittelproben. Durch die Einführung entsprechender Nachweise mittels der Real-Time PCR können Diagnosen heute auch innerhalb kürzester Zeit erbracht werden, was gerade bei einem Ausbruch von entscheidender Bedeutung ist. Zudem besteht die Möglichkeit, PCR Produkte zu sequenzieren und so wichtige epidemiologische Zusammenhänge zu erfassen.

Generell sollten alle Patienten, die unter akuter Diarrhöe leiden (auch ohne Erbrechen) auf Noroviren untersucht werden, sofern keine andere Ursache für die Symptome bekannt ist. Insbesondere bei Häufungen von Durchfall und Erbrechen in Gemeinschaftseinrichtungen, Krankenhäusern, Kindertagesstätten und Altenheimen sollte eine schnellstmögliche Diagnose erfolgen um die unter 2.1.1.1.2 beschriebene rasche Ausbreitung der Viren zu verhindern.

2.1.1.1.6 Präventive Maßnahmen

Da eine Impfung nicht zur Verfügung steht, ist die konsequente Einhaltung der allgemeinen Hygieneregeln im Falle einer Infektion mit Noroviren von besonderer Bedeutung. Gerade in der symptomatischen Phase sind diese Hygienemaßnahmen laut Ratgeber des RKI auszuweiten: Absonderung erkrankter Personen, ggf. Kohortenisolierung, Tragen von Handschuhen, Schutzkittel, ggf. geeigneter Atemschutz zur Vermeidung einer Infektion in Zusammenhang mit Erbrechen, konsequente Händehygiene, Händedesinfektion, Desinfektion von Oberflächen, Bedarfsgegenständen, Toiletten, Waschbecken und Türgriffen. Bei der Desinfektion ist darauf zu achten, dass es sich um ein Präparat mit nachgewiesener viruzider Wirksamkeit handelt (RKI 2007). Um eine Infektion mit kontaminierten Nahrungsmitteln zu verhindern, sollten alle zu erhitzen Speisen gut durchgegart sein. Roh zu verzehrende Nahrungsmittel sollten gründlich gewaschen werden. Auch eine Rekontamination der Speisen nach der Zubereitung durch infiziertes Küchenpersonal und kontaminierte Bedarfsgegenstände muss unbedingt vermieden werden.

2.1.1.1.7 Gesetzliche Grundlagen

Eine Meldepflicht für humane Noroviruserkrankungen besteht in Deutschland seit dem 01. Januar 2001. Für Leiter von Laboratorien ist somit nach § 7 IfSG der direkte Nachweis von Noroviren meldepflichtig. Für Ärzte sind nach § 6 IfSG Krankheitsverdacht und Erkrankung an einer akuten infektiösen Gastroenteritis meldepflichtig, wenn der Patient eine Tätigkeit im Sinne des § 42 IfSG ausübt oder wenn zwei oder mehr gleichartige Erkrankungen auftreten, bei denen ein epidemiologischer Zusammenhang wahrscheinlich ist oder vermutet wird. Nach § 34 Abs. 1 IfSG dürfen Kinder unter 6 Jahren, die an einer infektiösen Gastroenteritis erkrankt sind oder im Verdacht stehen, erkrankt zu sein, Gemeinschaftseinrichtungen nicht besuchen. Frühestens zwei Tage nach dem Abklingen der klinischen Symptome braucht die Öffentlichkeit nicht mehr gemieden werden.

Ebenso dürfen erkrankte Personen nicht in Lebensmittelberufen (lt. § 42 IfSG) tätig sein.

2.1.1.2 Virale Hepatitis A

Die virale Hepatitis A wird unter dem Synonym der „Gelbsucht“ (*gr. ἰκτερος*, engl. jaundice), bereits in antiken griechischen, römischen und chinesischen Schriften erwähnt. Der Begriff der Hepatitis A wurde durch KRUGMAN et al. 1967 eingeführt. Das Virus selbst wurde erstmals 1973 aus den Stuhl infizierter Personen isoliert und elektronenmikroskopisch dargestellt (FEINSTONE et al. 1973). Seit diesem Zeitpunkt haben sich die diagnostischen Verfahren zur Detektion des Virus kontinuierlich weiterentwickelt (NAINAN et al. 2006).

In unzähligen Studien konnten Infektionen mit HAV mit dem Konsum fäkal kontaminierter Nahrungsmittel und Trinkwasser in Verbindung gebracht werden (KURITSKY et al. 1985, ROSENBLUM et al. 1990, WARNER et al. 1991, HERNÁNDEZ et al. 1997, GAULIN et al. 1999, NYGÁRD et al. 2001). Infektionen treten sporadisch, endemisch oder in Form von Epidemien auf. Obwohl das Virus weltweit verbreitet ist, hängt die Inzidenz in den einzelnen Ländern stark von der sozioökonomischen Entwicklung ab. Studien haben gezeigt, dass die Prävalenz eine Variationsbreite von 15 % in den Industrienationen und bis nahezu 100 % in einigen Entwicklungsländern aufweist (s. Abbildung 4). In letzteren machen nahezu alle Menschen die Infektion bereits im Kindes- oder Jugendalter durch und erwerben so eine lebenslange Immunität (WHO 2003). Im Gegensatz dazu weisen, trotz einer verfügbaren Schutzimpfung, immer mehr Menschen in den Industrienationen keine Immunität gegen HAV auf. Diese Personen sind bei Reisen in Länder mit hoher HAV Verbreitung stark infektionsgefährdet. Die Krankheit hat sich somit in den letzten Jahren laut den Daten des RKI in Deutschland zu einer typischen Reiseerkrankung entwickelt, die in 40-50 % aller gemeldeten Fälle lag vorlag (RKI 2005).

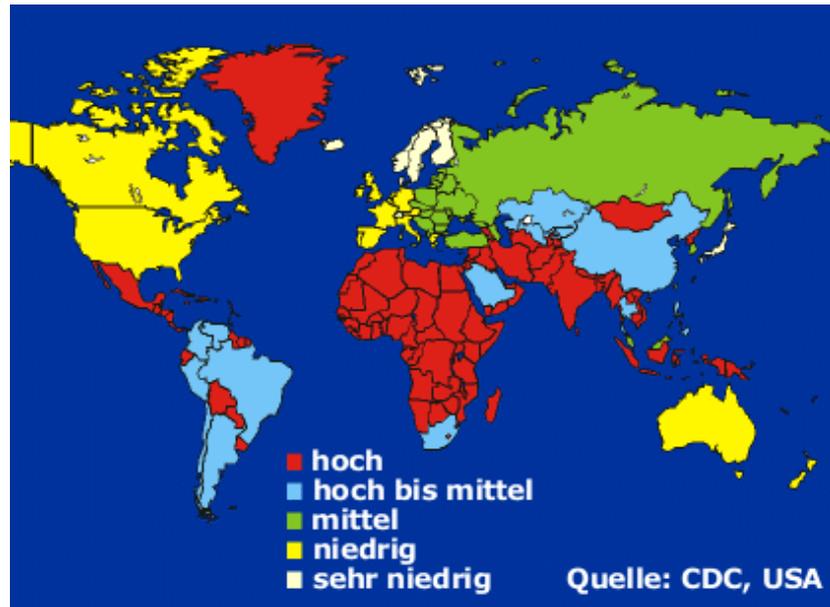


Abbildung 4: Prävalenz von Hepatitis A-Erkrankungen im weltweiten Vergleich (Quelle: CDC)

2.1.1.2.1 Erreger

Das Hepatitis A-Virus, einziger Vertreter des Genus Hepatovirus, ist ein einzelsträngiges, unbehülltes RNA-Virus mit einem Durchmesser von 27-28 nm aus der Familie der *Picornaviridae* (HOLLINGER und EMERSON 2001). Durch die Plusstrangorientierung des Genoms können Virusproteine direkt, d.h. ohne einen Zwischenschritt, von der RNA translatiert werden. Die bisher unbenannten "Avian encephalomyelitis-like viruses" wurden zunächst vorübergehend in diesem Genus eingruppiert. Eine endgültige Klassifikation steht noch aus.

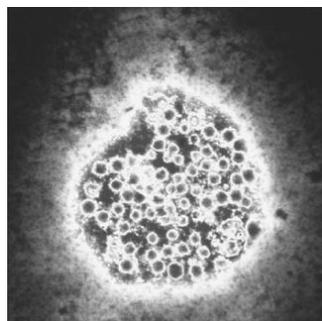


Abbildung 5: Hepatitis A-Virus 225,000fach vergrößert (Quelle: Custom Medical Stock)

Alle Picornaviren haben einen sehr ähnlichen Aufbau: sie sind unbehüllt und verfügen über ein ikosaedrisches Nukleokapsid mit einem Durchmesser von etwa 30 nm. Die Kapside bestehen aus vier Virusproteinen: VP1, VP2, VP3 und VP4. Ein fünftes Virusprotein, VP0, findet sich nur unregelmäßig. Es stellt einen Vorläufer von VP2 und VP4 dar, die erst durch proteolytische Spaltung aus diesem entstehen. Die Virionen bestehen aus je 60 Einheiten der Proteine VP1-4 (MODROW et al. 2003b), wobei das VP4, welches an der Innenseite der Partikel lokalisiert ist, bei den Hepatoviren sehr klein ist (21-23 Aminosäuren) und bisher noch nicht direkt nachgewiesen werden konnte (MARTIN und LEMON 2006). VP1-3 bilden die Oberfläche des Ikosaeders. Neuere Studien geben allerdings Anlass zu der Vermutung, dass Hepatitis A-Viren signifikante Strukturunterschiede gegenüber anderen Vertretern der Familie *Picornaviridae* aufweisen (MARTIN und LEMON 2006). HAV kann, im Gegensatz zu anderen Hepatitisviren, erfolgreich in konventionellen Zellkultursystemen vermehrt werden (LEMON 1997). Allerdings bleiben die Möglichkeiten in der Diagnostik sehr beschränkt, da bei Feldstämmen meist mehrere Passagen notwendig sind, um die Viren an das Wachstum in Kultur zu adaptieren. Bei verschiedenen HAV Varianten hat im Zuge dieser Adaption die Virulenz stark abgenommen, weshalb sie für die Produktion von Lebend- und Totimpfstoffen eingesetzt worden sind (LEMON 1997).

Die Virionen der Entero- und Hepatoviren weisen eine sehr hohe Stabilität auf. pH Werte von 3 und darunter führen zu keiner Beeinträchtigung. Auch gegenüber Detergenzien erweisen sich diese Viren als sehr stabil. Freie Viruspartikel können in der Umwelt relativ lange überleben (MODROW et al. 2003b)

Das Genom selber weist eine Länge von etwa 7500 Nukleotiden auf (CRISTINA und COSTA-MATTIOLI 2007). Durch die Positivstrangorientierung können Virusproteine direkt, d.h. ohne einen Zwischenschritt, von der RNA translatiert werden. Das Genom ist also per se infektiös und schon die Aufnahme der gereinigten Nukleinsäure in die Zelle kann eine Erkrankung auslösen (MODROW et al. 2003b). Das Genom enthält einen einzelnen, großen ORF, welcher für ein Polyprotein codiert, das bei allen Virustypen etwa 2100 Aminosäurereste umfasst (MODROW et al. 2003b, LEMON 1997). Man teilt das Polyprotein in drei Bereiche (s. Abbildung 6).

Die Proteine, die durch Spaltung entstehen, ordnet man mit Großbuchstaben den einzelnen Abschnitten zu. Im aminoterminalen Bereich finden sich die Vorläufersequenzen der Kapsidproteine (1A bis 1D), während sich in der Mitte die Nichtstrukturproteine 2A bis 2C befinden. Am carboxyterminalen Ende werden im weiteren Verlauf die enzymatisch aktiven Teile und einige weitere Nichtstrukturproteine gebildet, welche für die RNA Replikation notwendig sind (MODROW et al. 2003b):

es handelt sich um 2B, 2C, 3A und 3B (kovalent an das 5'Ende der genomischen RNA gebunden und wahrscheinlich als Protein Primer für die RNA-Synthese dienend), 3Cpro (eine Cystin Protease, die verantwortlich für die meisten post-translationalen Spaltvorgänge innerhalb des Polyproteins ist) und 3Dpol (die virale RNA-abhängige RNA Polymerase) (CRISTINA und COSTA-MATTIOLI 2007). Gewöhnlich entstehen aus dem Polyprotein elf virale Proteine. An den Bereich der Strukturproteine schließt sich im Polyprotein eine Aminosäuresequenzfolge mit proteolytischer Aktivität an (2A-Protease). Die Protease entfaltet ihre Aktivität cotranslational. Der aminoterminele Teil des Vorläuferproteins wird von dem noch nicht fertig translatierten carboxyterminalen Bereich abgespalten und so das Protomer, der Vorläufer der Strukturproteine, gebildet (MODROW et al. 2003b).

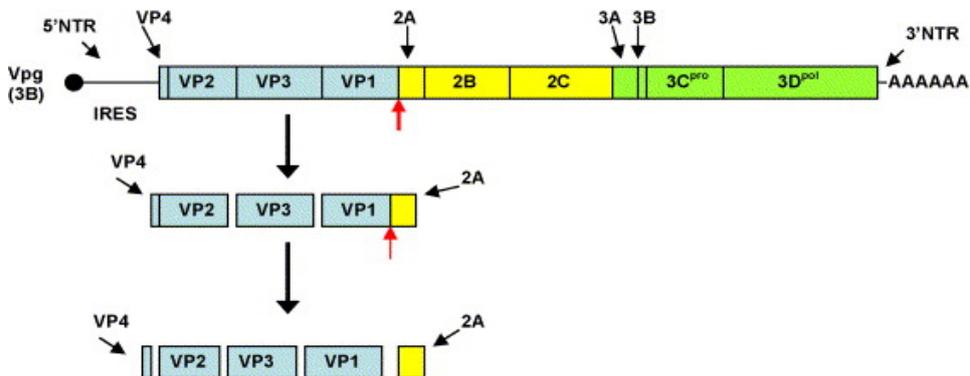


Abbildung 6: Anordnung des HAV Genoms (CRISTINA und COSTA-MATTIOLI 2007)

Abbildung 6 zeigt das HAV Genom. Das RNA Genom mit positiver Polarität enthält einen einzelnen ORF, der für ein Polyprotein codiert, welches dann proteolytisch durch die virale Protease 3Cpro gespalten wird. Eine noch zu identifizierende zelluläre Protease spaltet VP1-2A, markiert durch die roten Pfeile. Strukturproteine (P1) sind blau, Nicht-Struktur-Proteine (P2 und P3) gelb dargestellt (CRISTINA und COSTA-MATTIOLI 2007).

Das Protomer umfasst die Aminosäuren der Kapsidproteine 1A-D; sie entsprechen den Strukturproteinen VP1-4 (MODROW et al. 2003b). Die proteolytische Spaltung durch die am carboxyterminalen Ende des Polyproteins gelegene 3Cpro Protease läuft ebenfalls parallel zur Translation ab. Die Synthese der RNA erfolgt nach dem Zusammensetzen eines großen, makromolekularen Replikase-Komplexes, der die viralen Nicht-Struktur-Proteine enthält, welche das 2B-3Dpol Segment des Polyproteins überspannen. Für diese Vorgänge werden Membranen des zellulären Endoplasmatischen Retikulums genutzt (GOSERT et al. 2000).

Die erste Spaltung des Polyproteins erfolgt an der 2A/2B Verbindungsstelle. Dieser Vorgang wird, anders als bei den übrigen Picornaviren, durch die 3cpro Protease vermittelt (MARTIN et al. 1995). Das daraus entstehende P1-2A Vorläufermolekül wird dann durch die virale Protease weiter gespalten. Es entstehen zwei Kapsid-Vorläuferproteine: VP0 (Vorläufer für VP4-VP2), VP1-2A und das bereits ausgereifte VP3 Kapsidprotein. Die Spaltung von VP0 erfolgt dabei erst im Verlauf der Virusreifung (CRISTINA und COSTA-MATTIOLI 2007). VP1-3 bilden die Seitenflächen des ikosaedrischen, infektiösen Viruspartikels. Die Proteine bestehen dabei aus acht antiparallel angeordneten β -Faltblattstrukturen, die durch Aminosäureschleifen miteinander verbunden und so angeordnet sind, dass die einzelnen Proteine einen keilförmigen Aufbau bekommen.

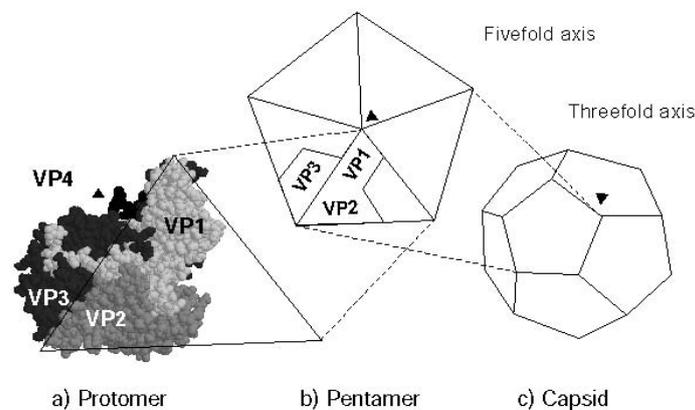


Abbildung 7: Aufbau eines Picornaviruspartikels (CRISTINA und COSTA-MATTIOLI 2007)

a) Jedes Protomer, Vorläufer der Strukturproteine ist aus den proteolytischen Spaltprodukten eines Vorläuferpolyproteins aufgebaut. Die Oberfläche des Virions wird dabei von VP1-3 gebildet, während VP4 an der Innenseite liegt.

b) Je 5 Protomere setzen sich zu einem Pentamer zusammen. Die Faltachse ist durch den Pfeil gekennzeichnet.

c) Ein ikosaedrisches Kapsid setzt sich aus 12 Pentameren zusammen. Eine der 20 Faltachsen ist durch den Pfeil markiert.

(CRISTINA und COSTA-MATTIOLI 2007)

Während des Replikationszyklus von Picornaviren wird eine Abschrift des RNA-Positivstranggenoms in negativer Ausrichtung vorgenommen. Dieses dient dann als Matrize für die Produktion von neuen RNA-Molekülen. Da ein solcher Prozess nicht zur Nukleinsäuresynthese der Zelle gehört, finden sich in ihr auch keine entsprechenden Enzyme, welche diese Reaktion durchführen können.

Das Virus muss dementsprechend für das benötigte Enzym selbst codieren und im Verlauf des Infektionszyklus die Aktivität einer RNA-abhängigen RNA-Polymerase entfalten. Die bereits erwähnte 3D-Polymerase (3Dpol) besitzt eine Länge von 491 Aminosäuren. 3Dpol weist eine relativ hohe Fehlerrate auf, die bei etwa einer Abweichung pro 2200 anpolymerisierten Basen liegt. Hieraus lässt sich folgern, dass jeder neu synthetisierte RNA-Strang etwa vier Mutationen aufweist (MODROW et al. 2003b).

2.1.1.2.2 Verbreitung und Häufigkeit

Verschiedene HAV Genotypen haben eine unterschiedliche geographische Verbreitung (s. Abbildung 8) (NAINAN et al. 2006). Genotyp I besitzt die weltweit höchste Prävalenz, und Sub-Genotyp IA ist weiter verbreitet als IB. In Nord- und Südamerika, Europa, China und Japan herrschen diese Sub-Genotypen vor (COSTA-MATTIOLI et al. 2001a, COSTA-MATTIOLI et al. 2001b, ROBERTSON et al. 1991). Der Stamm PA21 des Sub-Genotyps IIIA (BROWN et al. 1989) wurde ursprünglich aus in Panama gefangenen Nachtaffen isoliert, und man dachte lange, dass sich dieser Stamm ausschließlich bei niederen Primaten findet. Dass er in seinem Aminosäuremuster keine nennenswerten Unterschiede gegenüber den humanen Stämmen aufweist, erkannte man Jahre später bei einer Analyse der Gensequenz (ROBERTSON et al. 1992, NAINAN et al. 1991).

Über eine Co-Zirkulation einzelner Genotypen oder Sub-Genotypen wird aus verschiedenen Regionen berichtet: IA und IB in Südafrika (TAYLOR 1997), Brasilien (VILLAR et al. 2004) und Frankreich (COSTA-MATTIOLI et al. 2001a, COSTA-MATTIOLI et al. 2001b) sowie IA und IIIA in Indien (HUSSAIN et al. 2005).

Frühere Studien an HAV Isolaten aus Zellkulturen zeigten nur eine geringe genetische Variation zwischen den einzelnen Stämmen, was wohl mit einer Kreuzkontamination innerhalb der Zellkulturen zusammenhängt. Neuere Studien an Isolaten von klinisch erkrankten Personen (Stuhl, Leber-Suspension und Serum) zeigen hingegen eine deutlichere genetische Heterogenität (CRISTINA und COSTA-MATTIOLI 2007).

In Deutschland werden die Daten entsprechend der Meldepflicht gemäß IfSG erfasst. Der aktuelle Datenstand wird wöchentlich im Epidemiologischen Bulletin ([http://www.rki.de/Infektionsschutz/Epidemiologisches Bulletin](http://www.rki.de/Infektionsschutz/Epidemiologisches_Bulletin)) veröffentlicht. Bis zum Jahre 2003 zeigte sich die Zahl der Erkrankungen stets rückläufig. 2004 hingegen stieg sie mit 1.932 Fällen um 41 % gegenüber dem Vorjahr deutlich an. Diese temporäre Zunahme konnte mit zwei großen Ausbrüchen im südlichen NRW und im nördlichen Rheinland-Pfalz in Verbindung gebracht werden (RKI 2005). 2005 und 2006 bestand wiederum eine rückläufige Tendenz (s. Abbildung 9).

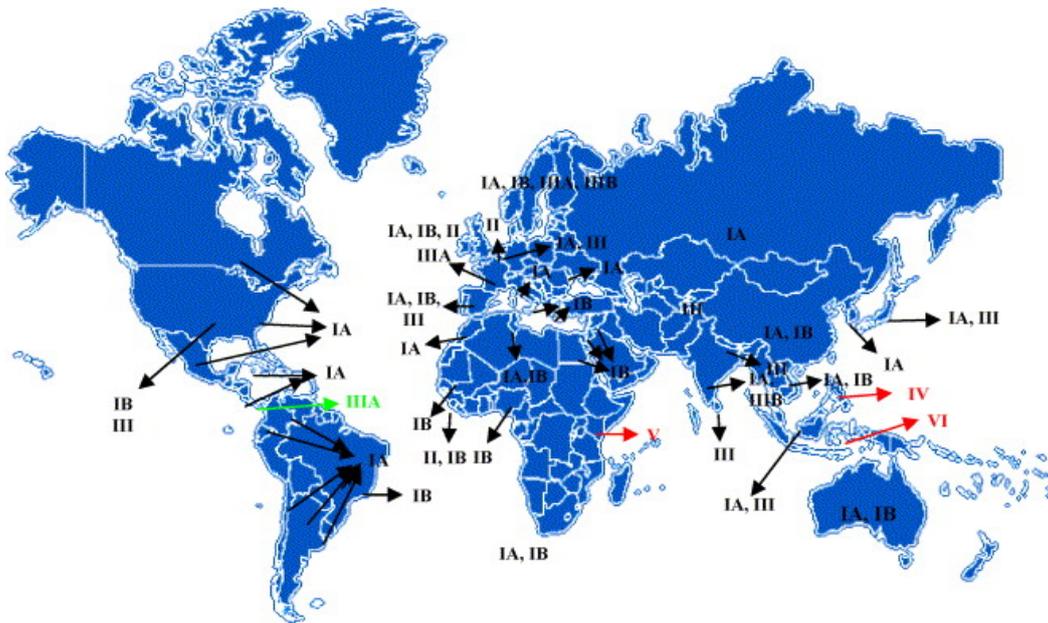


Abbildung 8: Geographische Verbreitung von HAV Genotypen. Humane Genotypen sind dabei schwarz, Genotypen, die beim Affen isoliert wurden, rot dargestellt. Der Stamm PA21 ist grün dargestellt (CRISTINA and COSTA-MATTIOLI 2007)

Übermittelte Hepatitis A-Infektionen in Deutschland 2000-2006

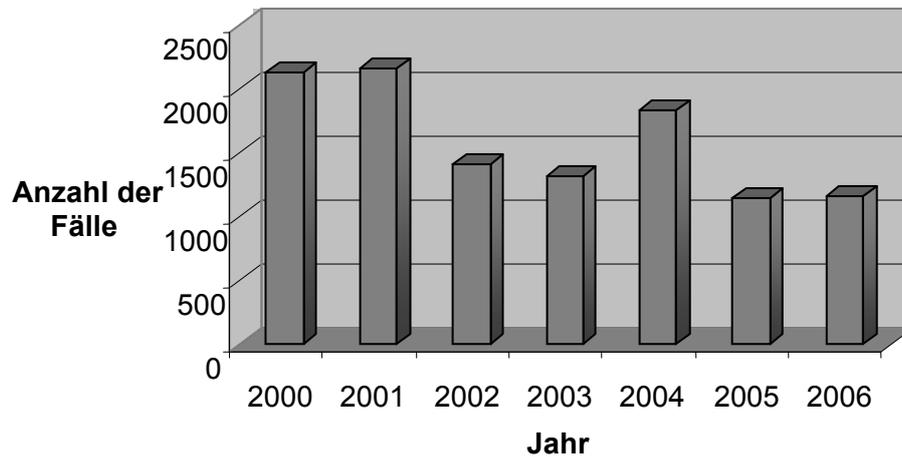


Abbildung 9: Übermittelte Hep. A-Infektionen in Deutschland (Daten: RKI 2000-2006)

2.1.1.2.3 Reservoir und Übertragung

Der Mensch ist Hauptwirt und bildet das einzige Reservoir für HAV (NAOUMOV 2007). Die Übertragung erfolgt fäkal-oral durch Kontakt oder Schmierinfektion. In Ländern mit niedrigem Hygienestatus findet die Übertragung hauptsächlich über Trinkwasser und Lebensmittel statt. Dabei bilden vor allem Muscheln eine wichtige Übertragungsquelle, aber auch durch künstliche Bewässerung mit Fäkalien kontaminierte Gemüse und Salate stellen ein Risiko dar. Besonders gefährdet sind in diesem Zusammenhang Touristen, die in abgelegene Regionen reisen, sowie Entwicklungshelfer und medizinisches Personal in Entwicklungsländern. In den Industrienationen stellt die Übertragung von Mensch zu Mensch den Hauptinfektionsweg dar (NAOUMOV 2007).

Neben der intrafamiliären Übertragung sind hier als Risikofaktoren der Kontakt zu infizierten Personen in einer Tagesstätte und homosexuelle Praktiken unter Männern zu nennen (LEMON 1997). Weiterhin sind auch Fälle bekannt geworden, bei denen Drogenabhängige in der Virämiephase, welche mehrere Wochen andauern kann, den Erreger über kontaminierte Spritzenbestecke an andere Benutzer weitergegeben haben. Diese Übertragung auf dem Blutweg wurde erstmals in Schweden (WIDELL et al. 1983), später auch in anderen Ländern beschrieben. In den Jahren 1989 bis 1992 wurden mehrere Fälle bekannt, bei denen sich Hämophilie A-Patienten an Faktor VIII-Plasmakonzentraten mit Hepatitis A infizierten. Zur Inaktivierung von durch Blut übertragbaren Viren wurde das Konzentrat mit einer Mischung aus Tri-(n-butyl)-phosphat und einem Detergenz (Polysorbat 80) behandelt. Diese Methode inaktiviert behüllte Viren wie Hepatitis B oder C und HIV zuverlässig. Die Infektiosität der unbehüllten Hepatitis A-Viren wird hingegen nicht vermindert (MANUCCI et al. 1992).

2.1.1.2.4 Klinische Symptomatik

Das Risiko, nach einer Infektion mit HAV klinisch apparent zu erkranken, steht in direkter Korrelation mit dem Alter der infizierten Person. Bei Kindern unter 6 Jahren verläuft die Infektion normalerweise asymptomatisch. Nur 10 % von Personen dieser Altersstufe entwickeln klinische Symptome. Bei älteren Kindern und Erwachsenen ruft die Infektion meist auch klinische Symptome hervor: ungefähr 70 % der Infizierten erkranken an einer Gelbsucht. Somit sind Regionen mit einem sehr hohen Durchseuchungsgrad generell durch asymptomatische Infektionen in der Kindheit gekennzeichnet. Klinisch apparente Fälle treten nur gelegentlich auf (WHO 2003).

Hepatitis A-Viren vermehren sich in vivo vornehmlich in den Hepatocyten (NAOUMOV 2007), wobei die Viren in großer Menge in die biliären Canaliculi abgegeben werden (NAOUMOV 2003).

Neben der fäkalen Ausscheidung zeigt sich eine ausgedehnte Virämie, welche vom Beginn der Infektion bis zum Auftreten der Leberschädigung anhält. HAV selbst hat dabei keinen cytopathischen Effekt; die Leberzellschädigung entsteht durch die zellvermittelte Immunantwort. Die Inkubationszeit schwankt zwischen 2 und 6 Wochen. Ihre Dauer scheint von der Infektionsdosis abzuhängen. Für ein paar Tage zeigen die Patienten Prodromalsymptome: Krankheitsgefühl, Appetitlosigkeit, Übelkeit, Erbrechen und Fieber. Das Ausscheiden von dunkel gefärbtem Urin ist dann normalerweise das erste klinische Zeichen, welches spezifisch auf die Erkrankung hinweist. Es folgt dann häufig eine ikterische Phase. Neben einer Leberschwellung kommt es bei etwa einem Viertel der Patienten auch zu einer Milzvergrößerung, bei einigen auch zu Zeichen einer Cholestase. Häufig zeigt sich Juckreiz am gesamten Körper. Der Stuhl ist blass gefärbt. Farbe und Konsistenz des Stuhls normalisieren sich nach etwa 2-3 Wochen, was meist ein Zeichen der Rekonvaleszenz darstellt (NAOUMOV 2007).

Generell verläuft die Erkrankung unkompliziert. In etwa 10 % aller Fälle treten prothrahierte Verlaufsformen auf, die unter Umständen mehrere Monate andauern, dann jedoch ohne Komplikationen ausheilen (RKI 2006). Das Risiko an einer fulminanten, oftmals letalen Hepatitis zu erkranken, liegt bei etwa 0,14-0,35 %. Auch hier bildet das Alter den entscheidenden Faktor: bei Erkrankten über 49 Jahren liegt die Sterberate bei 2,7 % und höher, wenn die Patienten an einer chronischen Lebererkrankung leiden (NAOUMOV 2007).

2.1.1.2.5 Diagnostik

Bei den Hepatitis A-Patienten ist in der Regel eine deutliche Erhöhung der Transaminasen, des direkten und indirekten Bilirubins im Serum, sowie des Urobilinogens im Harn zu beobachten. Die spezifische Diagnose der frischen Erkrankung geschieht über den Nachweis von anti-HAV-IgM im Serum. Nach dem Auftreten der klinischen Symptome sind die Antikörper für 3-6 Monate im Blut nachweisbar. Ein positiver Nachweis von anti-HAV-IgG, in Abwesenheit von anti-HAV-IgM, zeigt einen Kontakt mit HAV in der Vergangenheit und eine erworbene Immunität an (s. Abbildung 10) (RKI 2006).

Die Amplifikation von HAV-RNA mittels PCR bietet ein ausreichend sensitives und spezifisches System zur Detektion von HAV in humanen Stuhl- und Blutproben sowie auch in Umgebungs- und Lebensmittelproben. Durch die Einführung entsprechender Nachweise mittels der Real-Time PCR kann die Diagnose heute innerhalb kürzester Zeit erfolgen. Zudem besteht die Möglichkeit, PCR Produkte zu sequenzieren und so wichtige epidemiologische Zusammenhänge zu erfassen. Der Nachweis von HAV-Antigen mittels ELISA im Stuhl ist ebenfalls möglich (RKI 2006).

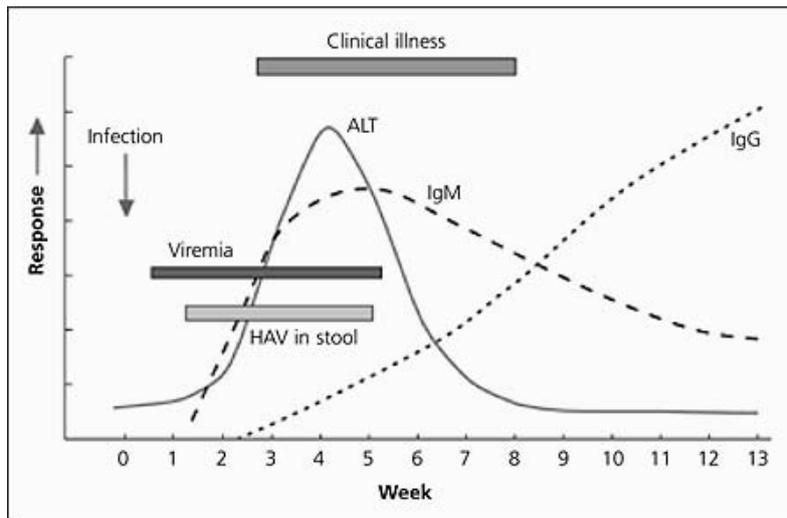


Abbildung 10: Diagnose der Hepatitis A-Infektion. (HAV = Hepatitis A-Virus; ALT = Alanin Transaminase; Ig = Immunoglobulin.) Quelle: CDC 2004a

2.1.1.2.6 Präventive Maßnahmen

An erster Stelle der Präventivmaßnahmen steht sicherlich die Verbesserung der hygienischen Verhältnisse. Die Erkrankung ist seit 1951 im Gebiet der ehemaligen DDR meldepflichtig und seit 1962 in den alten Bundesländern (RKI 2004). In der Vergangenheit bestand die weitere Prophylaxe vor allem in der passiven Immunisierung mit humanem Immunglobulin. Die hierdurch erworbene Immunität hielt für etwa 2-6 Monate an. Mit der Entwicklung effektiver und sicherer Impfstoffe auf Basis von formaldehydinaktivierten HAV setzte sich dann mehr und mehr die aktive Immunisierung durch. Durch sie werden höhere Antikörpertiter erreicht, die dann eine länger anhaltende Immunität (12-15 Jahre) gewährleisten (NAOUMOV 2007).

Eine Indikation für eine Impfung besteht in erster Linie für Reisende in Gebiete mit hoher Hepatitis A-Prävalenz. Darüber hinaus wird die Impfung gemäß den Impfeempfehlungen der Ständigen Impfkommission, STIKO, am Robert Koch-Institut (<http://www.rki.de>>Infektionsschutz>Impfen>Empfehlungen der STIKO) für folgenden Personenkreis empfohlen:

2.1.1.2.6.1 Indikationsimpfung

- Homosexuell aktive Männer
- Personen mit substituionspflichtiger Hämophilie
- Personen in psychiatrischen Einrichtungen oder vergleichbaren Fürsorgeeinrichtungen für Zerebralgeschädigte oder Verhaltensgestörte
- Personen, die an einer chronischen Leberkrankheit einschließlich chronischen Krankheiten mit Leberbeteiligung leiden und keine HAV-Antikörper besitzen

2.1.1.2.6.2 Impfungen aufgrund eines erhöhten beruflichen Risikos, z.B. nach Gefährdungsbeurteilung entsprechend Biostoffverordnung und G 42 (Tätigkeiten mit Infektionsgefährdung) sowie aus hygienischer Indikation

- HA-gefährdetes Personal im Gesundheitsdienst, z.B. in der Pädiatrie und Infektionsmedizin
- HA-gefährdetes Personal in Laboratorien
- Personal in Kindertagesstätten und –heimen
- Personal in psychiatrischen Einrichtungen oder vergleichbaren Fürsorgeeinrichtungen für Zerebralgeschädigte oder Verhaltensgestörte
- Kanalisations- und Klärwerksarbeiter mit direktem Kontakt zu Abwasser

2.1.1.2.6.3 Postexpositionelle Prophylaxe/Riegelungsimpfungen

Personen mit Kontakt zu Hepatitis A-Erkrankten (Riegelungsimpfung: vor allem in Gemeinschaftseinrichtungen und Schulen). Bei einer aktuellen Exposition von Personen, für die eine Hepatitis A ein besonderes Risiko darstellt, kann zeitgleich mit der ersten Impfung ein Immunglobulinpräparat gegeben werden.

Beim Umgang mit an Hepatitis A-Erkrankten und ihren Kontaktpersonen ist zu berücksichtigen, dass der Höhepunkt der Virusausscheidung und damit der Gipfel der Infektiosität in der späten Inkubationsphase, d.h. 1-2 Wochen vor Beginn des Ikterus liegt. Im Krankenhaus sind die Benutzung einer eigenen Toilette sowie die Belehrung über eine sorgfältige Hygiene notwendig. Eine Isolierung der Patienten ist bis zu 2 Wochen nach Auftreten der ersten klinischen Symptome bzw. eine Woche nach Auftreten des Ikterus angezeigt. Im Übrigen gelten die Regeln der Standardhygiene (RKI 2006).

2.1.1.2.7 Gesetzliche Grundlagen

Gemäß dem IfSG ist laut § 6 Abs. 1 der feststellende Arzt verpflichtet, sowohl den Verdacht als auch Erkrankung und Tod an akuter Virushepatitis an das zuständige Gesundheitsamt zu melden.

Leiter von Untersuchungsstellen (Laboratorien) sind nach § 7 IfSG verpflichtet, den direkten oder indirekten Nachweis des Hepatitis A-Virus zu melden, soweit dieser auf eine akute Infektion hinweist.

Entsprechend § 34 Abs. 1 Satz 1 Nr. 19 des IfSG dürfen Personen, die an Virushepatitis erkrankt oder dessen verdächtig sind, in Gemeinschaftseinrichtungen keine Lehr-, Erziehungs-, Pflege-, Aufsichts- oder sonstigen Tätigkeiten ausüben, bei denen sie Kontakt zu den dort Betreuten haben, bis nach ärztlichem Urteil eine Weiterverbreitung der Krankheit durch sie nicht mehr zu befürchten ist.

Für die in Gemeinschaftseinrichtungen Betreuten gilt, dass sie, falls sie an Hepatitis A erkrankt oder dessen verdächtig sind, die dem Betrieb der Gemeinschaftseinrichtung dienenden Räume nicht betreten, Einrichtungen der Gemeinschaftseinrichtung nicht benutzen und an Veranstaltungen der Gemeinschaftseinrichtung nicht teilnehmen dürfen.

Die in § 34 Abs. 1 Satz 1 und 2 getroffenen Regelungen gelten entsprechend für Personen, in deren Wohngemeinschaft nach ärztlichem Urteil eine Erkrankung oder ein Verdacht auf Hepatitis A aufgetreten ist.

Nach § 42 IfSG dürfen Personen, die an Hepatitis A erkrankt oder dessen verdächtig sind, nicht tätig sein oder beschäftigt werden:

- beim Herstellen, Behandeln oder Inverkehrbringen der in § 42 (2) genannten Lebensmittel, wenn sie dabei mit diesen in Berührung kommen oder
- in Küchen von Gaststätten und sonstigen Einrichtungen mit oder zur Gemeinschaftsverpflegung

Lebensmittel gemäß § 42 (2) sind:

- Fleisch, Geflügelfleisch und Erzeugnisse daraus
- Milch und Erzeugnisse auf Milchbasis
- Fische, Krebse oder Weichtiere und Erzeugnisse daraus
- Eiprodukte
- Säuglings- oder Kleinkindernahrung
- Speiseeis und Speiseeishalberzeugnisse
- Backwaren mit nicht durchgebackener oder durcherhitzter Füllung oder Auflage
- Feinkost-, Rohkost- und Kartoffelsalate, Marinaden, Mayonnaisen, andere emulgierte Soßen, Nahrungshefen

In Gemeinschaftseinrichtungen sollte bei Kontaktpersonen für 1-2 Wochen nach einer postexpositionellen Impfung ein Ausschluss erfolgen. Außerdem sollten für mindestens vier Wochen strikte hygienische Bedingungen eingehalten werden. Ansonsten sind Kontaktpersonen vier Wochen nach dem letzten Kontakt zu einer infektiösen Person vom Besuch von Schulen und anderen Gemeinschaftseinrichtungen auszuschließen, sofern nicht die strikte Einhaltung von hygienischen Maßnahmen zur Verhütung einer HAV Übertragung gewährleistet ist (§ 34 Abs. 7 IfSG). Dazu gehört vor allem eine umfassende Händehygiene (RKI 2006).

2.1.2 *Salmonella* spp.

Das Genus *Salmonella* aus der Familie der *Enterobacteriaceae* umfasst drei Spezies: *Salmonella bongori*, *Salmonella enterica* und *Salmonella subterranea*. *S. enterica* wird in die sechs in Tabelle 1 aufgeführten Subspezies unterteilt. Innerhalb der Subspezies ordnet man individuelle Isolate einem der mehr als 2500 verschiedenen Serovare zu, wobei *Salmonella enterica* subsp. *enterica* die größte Vielfalt aufweist. Die Serovare werden nach dem Kauffmann-White-Schema aufgrund des Vorkommens von unterschiedlichen O- und H-Antigenen klassifiziert. Zusätzlich verfügen einige Arten über ein Kapselantigen (= K-Antigen). Da durch das Kauffmann-White-Schema nur eine H-Phase nachweisbar ist und zur Typisierung aber auf jeden Fall beide H-Phasen benötigt werden, muss die zweite H-Phase durch eine Schwärmplatte nach Sven-Gard zur Ausbildung gebracht werden (Hirsh 1999c).

Tabelle 1: *Salmonella enterica* Subspezies

Gruppe (nach Subspezies)	Gruppe (nach Nummer)	Malonat	ONPG	Dulcit	Salicin	Galakturonsäure	Gelatine
<i>S. enterica</i> ssp. <i>enterica</i>	I	negativ	negativ	positiv	negativ	negativ	negativ
<i>S. enterica</i> ssp. <i>salamae</i>	II	positiv	negativ	positiv	negativ	positiv	positiv
<i>S. enterica</i> ssp. <i>arizonae</i> , und <i>S. enterica</i> ssp. <i>diarizonae</i>	III	positiv	positiv	negativ	negativ	schwach	positiv

Tabelle 1: *Salmonella enterica* Subspezies

Gruppe (nach Subspe- zies)	Gruppe (nach Nummer)	Malonat	ONPG	Dulcit	Salicin	Galaktu- ronsäure	Gelatine
<i>S. ente- rica</i> ssp. <i>houtenae</i>	IV	negativ	negativ	negativ	positiv	positiv	positiv
<i>S. ente- rica</i> ssp. <i>indica</i>	VI	negativ	variabel	variabel	negativ	positiv	positiv

Erläuterungen: Malonat: Verwertung von Malonat als Kohlenstoffquelle (C-Quelle); ONPG: Hydrolyse von O-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid (ONPG); Dulcit: Verwertung von Dulcit (einem Zuckeralkohol) als C-Quelle; Salicin: Verwertung von Salicin als C-Quelle, Galakturonsäure: Verwertung von Galakturonsäure, Gelatine: Hydrolyse von Gelatine (nach HALLANDER et al. 2002).

Salmonellen sind gram-negative, oxidase-negative, katalase-positive Stäbchenbakterien, die Kohlenhydrate sowohl oxidativ als auch fermentativ verstoffwechseln können. Die meisten Salmonellen sind beweglich (ICMSF 1996a).

Salmonellen sind jedes Jahr für rund 10 % der lebensmittelassoziierten Erkrankungen und für etwa 30 % der durch Lebensmittel verursachten Todesfälle in den USA verantwortlich (MEAD et al. 1999) Gem. § 6 Abs. 1 Nr. 2 Infektionsschutzgesetz (IfSG) ist der Verdacht auf oder die Erkrankung an akuter infektiöser Gastroenteritis in Deutschland meldepflichtig, wenn eine Person betroffen ist, die im Lebensmittelbereich tätig ist oder zwei oder mehr gleichartige Erkrankungen auftreten, bei denen ein epidemiologischer Zusammenhang wahrscheinlich ist oder vermutet wird. Nach § 7 ist jeglicher Nachweis von Salmonellen unverzüglich, spätestens jedoch innerhalb von 24 Stunden, durch das untersuchende Labor dem für den Einsender zuständigen Gesundheitsamt zu melden. Bis zur 42. Meldewoche 2007 wurden dem Robert-Koch-Institut in Deutschland 46.127 Infektionen mit Salmonellen übermittelt.

Die minimale infektiöse Dosis hängt neben der unterschiedlichen Virulenz der Stämme sowie dem Substrat stark von der Allgemeinkonstitution der betroffenen Personen ab. Die Infektion erfolgt in der Regel durch den Verzehr kontaminierter Lebensmittel. Die Infektionsdosis für erwachsene Menschen liegt bei 10^4 bis 10^6 Keimen. Wenn sich die Salmonellen in stark fetthaltigen Lebensmitteln oder auch in Gewürzen befinden, oder

bei besonderer Disposition, z.B. bei Abwehrschwäche (Säuglinge, Kleinkinder, alte Menschen), sind jedoch Erkrankungen bereits bei Infektionsdosen unter 100 Keimen beobachtet worden. Weiterhin können die sich aus der Infektion ergebenden Krankheitsbilder sehr unterschiedlich ausfallen: neben einer lokalisierten Enterocolitis kann es zu systemischen Infektionen (5 % der Infizierten) und Typhuserkrankungen kommen. Die letztgenannte Form tritt besonders häufig bei multiresistenten *Salmonella*-Serovaren auf, die als Hospitalinfektionen bei besonders disponierten Personen oder unter ungünstigen hygienischen Bedingungen erfolgen (RKI 2002).

Die Inkubationszeit beträgt 6-72 Stunden und ist abhängig von der Infektionsdosis. Die Salmonellose beginnt meist plötzlich mit zahlreichen wässrigen Stühlen (im Verlauf der Erkrankung zunehmend mit Blutbeimengungen), Leibschmerzen, teilweise mit Fieber, Übelkeit, Erbrechen und Kopfschmerzen. Die Symptome dauern in der Regel nur wenige Stunden oder Tage an. Bei schweren klinischen Fällen treten zusätzlich Schüttelfrost, höheres Fieber, Kollaps und weitere systemische Krankheitsbilder mit typhoidem Verlauf auf. Oft kommt ein leichter oder symptomloser Verlauf vor, der u.a. auch von der Anzahl der aufgenommenen Keime abhängig ist. Die Keimausscheidung von Enteritis-Salmonellen dauert im Mittel 3-6 Wochen, bei Säuglingen aber auch Monate (RKI 2002).

In Deutschland wurden die meisten Salmonellen-Ausbrüche durch Eier und Eiprodukte, Kuchen und Speiseeis, Fleisch und Fleischprodukte, Geflügel und Geflügelfleischprodukte sowie Salate, Dressings und Mayonnaisen verursacht. Lediglich 1,3 % aller lebensmittelassoziierten Krankheitsausbrüche und etwa 1 % aller Salmonellose-Ausbrüche konnten in den Jahren 1999 bis 2000 mit Fischprodukten und Muscheln in Verbindung gebracht werden (WHO 2003). Diese niedrigen Werte sind möglicherweise durch den vergleichsweise geringen Konsum an Fischprodukten und Muscheln im Vergleich zu anderen europäischen Ländern zu begründen. In Frankreich wurden im gleichen Zeitraum etwa 18 % aller lebensmittelbedingten Erkrankungen und 4 % aller Salmonellosen durch Fisch und Meeresfrüchte ausgelöst (WHO 2003).

Eine 2004 von MARTINEZ-URTAZA et al. veröffentlichte Studie über die Prävalenz von *Salmonella* spp. in Miesmuscheln zeigte, dass der Erreger in 3,1 % aller untersuchten Proben nachgewiesen werden konnte. BRANDS et al. konnten 2004 in 7,4 % der von ihnen untersuchten amerikanischen Austern (*Crassostrea virginica*) *Salmonella* spp. nachweisen. Beide Studien haben gezeigt, dass der Grad der Kontamination signifikant mit verschiedenen Umwelteinflüssen korreliert. Hier sind vor allem saisonale Einflüsse (Veränderungen der Wassertemperatur und Sonneneinstrahlung), Wetterphänomene wie Herbst- und Winterstürme im südlichen Europa sowie die in den Sommermonaten

in den USA immer wieder auftretenden Hurricanes zu nennen, die die Nutzung der Küstengewässer durch den Menschen beeinflussen. Eine Studie von BRANDS et al. (2004) zeigte, dass in den trockenen Wintermonaten Floridas keine Salmonellen in den Austern aus dieser Region nachgewiesen werden konnten.

Ein Zusammenhang zwischen der Belastung der Muscheln mit Fäkalcoliformen und der Belastung mit *Salmonella* spp. besteht nach Aussage der beiden oben genannter Studien nicht. MARTINEZ-URTAZA et al. konnten 67 % der *Salmonella* spp.-Isolate in Proben mit einer Konzentration von <300 Fäkalcoliformen pro 100 g nachweisen (Grenzwert vgl. 2.1.11.2).

2.1.3 Unspezifischer Keimgehalt und Indikatorkeime

2.1.3.1 Mesophile Gesamtkeimzahl

Durch die Ermittlung des aeroben mesophilen Gesamtkeimgehaltes kann die hygienisch-mikrobiologische Qualität eines Lebensmittels festgestellt werden. Der Gesamtkeimgehalt wird dabei durch den Ausgangskeimgehalt sowie Kontaminationen und Keimvermehrung während Verarbeitung und Vertrieb beeinflusst (MIESCIER et al. 1992). Eine hohe mesophile Gesamtkeimzahl ($>10^5$ KbE/g) kann somit auf ein eventuelles Gesundheitsrisiko für den Verbraucher hinweisen (JAY 1996, COLBY et al. 1995). Weiterhin hängt auch die Lagerfähigkeit direkt von der bakteriellen Kontamination der Produkte ab. Die aerobe mesophile Gesamtkeimzahl kann somit auch zur Abschätzung dieser Lagerfähigkeit dienen (KHAN et al. 2005).

Der mikrobielle Verderb gekühlter Meeresfrüchte hängt vor allem mit der Präsenz und Vermehrung psychrotropher, gram-negativer Bakterien wie *Pseudomonas* spp., *Vibrio* spp., *Flavobacterium* und *Moraxella* zusammen (JAY 1996, HAYES 1992), wobei die Keime des Genus *Pseudomonas* hier den größten Einfluss (90-100 %) haben (JAY 1996). Sehr hohe mikrobielle Kontaminationsgrade ($>10^7$ KbE/g) führen zur Geruchsbildung und zwar aufgrund der Produktion unerwünschter Metaboliten wie Trimethylamin, anderer Amine und Ammoniak, Schwefelwasserstoff und Carbonylverbindungen, (COLBY et al. 1995)

Die VO (EG) Nr. 2073/2005 der Kommission über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel enthält keine Angaben zu Grenzwerten für die mesophile aerobe Gesamtkeimzahl bei lebenden Muscheln. Die Arbeitsgruppe "Mikrobiologische Richt- und Warnwerte" der Fachgruppe "Lebensmittelmikrobiologie und -hygiene" der DGHM in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe "Lebensmittelmikrobiologie" der SVUA/CVUA NRW geben als Richtwert für die mesophile aerobe Gesamtkeimzahl bei frischem See-

fisch 5×10^5 KbE/g an. Dies entspricht in etwa der allgemeinen Empfehlung, dass der Wert bei Verwendung eines PC-Agars mit 1%igem NaCl Zusatz 10^5 KbE/g nicht überschreiten sollte (ANONYMUS 1992).

2.1.3.2 Bakterien als Indikatoren viraler Kontaminationen

Da enterale Viren in den meisten Fällen fäkal-oral übertragen werden, hat es verschiedene Versuche gegeben, den fäkalen Kontaminationsgrad als Indikator für die Anwesenheit dieser Erreger in Lebensmitteln und Wasser zu nutzen. Dabei wurden sowohl chemische als auch mikrobiologische Indikatoren in Betracht gezogen. Zu den chemischen Indikatoren, die eine fäkale Verschmutzung anzeigen können, zählt beispielsweise Coprostanol (DUTKA et al. 1974). Chemische Tests haben jedoch neben einer oftmals nur geringen bis mäßigen Sensitivität der Methoden den Nachteil, dass eine umfassende und kostspielige Laborausstattung benötigt wird. Die meisten mikrobiologischen Tests hingegen können nur eine einzelne Gruppe von Keimen detektieren, dies aber mit einer hohen Sensitivität und Spezifität. Des Weiteren benötigen diese Tests meist nur minimales technisches Equipment und sind leicht durchzuführen. Aus diesen Gründen werden in den meisten Fällen Bakterien als Indikatoren für die virale Kontamination von Lebensmitteln und Wasser benutzt. BERG und METCALF haben 1978 verschiedene Anforderungen, die an solche Keime zu stellen sind, diskutiert: das Hauptkriterium für die Auswahl des Indikatorkeims ist demnach die Korrelation des Auftretens von Bakterien und Viren in einem bestimmten Milieu; Virusmaterial sollte nicht in Abwesenheit oder bei nur sehr geringer Prävalenz des Indikatorkeims gefunden werden; auf der anderen Seite sollten immer dann auch Viren gefunden werden, wenn die Anzahl der Indikatorkeime hoch ist; die Indikatorkeime sollten nach Möglichkeit selbst nicht humanpathogen sein, um das Handling im Labor möglichst einfach zu gestalten und die Gefahren für das Personal zu minimieren. Ein weiterer wichtiger Punkt ist die Persistenz der Indikatorkeime: sie sollten unter den gleichen Umweltbedingungen etwa die gleichen Überlebensraten haben wie die Viren, die sie anzeigen. Wenn sich die Überlebenszeiten von Indikatorkeim und Virus zu sehr unterscheiden, ist das gewählte Bakterium in seiner Funktion als Indikator nutzlos. Verschiedene Bakterienarten sind als Indikatorkeime für enterische Viren, wie Noro- und Hepatitis A-Viren, untersucht worden. Im Folgenden wird die Bedeutung von *Escherichia coli*, *Enterococcus spp.* und *Clostridium perfringens* besprochen.

2.1.3.2.1 *Escherichia coli*

Schon in den Anfängen der mikrobiologischen Diagnostik ließ sich feststellen, dass bestimmte Bakterien wie *Escherichia coli* als Kommensalen in der physiologischen Darmflora und im Kot von Menschen und verschiedenen Tieren nachgewiesen werden können (ESCHERICH 1885). Sie kommen hier in Mengen von etwa 10^5 - 10^9 /g Stuhl vor. *Escherichia coli* ist ein gram-negatives Stäbchen aus der Familie der *Enterobacteriaceae*. Der Keim eignet sich aus verschiedenen Gründen gut als Indikator für eine fäkal-kontamination: er ist normalerweise nicht humanpathogen und tritt meist in viel höheren Konzentrationen auf als die Organismen, die er anzeigen soll (SCOTT 2002). Neben den apathogenen *E. coli* Stämmen gibt es jedoch verschiedene pathogene Stämme, die für drei verschiedene Infektionen beim Menschen verantwortlich sind: Harnwegsinfektionen, neonatale Meningitiden und Gastroenteritiden. Die Pathogenität der einzelnen Stämme hängt dabei von verschiedenen Faktoren wie beispielsweise Adhaesinen, Invasinen, Motilität/Chemotaxis, Toxinen und Oberflächenantigenen ab. Fünf verschiedene Stämme sind für das Auftreten von Gastroenteritiden beim Menschen verantwortlich: Enterotoxigene *E. coli* (ETEC), enteroinvasive *E. coli* (EIEC), enterohaemorrhagische *E. coli* (EHEC), enteropathogene *E. coli* (EPEC) und enteroaggregative *E. coli* (EAaggEC). Unter ihnen ist es vor allem der EHEC Stamm O157:H7, der immer wieder zu teilweise letalen Erkrankungen beim Menschen führt. Neben heftigen gastrointestinalen Symptomen wie Bauchschmerzen, blutigen Durchfällen, Übelkeit und Erbrechen kann es zu einem durch Toxine ausgelösten, akuten Nierenversagen (hämolytisch urämisches Syndrom HUS), hämolytischer Anämie und Thrombozytopenie kommen (ICMSF 1996a).

Der Nutzen von *E. coli* als Markerorganismus in tropischen und subtropischen Gebieten ist heute wegen der Vermehrungsfähigkeit des Keims in kontaminierten Abwässern umstritten (SOLO-GABRIELE et al. 2000, DESMARIS et al. 2002).

2.1.3.2.2 *Enterococcus* spp.

Enterokokken sind gram-positive Kokken, die früher zu den fäkalen Streptokokken gezählt wurden und heute als Untergruppe derselben geführt werden. Angehörige dieser Untergruppe sind *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus gallinarum* und *Enterococcus avium*. Die Hauptunterscheidungsmerkmale zu anderen Streptokokken bilden ihre Fähigkeit zum Wachstum in 6,5 % NaCl-Lösung, bei hohen Temperaturen (45°C) und hohem pH (9,6). Dabei sind *E. faecalis* und *E. faecium* die am häufigsten beim Menschen gefundenen Vertreter (BAUMGART 2007).

Enterokokken sind bereits erfolgreich als Indikatorkeime für fäkale Verunreinigungen benutzt worden. Dies gilt insbesondere für die Bewertung gesundheitlicher Risiken in verschiedenen marinen Habitaten und Badeseen (CABELLI 1983, CABELLI et al. 1982). Allerdings haben neuere Studien gezeigt, dass es Enterokokken-Reservoirs in der Umwelt gibt und dass die Keime sich hier unter geeigneten Bedingungen weitervermehren können (DESMARIS et al. 2002).

2.1.3.2.3 *Clostridium perfringens*

Clostridium perfringens ist ein stäbchenförmiges, gram-positives, sporenbildendes, anaerob wachsendes, unbewegliches Bakterium der Gattung *Clostridium*. Der Organismus kann im Boden, Staub und Schmutz, aber auch im Kot von Menschen und Tieren (10^3 - 10^4 KbE/g Fäzes) nachgewiesen werden. *Clostridium perfringens* ist in der Lage, verschiedene Toxine zu produzieren, wobei das Muster der Toxine je nach Bakterium sehr unterschiedlich ausfällt. Die einzelnen Stämme werden anhand ihrer Fähigkeit, vier letale Toxine (α -, β -, ϵ -, ι -Toxin) zu produzieren, in die Typen A, B, C, D und E eingruppiert (CHINA et al. 2003, BRYNESTAD und GRANUM 2002). Einzelne, den Typen A und C angehörige Stämme sind zudem in der Lage, ein sog. Enterotoxin zu bilden, welches beim Menschen Lebensmittelvergiftungen hervorruft. Die größte Bedeutung innerhalb der Gruppe kommt dem A-Typ zu. Nach Aufnahme der minimalen infektiösen Dosis von 10^5 bis 10^6 Keimen pro Gramm Lebensmittel kommt es nach einer Inkubationszeit von 6 bis 24 Stunden zu Bauchkrämpfen und Diarrhöe. Übelkeit und Erbrechen sind selten. Die Erkrankung ist in der Regel selbstlimitierend und dauert etwa 24 Stunden. Wie bei allen gastrointestinalen Erkrankungen, die mit Durchfall assoziiert sind, kommt es auch hier bei kleinen Kindern, alten und geschwächten Personen gelegentlich zu Todesfällen durch Dehydration (BRYNESTAD und GRANUM 2002, FEHLHABER 1992).

Clostridium perfringens kann 13 der 20 essentiellen Aminosäuren nicht selber bilden; der Erreger ist somit vor allem mit proteinreichen Lebensmitteln assoziiert. 75 % der lebensmittelbedingten Erkrankungen beim Menschen konnten mit Fleisch und Fleischprodukten in Zusammenhang gebracht werden (BRYNESTAD und GRANUM 2002). Ebenso wurden Erkrankungen nach dem Verzehr von kontaminierten Muscheln und Fisch beobachtet (CHINA et al. 2003).

Der Nutzen von *C. perfringens* als Indikatorkeim ist umstritten. Dies liegt neben seiner Humanpathogenität vor allem an der Fähigkeit des Bakteriums Sporen zu bilden, die dann viel später auskeimen können, weshalb der Zeitpunkt einer erfolgten Kontamination somit nicht oder nur sehr ungenau angegeben werden kann. Einige Wissenschaftler empfehlen jedoch, gerade bei länger zurückliegenden fäkalen Kontaminationen oder Fragestellungen, welche Vorhersagen über das Auftreten verschiedener Viren in der Umwelt betreffen, *C. perfringens* als Indikator zu nutzen (PAYMENT und FRANCO 1993, FUJIOKA et al. 1985).

2.1.4 Verdebserreger

2.1.4.1 *Pseudomonas* spp.

Pseudomonaden sind obligat aerobe, gram-negative Stäbchen mit einer Größe von etwa 0,5-1,0 x 1,5-5,0 µm. Alle Mitglieder der Gattung sind aufgrund einer polaren Begeißelung beweglich. Sie sind ubiquitär verbreitet und zeichnen sich durch eine ausgeprägte Umweltstabilität, sowie die Fähigkeit Biofilme zu bilden, aus. Man findet sie im Boden, Wasser, auf Pflanzen und im Kot von Tieren. Beim Menschen treten die Keime nahezu ausschließlich als opportunistische Krankheitserreger bei Patienten mit geschwächtem Immunsystem auf. Nach Angaben der CDC liegt die Inzidenz der *P. aeruginosa* Infektionen in U.S. Krankenhäusern bei durchschnittlich 0,4 % (4 pro 1000 Entlassungen). Das Bakterium ist der am viert häufigsten isolierte nosokomiale Keim und verantwortlich für 10,1 % aller im Krankenhaus erworbenen Infektionen (CDC 2004b).

Pseudomonaden machen aufgrund ihrer weiten Verbreitung im Meer- und Süßwasser den größten Teil der Primärflora von Fischen aus und bilden auch beim proteolytischen bzw. lipolytischen Verderb von kühlgelagerten See- und Süßwasserfischen die Hauptverderbsflora.

Innerhalb der Gattung *Pseudomonas* finden sich einige für den Menschen pathogene Arten. Die humanmedizinisch bedeutsamste ist *P. aeruginosa*. Der Keim produziert eine Reihe von Exotoxinen: die Exotoxine A und S inhibieren die Proteinsynthese der Wirtszelle durch Ribolysierung der G-Proteine oder des Elongationsfaktors 2 (EF2). Damit gleicht die Wirkungsweise des Exotoxins A der des Diphtherietoxins (aus *Corynebacterium diphtheriae*). Infektionen mit *P. aeruginosa* können sich v.a. bei Personen mit Defekten in der spezifischen und unspezifischen Abwehr in Form von Wund- und Augeninfektionen manifestieren. Die orale Aufnahme kann bei Kindern zu Brechdurchfällen führen. *P. aeruginosa* ist in der Lage, sich im feuchten Milieu, das nur Spuren von Nährsubstraten enthält, zu vermehren und ist äußerst resistent gegen Umwelteinflüsse. Besondere Bedeutung haben die Mitglieder der Gattung als Hospitalismuskeime, da sie Resistenzen gegen verschiedene Antibiotika aufweisen (HIRSH 1999b).

2.1.4.2 *Aeromonas* spp.

Die Mitglieder des Genus *Aeromonas* sind fakultativ anaerob und haben eine motrich-polare Begeißelung. Die meisten Arten sind psychrotroph und können sich noch bei Temperaturen von 0°C bis + 5°C vermehren. Das Wachstumsoptimum der Aeromonaden liegt bei 28°C. Man unterscheidet die beweglichen und die unbeweglichen Arten. Zu letzteren gehören *A. media* und *A. salmonicida*, während zur Gruppe der beweglichen Aeromonaden folgende Arten gezählt werden: *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. sobria*, *A. veronii*, *A. schubertii*, *A. eucrenophila* und *A. ichthiosmia*. Sie sind ubiquitär in Gewässern zu finden und können im Süßwasser in relativ hohen Konzentrationen vorkommen (Huss 1995).

Beim Fischverderb bilden Aeromonaden häufig einen Teil der Verderbsflora. So zeigte sich, dass Aeromonaden beim Verderb von Süßwasserfischen, welche bei höheren Temperaturen gelagert wurden, eine Rolle spielen (GORCZYCA et al. 1985). Zum Zeitpunkt der Feststellung sensorischer Abweichungen bestand die Keimflora zu 49 % aus *A. hydrophila*.

Als pathogen für den Menschen gelten insbesondere *A. hydrophila*, *A. sobria* und *A. caviae*, die bei hospitalisierten, schwerkranken Patienten Infekte verursachen können. Durch ein Enterotoxin werden vereinzelt Gastroenteritiden ausgelöst (KAYSER, 1993). Die Infektion kann sowohl von Oberflächenwasser als auch von kontaminierten Lebensmitteln ausgehen. Entscheidend für die Pathogenität der *A. hydrophila*- und *A. sobria*-Stämme sind ihre Fähigkeit zur Adhäsion und die Bildung von Enterotoxinen (SCHUBERT, 1992).

2.1.4.3 *Enterobacteriaceae*

Angehörige der Familie der *Enterobacteriaceae* sind fakultativ anaerobe, 2–6 µm lange, teils bewegliche, teils unbewegliche, sporenlose gram-negative Stäbchen, die Glukose und andere Kohlenhydrate unter Säure- und Gasbildung metabolisieren. Innerhalb der einzelnen Gattungen und Spezies ist eine weitere Unterteilung aufgrund unterschiedlicher Antigenstrukturen (O-, H-, K-Antigene) möglich. Einige Angehörige der Familie der *Enterobacteriaceae* produzieren Exotoxine. Diese Toxine sind Virulenzfaktoren, welche die Invasivität der Mikroorganismen in die Mucosa fördern und für die Pathogenese der Durchfallerkrankung verantwortlich sind. Die Fähigkeit zur Enterotoxinbildung wird von Plasmiden kodiert. Sie ist nicht an bestimmte Spezies, Sero- oder Biotypen gebunden (HIRSH 1999a).

Enterobacteriaceae können Einfluss auf den Verderb von Fischen und Fischerzeugnissen nehmen. Es kann bei der Verarbeitung dieser Produkte zu Kreuzkontamination

zwischen Haut und Darm sowie dem Filet kommen oder eine Kontamination durch das Personal erfolgen.

Enterobakteriazeen sind als fakultativ pathogen zu betrachten. Bei einer bereits bestehenden Grunderkrankung oder bei schlechter allgemeiner Abwehrlage des Patienten können die Keime zu z.T. schweren Erkrankungen führen. Zu diesen Erkrankungen zählen:

- Enteritiden
- Harnwegsinfektionen
- postoperative Wundinfektionen und Peritonitis
- Entzündungen der Gallenwege
- Pneumonie, chronische Bronchitis
- Gehirnhautentzündung

Bei einer Infektion mit gramnegativen Bakterien besteht weiterhin die Gefahr, daß das in der Zellwand lokalisierte Endotoxin bei Bakteriolyse freigesetzt und in die Blutbahn eingeschwemmt wird. Es besteht dann die Gefahr eines Endotoxinschocks, bei dem vasoaktive Mediatoren freigesetzt werden. Reaktionen sind Fieber, akute Senkung des Blutdrucks, Aktivierung des Gerinnungssystems, Störungen der Mikrozirkulation, Stoffwechselstörungen insbesondere des Glucosestoffwechsels, die schließlich zum Tode führen können (HIRSH 1999a).

2.1.5 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die PCR ist ein in vitro-Verfahren zur selektiven Vermehrung von Nukleinsäurebereichen definierter Länge und Sequenz aus einem Gemisch von Nukleinsäuremolekülen. Das Prinzip der Methode basiert auf der enzymatischen Amplifikation eines DNA-Abschnitts, der von zwei Oligonukleotiden (Primer) flankiert wird, die jeweils am Ende des zu amplifizierenden DNA-Bereichs liegen (IBELGAUFTS 1993).

Die zyklisch verlaufende thermische Reaktion besteht aus drei Schritten. Im ersten Schritt wird die doppelsträngige DNA durch Temperaturerhöhung denaturiert, d.h. in ihre Einzelstränge gespalten. Schnelles Abkühlen verhindert die Reassoziaton der Einzelstrang-DNA zum Doppelstrang. Schon während des Abkühlens lagern sich die im Reaktionsansatz vorliegenden, entgegengesetzt orientierten Primer (*sense* und *antisense*) bei einer für sie charakteristischen Temperatur an die entsprechend komplementären Strangabschnitte des Templates an (= Primerhybridisierung, *annealing*). Die Spezifität der Primer-Template-Wechselwirkung ist abhängig von der Länge der verwendeten Primer. So kommt die Sequenz eines 10 Nukleotide langen Primers statistisch gesehen nur einmal in einer 10^6 (= 4^{10}) Nukleotiden langen Sequenz vor, die eines 20 Nukleotiden langen Primers sogar nur einmal in einer 10^{12} (= 4^{20}) Nukleotiden langen Sequenz. Diese kurzen basengepaarten Regionen werden im dritten Schritt von der hitzeresistenten *Taq*-DNA-Polymerase als Ausgangspunkt für die DNA-Neusynthese genutzt. Ausgehend von den 3'-Enden der angelagerten Primer an den Einzelsträngen wird ein komplementärer DNA-Strang synthetisiert. Dieser dient dann in einem folgenden Zyklus nach Denaturierung wieder als Matritze. Auf diese Weise lässt sich die Anzahl der Ziel-DNA-Fragmente, solange Primer und freie Nukleotide als Bausteine in ausreichender Menge vorhanden sind, theoretisch in jedem Durchgang verdoppeln. So könnten im optimalen Fall aus einem einzigen DNA-Molekül nach 30 durchlaufenen Zyklen 2^{30} Moleküle einer bestimmten Region neu generiert werden. Da jedoch die Effizienz der Amplifikation variiert, kann die Zunahme der Amplifikate (N) entsprechend der Formel $N = N_0(1+E)^n$ berechnet werden. Dabei ist N_0 die initiale Anzahl von Molekülen, n die Anzahl der Zyklen und E die Amplifikationseffizienz, die einen Wert zwischen 0 und 1 annehmen kann (0 = keine Amplifikation, 1 = maximale Amplifikation (Verdopplung aller Moleküle in jedem Zyklus)).

In der Regel liegt der Wert für die Amplifikationseffizienz E zwischen 0.6 und 0.8. Der Wert wird durch verschiedene Faktoren beeinflusst. Neben der Konzentration von Polymerase, dNTP und $MgCl_2$ spielen Sequenz und Länge der Primer, eine eventuelle Renaturierung der PCR-Produkte, Sekundärstrukturen, Länge und C/G-Gehalt der Target-Sequenz, suboptimale PCR-Bedingungen und Inhibitoren der PCR eine wichtige Rolle.

2.1.6 RT-PCR

Bei der Amplifikation von DNA durch die PCR werden spezifische DNA-abhängige DNA-Polymerasen verwendet. Der Nachweis von RNA-Viren ist somit nicht ohne einen Zwischenschritt möglich, da diese Polymerasen nicht in der Lage sind, RNA zu amplifizieren. Der nötige Zwischenschritt besteht im Einsatz der Reversen Transkriptase (RT). Die Reverse Transkriptase ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, mit deren Hilfe die RNA in cDNA umgeschrieben werden kann. Die cDNA kann im Anschluss als Ausgangsmaterial in einer PCR verwendet werden, um spezifische Sequenzen aus dieser zu amplifizieren.

2.1.7 Primer

Wie schon unter 2.1.4 beschrieben dienen die in der PCR verwendeten Primer als Ausgangspunkt für die DNA Replikation. Die DNA Polymerasen können neue Nukleotide nur an einen bereits bestehenden DNA Strang anfügen. Die Auswahl der Primer ist von entscheidender Bedeutung für die Spezifität und Amplifikationseffizienz des PCR-Systems.

2.1.7.1 Primer Design

Die Konstruktion der Oligonukleotide folgt bestimmten Richtlinien. Darüber hinaus gibt es diverse Computerprogramme, die die Primerentwicklung unterstützen. Nach INNIS und GELFAND (1990) sollten beim Primerdesign folgende Punkte berücksichtigt werden:

- Der Primer sollte eine Länge von 17-28 Basenpaaren aufweisen und zu 50-60 % aus Cytosin (C) und Guanin (G) bestehen
- Der Primer sollte nach Möglichkeit in einer G, C, CG oder GC Sequenz enden. Dies erhöht die Effektivität bei der Bindung des Primers
- Schmelzpunkte zwischen 55-80°C sollten bevorzugt werden. Die Schmelztemperatur eines Primers (T_m) ist diejenige Temperatur, bei der der Primer sich von seiner Template-DNA löst. Die benötigte Temperatur hängt dabei vor allem von der Länge des Primers ab. Dies bedeutet, dass bei der Verwendung sehr langer Primer die Schmelztemperatur steigt und die verwendeten Enzyme wie z.B. die DNA-Polymerase denaturieren können. Die Schmelztemperatur eines Primers hängt allerdings nicht nur von seiner Länge ab, sondern auch von seiner Nukleotidzusammensetzung. G-C-Basenpaarungen werden durch drei Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert, T-A-Basenpaarungen verfügen nur über zwei Wasserstoffbrücken. G-C-Basenpaarungen sind somit „stabiler“ und die Schmelztemperatur nimmt mit der Anzahl an G-Nukleotiden und C-Nukleotiden zu
- Die 3'-Enden der verwendeten Primer sollten nicht komplementär zueinander sein da sonst bevorzugt Primer-Dimere gebildet werden
- Die Bildung von Sekundärstrukturen („Hairpins“) innerhalb der Sequenz des Primers kann die Bindung beeinträchtigen und ist zu vermeiden
- Sequenzen mit drei oder mehr G-Nukleotiden und C-Nukleotiden am 3'-Ende können das sog. „Mispriming“ an C- und G-reichen Sequenzen fördern und sind somit zu vermeiden

2.1.8 Spezifität

Die Spezifität einer Untersuchungsmethode ist die (bedingte) Wahrscheinlichkeit bei Anwendung der Methode ein „negatives“ Ergebnis zu erhalten, wenn die untersuchte Probe tatsächlich auch negativ ist. Sie gibt also den Anteil der richtig als negativ (richtig negativ) erkannten Sachverhalte an der Gesamtheit der in Wirklichkeit negativen Sachverhalte an (KREIENBROCK und SCHACH 2005).

Neben den unter 2.1.7.1 beschriebenen Richtlinien zum Primerdesign können auch andere Faktoren Einfluss auf die Häufigkeit von falsch positiven Signalen und damit auf die Spezifität des Systems haben.

Neben speziellen PCR-Methoden („nested“-PCR, „touchdown“ PCR) ist eine Verbesserung der Spezifität durch die Reduktion verschiedener Reaktionskomponenten (Primer, Magnesiumionen, Taq-Polymerase, dNTP's) oder auch die Anzahl der Zyklen möglich. Diese Faktoren und die Minimierung der Inkubationszeit während des Annealing- und Syntheseschrittes können die Möglichkeit für Mispriming und die Synthese anderer Moleküle begrenzen und somit die Spezifität des Systems steigern (SAIKA 1989). Es muss allerdings erwähnt werden, dass alle Veränderungen des PCR Protokolls zugunsten der Spezifität die Sensitivität beeinflussen können.

2.1.8.1 Vermeidung von falsch positiven Signalen

Eine sehr empfindliche Nachweismethode wie die PCR birgt die Gefahr, dass es bereits durch geringste Kontaminationen des Probenmaterials zu falsch positiven Ergebnissen kommt und die Spezifität somit zugunsten einer sehr hohen Sensitivität herabgesetzt wird. In der Literatur werden verschiedene Quellen einer solchen Kontamination beschrieben (LONGO et al. 1990): der so genannte „cross-over“ entsteht durch den Transfer von Ziel-DNA von einem Probengefäß zum nächsten. Eine Kontamination durch aus der Laborumgebung stammende rekontaminante Plasmide, welche die Ziel-DNA enthalten, wird als Plasmidkontamination bezeichnet. Der sog. „carry-over“ bezeichnet eine Kontamination durch das eigentliche PCR Produkt. Dieses reichert sich bei unsachgemäßer Durchführung der Untersuchung in der Laborumgebung an und stellt die häufigste Quelle für falsch positive Signale dar.

KWOK und HIGUCHI beschrieben 1989 verschiedene Strategien zur Vermeidung von solchen Kontaminationen. Die Probenaufbereitung sowie die Vorbereitung und Durchführung der PCR werden in voneinander komplett getrennten Räumen durchgeführt. Mit dieser räumlichen Isolierung geht die Trennung von Arbeitsmaterialien und Reagenzien einher. Dabei sollen in jedem Raum ausschließlich die dort verwendeten Arbeits- und Verbrauchsmaterialien zur Verfügung stehen. Die Bestrahlung der Arbeitsplätze mit UV-Licht ist ebenso wie die Aliquotierung der verwendeten Reagenzien obligatorisch. Dies gilt auch für das Autoklavieren der Verbrauchsmaterialien. Der Anforderungskatalog des Sektorkomitees Lebensmittelanalytik zur Qualitätslenkung in der Molekularbiologischen Diagnostik sieht ferner das Mitführen einer Präparationsnegativkontrolle vor. Diese sollte, wenn möglich, aus dem gleichen Material bestehen, wie die zu untersuchenden Proben, dabei aber targetfrei sein (DAP 2006).

2.1.9 Sensitivität

Die Sensitivität einer Untersuchungsmethode ist die (bedingte) Wahrscheinlichkeit bei Anwendung der Methode ein positives Ergebnis zu bekommen, wenn die untersuchte Probe tatsächlich auch positiv ist. Sie gibt also den Anteil der richtig als positiv (richtig positiv) erkannten Sachverhalte an der Gesamtheit der in Wirklichkeit positiven Sachverhalte an (KREIENBROCK und SCHACH 2005).

Die Grundlage für eine hohe Sensitivität des gewählten PCR-Asseys ist wiederum die korrekte Auswahl der verwendeten Primer sowie die entsprechend eingesetzte Menge der verschiedenen Reaktionskomponenten. Auch das Temperaturprofil und die Anzahl der Zyklen spielen hier eine große Rolle. Der Anforderungskatalog des Sektorkomitees Lebensmittelanalytik zur Qualitätslenkung in der Molekularbiologischen Diagnostik sieht weiterhin das Mitführen einer Präparationspositivkontrolle vor. Diese sollte aus dem gleichen Material wie die zu untersuchenden Proben bestehen (Organprobe, Anreicherungsmedium, Zellkulturüberstand), welches eine Targetzahl nahe der Nachweisgrenze des Verfahrens aufweist (DAP 2006).

2.1.9.1 Vermeidung von falsch negativen Signalen

Als Ursache für falsch negative Ergebnisse spielen bei der Anwendung der PCR inhibitorisch wirkende Substanzen eine große Rolle. Inhibitorische Effekte ergeben sich zum einen aus einer direkten Interaktion der betreffenden Substanz mit der DNA zum anderen aus Wechselwirkungen mit den thermostabilen DNA-Polymerasen. Dabei kann die direkte Bindung des Inhibitors an die einzel- oder doppelsträngige DNA eine Amplifikation derselben verhindern und eine gleichzeitige Aufreinigung von DNA und Inhibitor ermöglichen. Die Interaktion mit den DNA-Polymerasen kann zu einer Blockierung ihrer enzymatischen Aktivität führen. Weiterhin benötigen die Polymerasen Co-Faktoren um enzymatisch wirksam zu sein. Der wichtigste Co-Faktor, Mg^{2+} , stellt ein weiteres Ziel für eine Inhibition dar. Verschiedene Substanzen führen zu einer Komplexbildung der Magnesiumionen oder stören ihre Bindung an die Polymerasen, was zu einer Inhibition der Reaktion führen kann. Andere wichtige Quellen für Inhibitoren sind die Materialien und Reagenzien die während der Aufbereitung und DNA- bzw. RNA-Extraktion der Proben mit diesen in Berührung kommen. Beispiele hierfür sind KCl Überschuss, NaCl und andere Salze, ionische Detergenzien wie Natriumdesoxycholat, Natrium-Lauryl-Sarcosinat (Sarkosyl), Natrium-Dodecylsulfat (SDS), Ethanol, Isopropanol und Phenol. Die Aufreinigung der DNA stellt eine Möglichkeit dar, Inhibitoren aus dem Reaktionsansatz zu entfernen. Zu diesem Zweck steht heute ein breites Spektrum kommerziell erhältlicher Kits zur Aufreinigung von RNA und DNA zur Verfügung (BESSETTI 2007).

Zur Erkennung von möglichen Fehlern, die während der DNA- oder RNA-Präparation auftreten können und einem eventuellen Vorhandensein von Inhibitoren in der Probenmatrix setzt der Anforderungskatalog des Sektorkomitees Lebensmittelanalytik zur Qualitätslenkung in der molekularbiologischen Diagnostik neben den obligatorischen Präparationspositiv- und negativkontrollen die Durchführung einer Inhibitionskontrolle voraus. Dabei wird mindestens eine der folgenden Maßnahmen erwartet:

- interne Amplifikationskontrolle
- externe Amplifikationskontrolle
- Verwendung geeigneter Präparationskits zur Entfernung von Inhibitoren
- der Nachweis, dass mit Matrix- oder verfahrensbedingten Inhibitoren nicht zu rechnen ist

(DAP 2006)

Mit einer Amplifikationskontrolle werden dem Reaktionsgemisch in definierter Konzentration hinzugegebene Nukleinsäuren amplifiziert. Bei der internen Amplifikationskontrolle wird die zugefügte RNA oder DNA in einem Reaktionsansatz mit der eigentlichen Nachweisreaktion gemeinsam amplifiziert. Es entstehen, fällt die eigentliche Nachweisreaktion positiv aus, in der Regel zwei PCR Produkte. Bleibt die Nachweisreaktion negativ, so entsteht nur ein PCR-Produkt, das der Amplifikationskontrolle. Die interne Amplifikationskontrolle kann entweder eine komplett andere Nukleinsäuresequenz aufweisen, in diesem Fall wird ein weiteres Primerpaar in die Reaktion eingeführt, oder sie kann die gleichen Primerbindungsstellen aufweisen. Der Nachweis erfolgt dann mit den gleichen Primern. Im zweiten Fall wird zwischen den Primerbindungsstellen modifizierte RNA oder DNA als Amplifikationskontrolle verwendet (SCHWARZ et al. 2002).

Für den Nachweis von RNA-Viren muss als Amplifikationskontrolle eine RNA verwendet werden, um eine Inhibition der reversen Transkription zu erkennen. Als externe Amplifikationskontrolle wurde ein System von DREIER (2002) entwickelt, welches auf dem Nachweis der RNA des Phagen MS2 beruht. Das System kann sowohl, wie bei der vorliegenden Untersuchung, als konventionelle PCR als auch als Real-Time PCR durchgeführt werden. Es ist als Amplifikationskontrolle für RNA-Viren einzusetzen und zeigt eine Inhibition der Reaktion an (MÄDE 2005). Die Reaktionsbedingungen für die durchgeführte Amplifikationskontrolle sind der Tabelle 6 zu entnehmen.

2.1.10 Die Auster

2.1.10.1 Einleitung

Austern (*Ostreidae*, von lateinisch *ostreum*, aus griechisch *οστό* für Knochen) existieren seit 250 Millionen Jahren. Sie kommen weltweit in den Küstengewässern warmer und mäßig warmer Meere mit mehr als 100 Arten wild lebend vor. Der Stamm *Mollusca*, zu dem die Auster gehört, ist eine der größten, vielfältigsten und wichtigsten Gruppen im Tierreich und beinhaltet über 50.000 beschriebene Spezies, von denen etwa 30.000 Wassertiere sind. Die meisten Mollusken werden durch eine harte Schale gegenüber äußeren Einflüssen geschützt (GOSLING 2003a). Unter den Organisationsmerkmalen der Mollusken sticht zunächst die Zurückbildung der Coelomsegmentierung und zum Teil auch des Coeloms selbst hervor. Die Coelomhöhle bleibt auf den hinteren Körperabschnitt beschränkt, wo sie Herz, Nephriden und Gonaden umhüllt, d.h. als Pericard, Nierensack und Gonocoel ausgebildet ist. Weiterhin findet sich bei allen Mollusken außer den Cephalopoden eine Spiralfurchung und eine Trochophora ähnliche Larve (Prevaeliger). Diese beiden Merkmale weisen auf die Beziehung zwischen den Mollusken und den metameren Anneliden hin (WEHNER UND GEHRING 1995). Durch den Wegfall des als Hydroskelett dienenden Coeloms haben die Tiere eine besondere Körperarchitektur entwickelt: die Schale beinhaltet den stark gefältelten Mantel (Pallium) und den von ihm überwachsenen Eingeweidesack (Visceralkomplex), in dem sich die inneren Organe befinden. Zwischen Mantel und Eingeweidesack liegt die Mantelhöhle, in welche die Kiemen hineinragen und die Geschlechts- und Exkretionsorgane münden. Eine weitere Besonderheit des Stammes ist der große, muskulöse Fuß, der zur Verankerung und Lokomotion des Tieres dient (GOSLING 2003a). Mollusken werden in sechs Hauptklassen untergliedert. Die Klasse *Gastropoda* (Schnecken) ist mit etwa 40.000 Spezies die größte und vielfältigste. Zu ihr gehören:

- *Prosobranchia* (Vorderkiemer): *Haliotis* (Seeohr); *Patella* (Napfschnecke)
- *Opisthobranchia* (Hinterkiemer): *Aplysia* (Seehase); *Nudibranchia* (Nacktschnecken) ohne Schale

- *Pulmonata* (Lungenschnecken): *Helix pomatia* (Weinbergschnecke); *Lymnea* (Schlammschnecke); *Planorbis* (Posthornschnecke)
 - Die Klasse *Bivalvia* mit etwa 7500 Spezies beinhaltet:
 - marine Formen: *Mytilus* (Miesmuschel); *Ostrea* (Auster)
 - limnische Formen: *Unio* (Flußmuschel); *Anodonta* (Teichmuschel); *Dreissena* (Wandermuschel)

Die Klasse der *Cephalopoda* (Kopffüßler = Tintenschnecken = „Tintenfische“) beinhaltet etwa 650, zum Teil sehr hoch entwickelte Arten. Die Klassen *Polyplacophora* (Käferschnecken) und *Scaphopoda* (Kahnfüßler) umfassen zusammen etwa 1000 Spezies. Die primitive Klasse der *Monoplacophora* enthält rezent nur das Genus *Neopilina* (WEHNER und GEHRING 1995). Die Muscheln, zu denen die Auster gehört, sind in vielerlei Hinsicht die am höchsten modifizierten Mollusken. Im Laufe der Evolution haben sie sich zu beiden Seiten hin abgeflacht. Der Fuß ist bei vielen Spezies teilweise oder völlig zurückgebildet. Der Nahrungsaufnahme dienen wegen der veränderten Körperanatomie, bei der die Mundöffnung vom Substrat weggerichtet ist, hauptsächlich die Kiemen, nicht mehr der Mund (GOSLING 2003a).

2.1.10.2 Morphologie

2.1.10.2.1 Schale

Austern verfügen über eine ovale bis birnenförmige Schale mit rauer Oberfläche, die beiden Schalenhälften sind dabei verschieden geformt. Die Schale erfüllt verschiedene Funktionen: sie dient als Skelett, schützt das Tier vor Räubern und bildet den Verankerungspunkt der Muskeln (GOSLING 2003a). Meist liegen die Tiere mit der rechten Schalenhälfte dem Boden auf. Die im Fuß befindlichen Fußdrüsen scheiden eine Flüssigkeit aus, die bald zu festen Strängen erstarrt und chemisch der Seide sehr nahe steht (Byssus). Der Fuss liegt in einer Eindellung der rechten Schalenhälfte und ist oftmals verkalkt (Anomia). Mittels dieses Haftapparates ist das Tier am Substrat anzementiert. Tiere, die frei auf dem Substrat liegen, sind durch Öffnen und Schließen der Schale in der Lage, sich nach dem Rückstossprinzip aktiv fortzubewegen. Die Schale ist von grauer, gelblicher oder cremefarbener Grundfarbe und zeigt auf der rechten Seite häufig hellbraune bis bläuliche konzentrische Bänder. Die Schalen bestehen aus drei Lagen: dem dünnen, äußeren Periostracum, das dazu dient, die Bruchsicherheit zu erhöhen und die Schale gegen den Einfluss des Wassers zu schützen.

Diese Schicht besteht aus einer Lage des chinongegerbten Proteins Conchin (auch: Conchiolin) (WEHNER und GEHRING 1995). Es schließt sich in der Mitte die so genannte Prismenschicht an, welche aus Argonit oder Calcit besteht. Innerhalb dieser Schale folgt eine dünne, kreideartige oder perlmuttene Schicht (Ostracum). Das Conchin liegt nicht nur als äußerste Schicht auf der Schale, sondern befindet sich auch zwischen den Kalkkristallen der übrigen Schalenschichten und dient als Bindemittel der Aragonitkristalle, die das Perlmutter im Inneren der Auster bilden. (REMANE et al. 1986). Argonit ist eine Modifikation des Calciumcarbonats. Es wird in die Mineralklasse der wasserfreien Carbonate ohne fremde Anionen eingeordnet. Das Calcium wird dabei der Nahrung oder dem Meerwasser entzogen, während das Carbonat aus dem CO₂/Bikarbonat Pool aus dem tierischen Gewebe bereitgestellt wird. Die Energie, die für den Schalenbau benötigt wird, macht einen nicht unerheblichen Teil des gesamten Energiebudgets des Tieres aus. Austern gehören zu den so genannten Rudisten, bei denen sich, bedingt durch das Anhaften am Untergrund, eine meist flache, untere Schale und ein Deckel ausbilden (REMANE et al. 1986). Farbe und Form der Schale variieren je nach Art: die Europäische Auster (*Ostrea edulis*) besitzt eine nahezu runde Schale. Die rechte Schalenhälfte zeigt sich flach, während die Linke gewölbt ist. Die Pazifische Felsenauster (*Crassostrea gigas*) und die Amerikanische Auster (*Crassostrea virginica*) besitzen ebenfalls ungleiche Schalenhälften, die aber länger ausgezogen sind und deren linke Schalenhälfte sehr viel tiefer ist als bei *Ostrea edulis*. Die Schale ist bei allen drei Arten dick und fest und weist typische, konzentrische Ringe auf, welche sich auf der „tiefen“ Seite stärker ausgeprägt. Die Ringe eignen sich allerdings nicht für eine Altersbestimmung des Tieres (GOSLING 2003a). Die beiden Schalenhälften sind durch ein Scharnier (Schlossband bzw. Ligament) miteinander verbunden. Das Ligament bewirkt das Spreizen der Schalen und bildet somit den Antagonist zu den Schließmuskeln. Ein äußeres Ligament (Resilium) ragt oft wulstartig empor und gerät bei Schalenschluss unter Spannung, während die inneren Ligamente gleichzeitig unter Druck geraten. Das Schließen der Schale erfolgt dann nach Kontraktion der Schließmuskulatur. Die Bewegungen der Schalen gegeneinander werden durch ein Schloss geleitet: Höcker (Zähne) und Leisten einer Schalenhälfte greifen in die Gruben und Rinnen der anderen. Der Bau des Schlosses dient als taxonomisches Merkmal (REMANE et al. 1986). Die Schale wird embryonal als einheitliches Plättchen angelegt und während der Larvenentwicklung median zu einer paarigen Klappe geknickt (WEHNER und GEHRING 1995, REMANE et al. 1986). Die Verkalkung beginnt paarig an den Wirbeln der Schale, die durch Anlagerung an den Rändern wächst, wobei die Larvenschale an den Wirbeln erhalten bleibt. Austern werden je nach Sorte bis zu 110 mm lang (♀ 50-110 mm; ♂ 2-110 mm), längere Exemplare sind selten.

2.1.10.2.2 Weichkörper

2.1.10.2.2.1 Mantel

Der Weichkörper der Auster ist komplett in den dünnen Mantel eingebettet. Er ist bei der geöffneten Auster als randnaher Lappen oder Bart zu erkennen. Die Mantellappen berühren sich ventral und verwachsen streckenweise, so dass nur noch drei Öffnungen bleiben: eine für den Fuß, eine für den Einstrom und eine für den Ausstrom. Cilien, die sich an der Innenseite der Mantellappen befinden, befördern Nahrungspartikel in Richtung der Kiemen wo sie dann abgefiltert werden. Durch den so regulierten Wasserstrom werden gleichzeitig größere, unverdauliche Partikel wieder aus der Ausstromöffnung hinausbefördert. Der Mantel besteht aus Bindegewebe und beinhaltet neben Hämolymphegefäßen auch Nerven und Muskeln. Der Mantel spielt auch eine untergeordnete Rolle bei der Bioakkumulation von Schwermetallen und organischen Kontaminanten.

2.1.10.2.2.2 Mantelränder

Die Mantelränder sind dreifach gefaltet. An der äußersten Falte, die sich direkt an der Schale befindet, findet die Sekretion der Schalenbestandteile Calciumcarbonat und Conchin durch die im Mantel befindlichen Epithelzellen statt. Je nach „Mischungsverhältnis“ dieser beiden Stoffe können die unter 2.1.10.2.1 beschriebenen, verschiedenen Lagen der Schale produziert werden. Sie werden in einem schmalen Spalt zwischen Mantelrand und Schale eingelagert. Die mittlere Falte (Velum) verfügt über schmale sensorische Tentakeln oder Papillen und besitzt einen großen muskulären Anteil. Das Velum spielt somit eine entscheidende Rolle bei der Regulation des Wasserein- und ausstroms und der Flucht- bzw. Abwehrreaktion. Die innere Mantelfalte ist ebenfalls muskulös und kontrolliert den Wasserstrom in der Mantelhöhle (GOSLING 2003a).

2.1.10.2.2.3 Kiemen

Austern zählen zu den Pseudo-Eulamellibranchiern, besitzen also eine weiterentwickelte Form der Fadenkiemen. Fadenkiemen sind eine primitive Form der Lamellenkiemen. Die Kiemenblättchen sind zu langen Fäden ausgezogen, die V-förmig durch Cilien miteinander verbunden sind und mit ihrem aufsteigenden Schenkel an die Körperwand herantreten (Filibanchier). Ihre Mittelrippe verwächst jedoch bald mit dem Körper. Austern besitzen anstelle der für die Filibranchier typischen Cilienverbindung eine Verbindung aus Bindegewebe, die jedoch nicht ganz so ausgeprägt ist wie bei den echten Eulamellibranchiern. Durch die V-förmige Anordnung und die Anheftung an

der Mittelrippe entstehen drei Räume: einer ventral von den Kiemen, in den das Wasser einströmt, und jederseits zwei zwischen den Schenkeln der Kiemenfäden und der Körperwand, in die das Wasser nach Passieren des Kiemenfilters gelangt und zur Ausstromöffnung geleitet wird. Austern besitzen zusätzlich stark gefaltete Kiemen, was zu einer erheblichen Oberflächenvergrößerung führt (GOSLING 2003c). Der Wasserstrom wird dabei durch die Wimpern der Kiemen und der inneren Mantelfläche erzeugt und geleitet. Die zahlreichen Fäden der Kiemen benötigen einen gegenseitigen Halt. Ab- und aufsteigender Ast werden durch Gewebsbrücken verfestigt, nebeneinander liegende Fäden bekommen Halt durch starre Wimpern, die auf Polstern befestigt sind. Werden die Fäden getrennt, so beginnen die Wimpern zu schlagen, bis sie wieder in Kontakt geraten und sich starr verzahnen. Die von den Kiemen abgefangenen Partikel werden in Schleimfäden oder -netzen eingebettet und durch Wimpernstraßen an die Basis der Kiemen oder deren ventralen Rand transportiert. Von hier aus erfolgt der Weitertransport zum Mund. Meist geschieht dies in einer Furche am ventralen Rand der Kiemen. Schon auf den Kiemen werden dann „unerwünschte“ Partikel durch besondere Wimpern in den Einstromraum zurückgeworfen und durch Schleim zu Pseudo-faeces verklebt. Diese werden durch die Einstromöffnung ausgeworfen, gelangen also nicht in die dorsalen Räume der Mantelhöhle (REMANE et al. 1986).

Weiterhin dienen die Kiemen der Atmung. Ihre große Oberfläche und die starke Versorgung mit Haemolymphe befähigen sie zum Gasaustausch. Sauerstoffarme Haemolymphe wird über afferente Gefäße von den Nieren aus zu den Kiemen geleitet. Jedes Kiemenfilament enthält einen Ast dieser Gefäße. An der dünnen Wand der Filamente findet dann der Gasaustausch statt. Die sauerstoffreiche Haemolymphe wiederum wird über efferente Gefäße zur Niere und zum Herz geleitet.

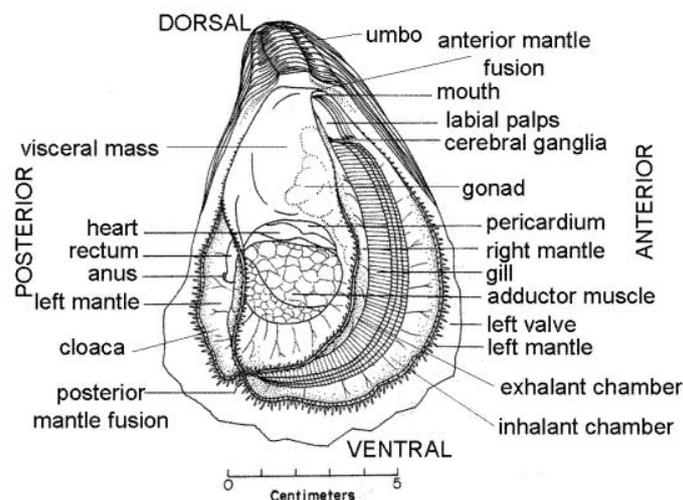


Abbildung 11: *Crassostrea*, Querschnitt, nach GALTSOFF (1964)

2.1.10.2.2.4 Mundlappen und Verdauungskanal

Jede Kieme endet in einem Paar etwa dreieckiger Mundlappen (Palpen) die sich beidseitig an der Mundöffnung befinden. Sie übernehmen die Nahrungsströme, die von den Kiemen kommen, und sortieren noch einmal durch Wimpernströme das Material. So verhindern sie ein Verstopfen der Kiemen. Kiefer, Radula und Speicheldrüsen fehlen stets. Der Mund führt in einen schmalen Ösophagus. Beide Organe sind mit Cilien bestückt, welche die Nahrungspartikel weiter in den Magen befördern. Dieser ist recht kompliziert aufgebaut: in einem Blindsack befindet sich ein großer Kristallstiel. Er besteht aus Mucoproteinen und enthält verschiedene Enzyme (Amylase, Glykogenase, z.T. Cellulase). Der Kristallstiel nimmt den Nahrungsstrom aus dem Ösophagus auf. Dieser wird dann im Magen, z.T. mechanisch, am festen Magenschild, z.T. durch den hier herrschenden niedrigen pH-Wert, zerkleinert und verdaut. Die Nahrungspartikel werden zunächst extrazellulär, dann intrazellulär nach Phagocytose in den Mitteldarmdrüsenzellen verdaut. Im Magen werden durch eine dritte Sortierung unverwertbares Material aus dem Nahrungsstrom und die Restbestände aus der Mitteldarmdrüse in das Intestinum überführt (REMANE et al. 1986).

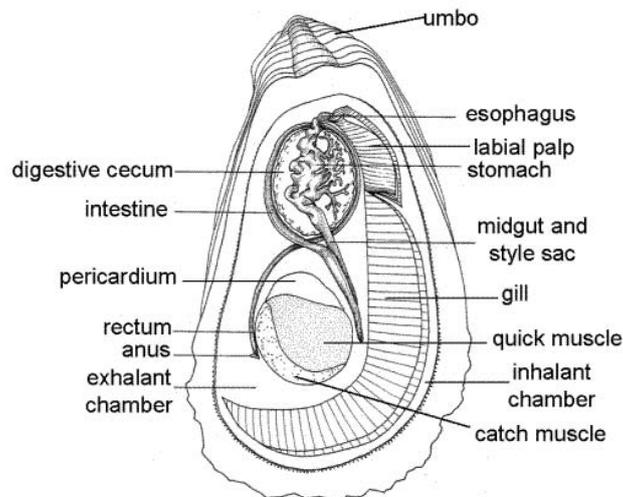


Abbildung 12: Verdauungstrakt der Auster nach NEWELL und LANGDON (1996), nach GALTSOFF (1964)

2.1.10.2.2.5 Nervensystem

Das Nervensystem besteht nur aus sechs Hauptganglien. Das paarige Kopfganglion enthält die verschmolzenen Cerebral- und Pleuralganglien. Die Pedalganglien liegen im Fuß, die Eingeweideganglien am hinteren Schließmuskel. Im letzteren sind Viszeral- und Branchial-(Parietal-, Pallial-)ganglien verwachsen. Die Kopfganglien innervieren die Palpen, Teile des Mantels, die Statocysten und über den Pleuralstrang die Osphradien. Die Eingeweideganglien innervieren Kiemen, Herz, Pericard, den Schließmuskel und einen großen Teil des Mantels. Von den übrigen Nerven sind besonders die Mantelrandnerven stark entwickelt (REMANE et al. 1986). Im Laufe der Evolution und infolge des Verlustes eines einstmals ausgeprägten Kopfes, haben sich die meisten sensorischen Organe vom vorderen Ende hin zum Rand des Mantels zurückgezogen. Die meisten sensorischen Rezeptoren befinden sich in der mittleren Mantelfalte. Diese Falte ist dick und beinhaltet eine große Zahl von Tentakeln, deren Länge und Anzahl je nach Spezies variieren und die mit berührungsempfindlichen Epithelzellen ausgestattet sind. Bei taktilen Reizen stimulieren sie eine Kontraktion der Muskulatur im Mantel. Diese Kontraktion stellt einen Reflex dar und steht nicht unter der Kontrolle des Nervensystems. Bei einem starken Stimulus zieht sich das gesamte Tier in die Schale zurück. Diese adaptive Form der Kontraktion steht unter der Kontrolle des Viszeralganglions (GOSLING 2003a).

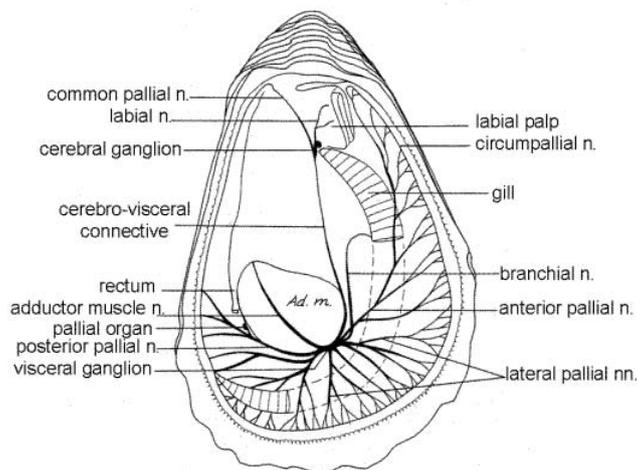


Abbildung 13: Das Nervensystem der Auster, nach GALTSOFF (1964) (n = Nerv, Ad. M = Adduktor)

Den größten Anteil an der Körpermasse der Auster macht mit bis zu 40 % der Gesamtmasse der Schließmuskel aus. Bei den sog. Monomyomariern, zu denen die Auster zählt, fehlt der vordere Schließmuskel komplett. Der hintere Schließmuskel ist an der oberen und unteren Schalenhälfte verankert und fällt so kräftig aus, dass eine Auster nur unter Zuhilfenahme entsprechender Werkzeuge geöffnet werden kann. Der Schließmuskel kann die Schale nur schließen, nicht aber öffnen. Funktionell zerfällt der Schließmuskel in zwei Anteile: der tetanische Anteil schließt unter hohem Energieverbrauch die Schalen schnell; der tonische Anteil hält unter geringem Energieverbrauch die Schalen geschlossen. Hierdurch vermag die Auster z.T. monatelang in geschlossenem Zustand zu verharren (REMANE et al. 1986).

2.1.10.2.2.6 Herz und Gefäßsystem

Austern verfügen über ein offenes Zirkulationssystem. Das Herz liegt ventral des Darmes, eingebettet in das Pericard. Es besteht aus einer einzelnen, muskulösen Hauptkammer und den paarigen Vorhöfen. Die Haemolymphe wird von den Vorhöfen in den Ventrikel und von hier in die Aorta gepumpt, die sich dann in die Arterien aufzweigt, von denen die Mantel- und Viszeralarterien, Gastrointestinalarterie, Leberarterie und Terminalarterie die wichtigsten sind. Diese Hauptarterien verzweigen sich dann weiter und formen ein dichtes Gefäßnetz, aus welchem sich im weiteren Verlauf die Venen formen. Die Venen ihrerseits münden in die drei offenen Hauptlakunen. Die Haemolymphe steht also im direkten Kontakt mit den inneren Organen. Aus den Lakunen wird sie zu den Nieren weitertransportiert, wo die Filtration der harnpflichtigen Substanzen erfolgt.

Die Haemolymphe spielt eine wichtige Rolle in der Physiologie der Auster: sie ist beteiligt am Gasaustausch, der Osmoregulation, der Nährstoffversorgung, der Ausscheidung von Stoffwechselprodukten und an der körpereigenen Abwehr.

Sie dient demnach als eine Art Hydroskelett, das dem Mantel und den Mundlappen eine gewisse Stabilität gewährt. Sie enthält Haemocyten, die sich in einem farblosen Plasma befinden. Die Abwesenheit eines Blutfarbstoffes hängt mit der Tatsache zusammen, dass die Sauerstoffkonzentration der Haemolymphe gleich der des Seewassers ist (BAYNE et al. 1976) und somit durch die große respiratorische Oberfläche und die sessile Lebensweise die Aufnahme des Sauerstoffs vereinfacht ist (GOSLING 2003a).

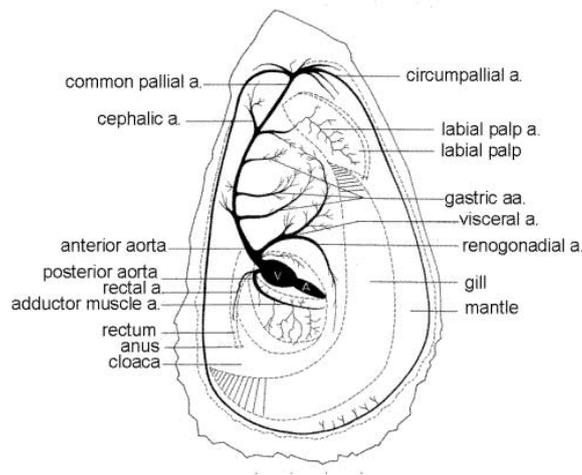


Abbildung 14: Das arterielle System von *Crassostrea*, nach GALTSOFF (1964)

2.1.10.2.2.7 Exkretionsorgane

Austern verfügen über zwei Typen von Exkretionsorganen: die braunen Pericardialdrüsen und die paarigen Nieren. Die Pericardialdrüsen entwickeln sich aus dem epithelialen Überzug des Pericards und liegen über den Vorhofwänden. Hier sammeln sich in bestimmten Zellen dieser Drüsen Abfallprodukte, die in regelmäßigen Abständen in die Pericardhöhle entleert und von hier zu den Nieren transportiert werden. Andere Zellen filtern die Haemolymph und erzeugen so einen Primärurin. Dieser wird dann zu den Nieren weitergeleitet wo er dem Prozess der Sekretion und Reabsorption der Ionen unterzogen wird. Hieraus entsteht als Endprodukt ein ammoniakreicher Urin.

2.1.10.2.2.8 Gonaden

Neben dem Herz liegen die - entsprechend der hohen Eizahl (50-100 Millionen Eier bei der Pazifischen Felsenauster, 0,5-2 Millionen Eier bei der Europäischen Auster) – sehr großen, paarigen Gonaden. Das Reproduktionssystem der Auster ist sehr simpel aufgebaut und besteht aus sich stark verzweigenden Tubuli, an deren epithelialer Oberfläche die Gameten „knospen“. Die Tubuli vereinen sich zu kleinen Gängen, welche ihrerseits wieder in größeren Gängen und schließlich im so genannten Gonoduct münden. Dieser öffnet sich über Poren in die Mantelhöhle. Die Befruchtung erfolgt dann, außer bei *Ostrea* spp., extern (GOSLING 2003a).

2.1.10.2.3 Vermehrung

Alle Muscheln unterliegen einem jährlichen Reproduktionszyklus, welcher eine Periode der Gametogenese, gefolgt von der Befruchtung und einer sich anschließenden Erholungsphase, umfasst. Im Gegensatz zu den meisten anderen Muscheln, die getrennt geschlechtlich leben, sind Austern alternierende Hermaphroditen, was bedeutet, dass sie ihr Geschlecht im Laufe des Lebens mehrfach wechseln können. Die konkrete Ausformung dieser Zweigeschlechtlichkeit ist jedoch bei den verschiedenen Austernarten sehr unterschiedlich. Die Pazifische Felsenauster (*Crassostrea gigas*) wächst zunächst ein Jahr lang als Männchen heran. Im zweiten Jahr wandelt sich ein Teil der Population zu Weibchen um. Die Geschlechteraufteilung wird dann so beibehalten. Die Europäischen Auster (*Ostrea edulis*) hingegen wechselt das Geschlecht mehrfach (konsekutiv rhythmische Hermaphroditen). In der Austernpopulation findet sich häufig ein unausgewogener Quotient zwischen männlichen und weiblichen Tieren. Dieses Verhältnis wird von exogenen Faktoren, insbesondere dem Nahrungsangebot, bestimmt. Ist dieses reichlich, so bilden sich vermehrt weibliche Tiere aus, die dann für eine größere Nachkommenschaft sorgen. Die Phase der Vermehrung beginnt unter natürlichen Verhältnissen im Frühjahr, wenn die Wassertemperaturen steigen. In nördlichen Gebieten erfordert dies Wassertemperaturen zwischen 15,5 und 20°C, während südliche Austern, wie die aus Asien stammende Pazifische Felsenauster (*Crassostrea gigas*), erst bei Wassertemperaturen ab 20°C mit der Fortpflanzung beginnen. Diese Temperaturen werden in den europäischen Küstengewässern oftmals nicht erreicht, weshalb die Austernbänke mit Saataustern aus Zuchtbetrieben bestückt werden. Auch ein Einfluss der Mondphasen auf das Vermehrungsverhalten ist beobachtet worden. Eier und Spermien der Pazifischen Felsenauster werden gleichzeitig abgegeben und die Befruchtung erfolgt im freien Wasser. Die Europäische Auster hingegen hält ihre Eier in der Schale zwischen Mantel und Perlmuttertschicht.

Durch den Wasserstrom ins Innere der Auster gelangt auch das Sperma hierhin. Die Larven schlüpfen dann innerhalb kurzer Zeit in der Schale und werden nach etwa 10 Tagen ins freie Wasser ausgestoßen. Bei der Pazifischen Felsenauster schlüpfen die Larven (Trochophoren) innerhalb von 48 Stunden im offenen Meer. Nach 24 bis 48 h entwickeln sich aus ihnen die so genannten Veliger-Larven. Zu diesem Zeitpunkt hat die Larve bereits eine dünne Schale und ernährt sich von winzigen Algen. Nach 12 bis 20 Tagen entwickelt die Larve einen Fuß und Augenpunkte. Sie ist zum Pediveliger geworden. Pediveliger lassen sich am Boden nieder und können sich, auf der Suche nach einem geeigneten Untergrund, über kurze Strecken fortbewegen. Wenn sie diesen gefunden hat, zementiert sie sich auf ihrem Untergrund fest und wird somit zur Jungauster (engl. spat, franz. naissain) (s. Abbildung 15). Körperteile wie Fuß, Auge

und Wimpern bilden sich während dieser Entwicklung zurück und werden durch die Kiemen und schließlich durch den Weichkörper ersetzt (GOSLING 2003b, MATTHIESSEN 2001).

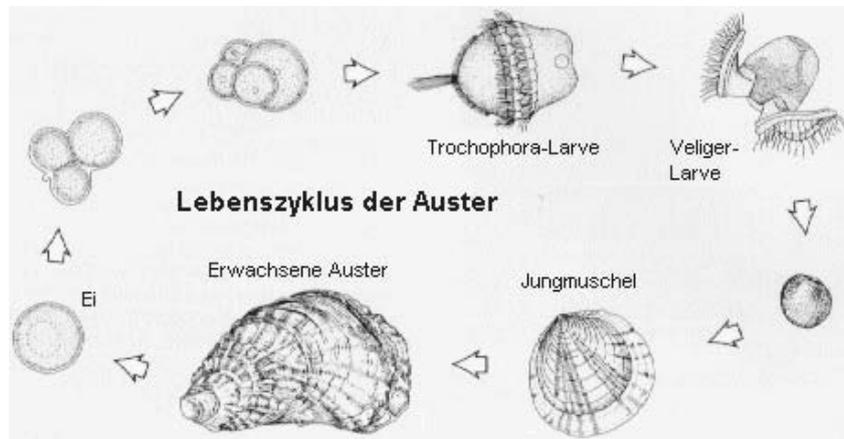


Abbildung 15: Lebenszyklus der Auster (Quelle: SENCKENBERG 2007)

Unter günstigen Bedingungen kann die Geschlechtsreife in südlichen Gewässern bereits ab einem Alter von vier Monaten eintreten. Bis die Austern dann eine Größe von etwa 75 mm erreicht haben und von kommerziellem Interesse sind, dauert es je nach Temperatur, Salzgehalt und Futterangebot etwa 12 bis 36 Monate (MATTHIESSEN 2001). Austern leben in einer Tiefe von 0-80 m, bevorzugen jedoch die Gezeitenzone. Die von ihnen als Substrate genutzten Untergründe können recht verschieden sein: Felsen, flache Steine und Kieselsteine, Kies und Schlick (auch mit Kies- oder Sandbeimischung). Auch künstlich geschaffene Untergründe, wie etwa Holz oder Metall, werden angenommen. Festen Untergründen wird in jedem Fall der Vorzug gegeben. Austern tolerieren Salzgehalte von 10-30 ppt (optimal 15-18 ppt), die Strömung sollte moderat sein und genügend Futterpartikel herbeiführen. Der optimale Sauerstoffgehalt liegt über 3 ppm und darf 5 ppm nicht dauerhaft unterschreiten (GOSLING 2003b). Durch ihre hohe Filterleistung von etwa 240 l pro Tag klären die Austern das Wasser in ihrer Umgebung sehr effektiv und sind somit auch ökologisch sehr wertvoll. Der hohe Wasserdurchsatz bedingt jedoch auch, dass Schadstoffe und Mikroorganismen jeglicher Art sich stark in den Tieren anreichern. Dies hat zu Konsequenzen für die Muschel selbst: Schadstoffkonzentrationen im Wasser, die für andere Meeresbewohner unbedenklich sind, können wegen der Aufkonzentration bei Austern zum Tode führen. Zum anderen stellt schadstoffbelastetes oder mikrobiologisch kontaminiertes Muschelfleisch eine Gefahr für den Konsumenten dar, insbesondere dann, wenn das Muschelfleisch, wie bei der Auster üblich, nicht oder nur unzureichend erhitzt wird.

Beispiele für Kontaminationen mit Mikroorganismen sind neben den hier besprochenen Viren auch Polymyelitis- und Coxsackieviren, Choleraerkrankungen und Vibrionen. Erwähnung verdient auch die durch Schadstoffe bedingte japanische Minamata-Krankheit. Sie wird durch den Verzehr von quecksilberhaltigem Muschelfleisch ausgelöst (AHNE 2000).

2.1.10.3 Austernzucht

2.1.10.3.1 Geschichte

Austern gelten seit der Antike als Delikatesse. 350 v. Chr. beschrieb Aristoteles die Kultur von Austern auf Tonscherben, die man im Meer versenkte, in Griechenland. Zugleich leitet sich der lateinische Name *Ostreidae* vom griechischen οστό für Knochen ab. Im antiken Rom wurde die Technik der Kultivierung weiterentwickelt und verfeinert. Die Jungaustern wurden eingesammelt und in geeigneten Buchten aufgezogen. Nach dem Untergang des römischen Reichs geriet die Technik der Austernkultivierung in Vergessenheit und wurde in Europa erst im 19. Jahrhundert wiederentdeckt, während sie in Japan bereits im 17. Jahrhundert eingeführt wurde. Im Mittelalter und in der frühen Neuzeit wurden in Europa lediglich Bestände wilder Austern eingesammelt, später dann mit Booten und Schürfnetzen, seltener mit Rechen, abgefischt. Besonders die französische Stadt Cancale erlangte als bedeutendes Zentrum der Austernfischerei Bedeutung.

Die zunehmenden Fangmengen ließen die natürlichen Ressourcen schnell schwinden. 1750 wurde die Austernfischerei in der Bucht von Arcachon für drei Jahre komplett verboten und 1759 wurde in ganz Frankreich die Austernfischerei in den Monaten Mai bis Oktober untersagt. Diese und weitere Verordnungen sorgten für eine geringe Erholung der Bestände, es war jedoch klar, dass der Bedarf aus den natürlichen Beständen nicht gedeckt werden konnte. Deshalb wurde ab der Mitte des 19. Jahrhunderts die antike Kunst der Austernkultivierung erneut genutzt. Traditionell wurden in Europa die einheimischen Europäischen Austern (*Ostrea edulis*) gezüchtet bzw. gefischt.

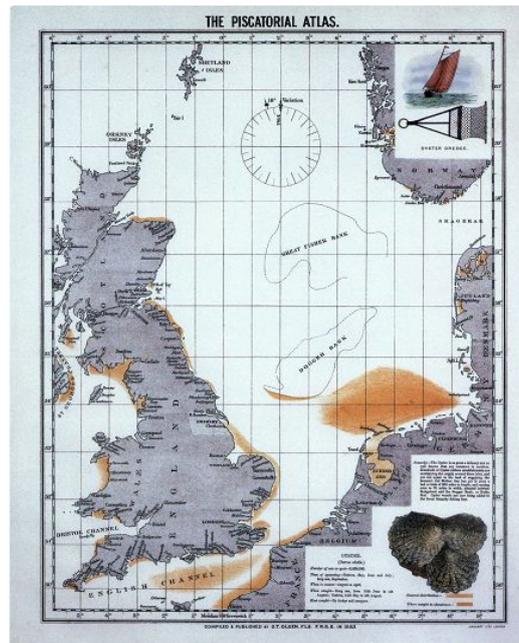


Abbildung 16: Vorkommen der einheimischen Auster (*Ostrea edulis*); Karte: Olsen, 1883 (Quelle: SENCKENBERG 2007)

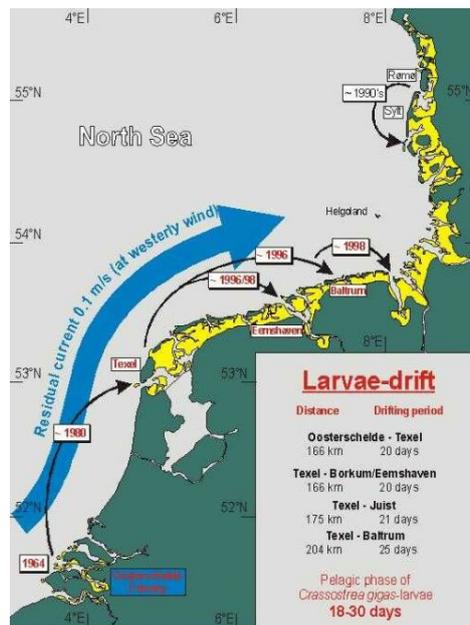


Abbildung 17: Ausbreitung der Pazifischen Auster nach der Drift-Hypothese (Karte: A. WEHRMANN et al. 2000, Quelle: SENCKENBERG 2007)

In Portugal kam es während dieser Zeit erstmals zur Einführung der Austernart *Crassostrea angulata* aus dem Fernen Osten. Diese, im Vergleich zur Europäischen Auster, größere und widerstandsfähigere Art vermehrte sich rasch und gelangte durch Bioinvasion bald auch in die französischen Küstengewässer, wo sie 1900 bereits die Hälfte der gesamten Produktionsmenge ausmachten (MATTHIESSEN 2001).

Durch die in den 20er Jahren des 20. Jahrhunderts in Japan entwickelte Langleinenzucht wurde es möglich, Austern auch außerhalb der Gezeitenzone zu kultivieren und die Produktionsraten stiegen kontinuierlich an.

Der Winter 1962/63 war in Europa der kälteste seit Beginn der meteorologischen Aufzeichnungen. Die Küstengewässer Nordeuropas waren monatelang zugefroren. Es folgten Virusepidemien („maladie des branchies“) in den Jahren 1966 und 1976, die den Bestand der Portugiesischen Felsenauster komplett zugrunde richteten. Studien zufolge konnten zwei Virusarten für das Massensterben verantwortlich gemacht werden: das „gill necrosis virus“ (GNV) sowie das „hemocytic infection virus“ (HIV). In den 70er Jahren ging dann auch der Restbestand an Europäischen Austern durch Epidemien zugrunde. In beiden Fällen wurden die Protozoen *Marteilia refringens* und *Bonamia ostreae* als Überträger der Viren identifiziert. Die Viren verbreiteten sich nach und nach in ganz Europa; vor allem traditionell auf die Zucht von *Ostrea edulis* spezialisierte Nationen wie Spanien, die Niederlande, Dänemark und Großbritannien konnten sich nie mehr ganz von den Folgen der Epidemie erholen (MATTHIESSEN 2001). An der deutschen Nordseeküste war die Europäische Auster bereits in den 40er Jahren durch permanente Überfischung im Zusammenspiel mit kalten Wintern und Parasitenbefall ausgerottet, in der Deutschen Bucht gab es bereits im 18. Jahrhundert keine Austern mehr. Hier schlugen auch die Versuche exotische Austern, wie die Portugiesische Felsenauster, zu kultivieren fehl, da die Wassertemperaturen an der deutschen Küste sich als zu niedrig erwiesen (WEHRMANN und SCHMIDT 2005). Durch die Einführung der Pazifischen Felsenauster (*Crassostrea gigas*) konnten die Probleme der Austernzucht gelöst werden. Die Spezies scheint gegenüber den oben erwähnten Parasiten und Viren resistent zu sein und zeichnet sich - anders als andere tropische Austern - durch eine hohe Resistenz gegenüber Umwelteinflüssen und eine enorme Anpassungsfähigkeit aus.

Der erste Erfolg in der Austernkultivierung gelang mit der Einführung dieser Spezies 1965 in der Oosterschelde (Holland). In Deutschland gibt es mit dieser Art eine Austernzucht seit 1986 auf der Insel Sylt. Durch Brutfälle nach warmen Sommern entstanden in den oben genannten Gebieten seit etwa 1975 (Oosterschelde) bzw. 1991 (Sylt) erste Wildpopulationen auf festem Untergrund. Von dort aus gelangte die Pazifische Auster im Laufe der folgenden Jahrzehnte Schritt für Schritt über die westfriesische Küste auch ins ostfriesische Wattenmeer. Eine ähnliche Ausbreitung war im nordfriesischen Wattengebiet zu beobachten. Aufgrund der in Nord-Süd-Richtung verlaufenden Küstenströmung erfolgte hier aber die Drift in entsprechend anderer Richtung (s. Abbildung 17).

Seit 2003 wird die Bioinvasion der Pazifischen Auster innerhalb des Nationalparks Niedersächsisches Wattenmeer und die Auswirkung auf das Ökosystem über drei Jahre in einem von der Niedersächsischen Wattenmeerstiftung geförderten Projekt untersucht (WEHRMANN und SCHMIDT 2005). In Folge der Einführung dieser Spezies konnte sich Frankreich relativ rasch von den großen Epidemien erholen und produziert heute über 90 % der europäischen Gesamtvolumens an Austern.

2.1.10.3.2 Austernzucht heute

Gegenwärtig werden ca. 300 Fisch-, Krebs- und Weichtierarten in Aquakulturen gezüchtet (FAO 1999), wobei hochwertige Erzeugnisse bevorzugt werden. Nach FAO-Statistiken ist seit 1970 die Aquakultur im Vergleich zur Fischerei oder Landwirtschaft der am schnellsten wachsende Sektor der Nahrungsmittelerzeuger. Während 1980 gegenüber 3.750 Mio. Tonnen tierischer Produkte aus der Landwirtschaft sowie 71 Mio. Tonnen aus der Fischerei nur 8 Mio. Tonnen aus der Aquakultur stammten (0,21 %), wurden 1997 schon 36 Mio. Tonnen aquatischer Organismen produziert. Hierbei nehmen Fisch und Muscheln ca. 75 % der Produktion ein (KINNE 1991, TACON 1998). 80 % dieses Ertrages stammen aus Dritte-Welt-Ländern oder Schwellenländern, angeführt von China, Indien, Philippinen und Indonesien. Das gesamte Asien, gefolgt von Südamerika und Afrika, besitzt einen Anteil von 89 % an dieser Produktion, wobei Japan mit marinen Aquakulturen im Inshore-Bereich führend ist (LEE und TURK 1998, RANA 1997).

Durch ihr hohes Potential zu schnellem Wachstum und ihre hohe Toleranz gegenüber verschiedenen Umweltbedingungen wurde die Pazifischer Felsenauster (*Crassostrea gigas*) zur weltweit bevorzugten Austernspezies für Aquakulturen. Ursprünglich in Japan beheimatet, wo diese Spezies schon seit Jahrhunderten gezüchtet wird, wurde sie von hier in viele Teile der Welt verbracht: in den 20er Jahren des 19. Jahrhunderts wurde die Auster erstmals an der Westküste der USA eingeführt, 1966 kam sie nach Frankreich.

Eine Liste der bekannten Einführungen zum Zweck der Kultivierung in anderen Ländern findet sich unter <http://www.fao.org/fi/website/MultiQueryAction.do>. Die Austern wurden dabei entweder neu eingeführt, um bestehende heimische Austernbestände, welche durch Krankheit oder Überfischung stark geschädigt waren, zu ersetzen oder Austernzuchten an Orten, wo es diesen Erwerbszweig bisher nicht gab, neu aufzubauen. In vielen Gebieten erfolgte zudem eine zufällige Einschleppung der Larven, die im Ballastwasser von Schiffen mitgeführt wurden (MATTHIESSEN 2001).

2004 wurden nach Angaben der FAO weltweit 4,4 Mio. Tonnen Pazifischer Felsenaustern (*Crassostrea gigas*) in Aquakulturen produziert. Das entspricht einem Gegenwert von 2,6 Milliarden US\$. Sie ist damit die Spezies mit dem größten, weltweiten Produktionsvolumen in Aquakultur, gefolgt von drei Arten von Karpfenfischen. Nach offiziellen Statistiken ist China der weltweit größte Produzent, gefolgt von Japan, Korea und Frankreich.

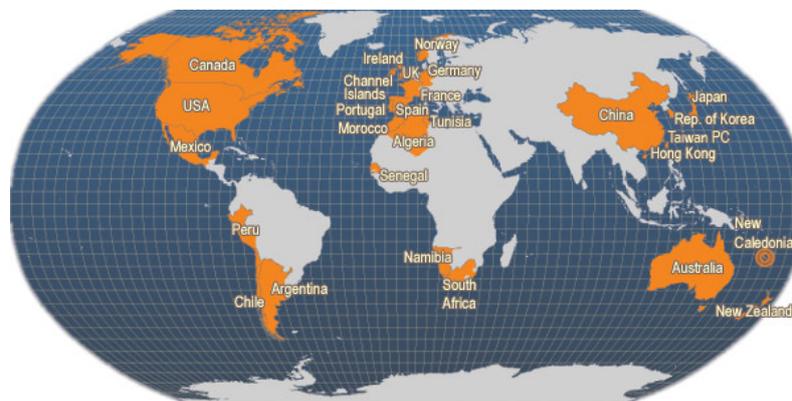


Abbildung 18: Hauptproduzenten von *Crassostrea gigas* (FAO Fishery Statistics 2002)

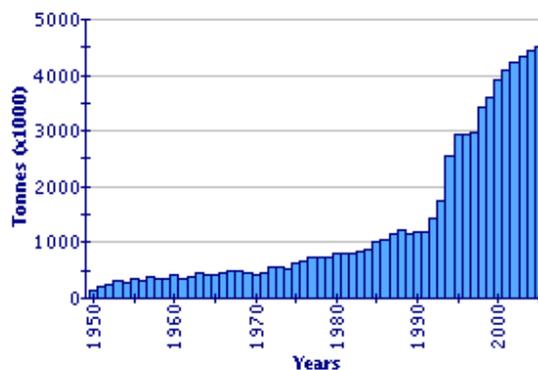


Abbildung 19: *Crassostrea gigas*: weltweite Produktion (FAO Fishery Statistics 2002)

An zweiter Stelle der gefarmten Austernarten folgt die Amerikanische Auster (*Crassostrea virginica*) mit 5,1 % Weltmarktanteil. Sie herrscht heute im amerikanischen Raum vor. Ihr Herkunftsgebiet reicht vom Golf v. St. Lawrence in Kanada bis zum Golf v. Mexiko und den Küsten von Brasilien bis Argentinien. Sie wurde an der Westküste Nordamerikas eingeführt und macht heute mit etwa 30 Mio. Pfund Austernfleisch etwa 75 % der gesamten Austerproduktion in den USA aus.



Abbildung 20: Hauptproduzenten von *C. virginica* (FAO Fishery Statistics 2002)

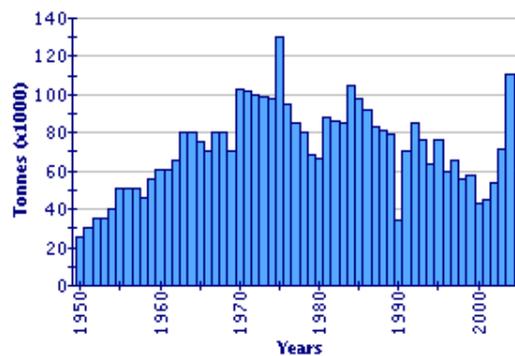


Abbildung 21: *C. virginica*: weltweite Produktion (FAO Fishery Statistics 2002)

Die bei Verbrauchern hoch geschätzte heimische Europäische Auster (*Ostrea edulis*) findet sich heute sehr selten (0,2 %).



Abbildung 22: Hauptproduzenten von *Ostrea edulis* (FAO Fishery Statistics 2002)

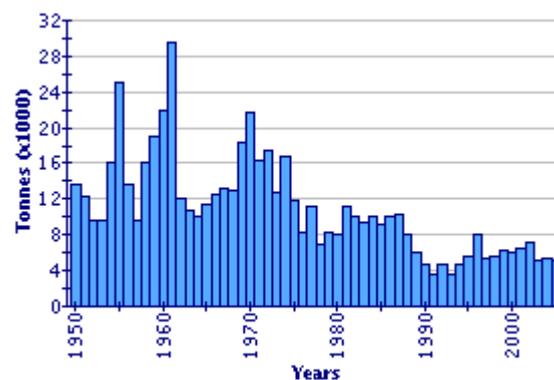


Abbildung 23: *Ostrea edulis*: weltweite Produktion (FAO Fishery Statistics 2002)

Die Europäische Auster wird in Europa in verschiedenen Zuchtgebieten kultiviert und nach ihnen benannt:

- Frankreich: Marennes, Bouzigue, Gravettes d'Arcachon, Belon-Austern
- Niederlande: Imperial- und Zeeland-Auster
- Belgien: Ostender Auster
- Dänemark: Limfjordauster
- Großbritannien: Colchester und Whitestables
- Irland: Galway und Cork

Nahezu alle weltweit auf den Markt gelangenden Austern entstammen heute Aquakulturen. Die Methoden der Kultivierung dieser Muscheln sind ausgesprochen verschieden und reichen von einfachen Verfahren, mit sehr geringer Einflussnahme und Kontrolle, bis zu hoch intensiven Zuchtmethoden. Die Aquakulturanlagen können je nach wirtschaftlichem Interesse, Aufwand und Machbarkeit traditionell oder extensiv, semi-intensiv oder intensiv bzw. ultraintensiv betrieben werden (RÖNNEBÄCK 2001, BAKER und JIA 2000). Bei einer extensiven Anlage ernähren sich die kultivierten Organismen von dem in ihrer Umgebung natürlich vorhandenem Futterangebot, kein zusätzliches Futter wird verabreicht. Eingriffe in das vorhandene Ökosystem beschränken sich meist auf die Abwehr von Fressfeinden und einem gelegentlichen Umsetzen zur Sicherung der Ernährung und zur Vorbeugung möglicher Wasserverschmutzungen (RÖNNEBÄCK 2001, KINNE 1991). Das Input-Output-Verhältnis ist gering. Die Austern- und anderen Muschelzuchten werden noch heute hauptsächlich extensiv betrieben. Je mehr Kontrolle und Management in eine Kultur einfließt, um so mehr rückt sie über eine semi-intensive Betreibung hin zu einer intensiven bzw. ultra-intensiven Aquakultur. Bei einer intensiv betriebenen Aquakulturanlage ist das Input-Output-Verhältnis sehr groß. Der Technologieaufwand gestaltet sich komplexer und moderner, Besatzdichten sind größer und der gesamte Lebenszyklus eines Organismus vom Ei über das Larvalstadium bis hin zum ausgewachsenen Tier wird bewacht (BUCK 2002).

Die einfachste Form der Kultivierung besteht darin, Austernschalen, Muschelschalen oder andere Untergrundmaterialien in einem Gebiet abzulegen, in dem sich die Larven bevorzugt niederlassen. In etwa ein bis drei Jahren können die Austern dann, abhängig von ihrer Wachstumsrate, geerntet werden. In einigen Fällen werden die Jungaustern auch in Gebiete umgesetzt, die durch bessere Umweltbedingungen ein schnelleres Wachstum versprechen. In den intensiven Kulturen werden Austern, welche sich in der Phase der Fortpflanzung befinden, in Pools plaziert. Die Larven werden dann in spezielle Becken verbracht, in denen ihnen sehr nährstoffreiches Futter (Algen wie beispielsweise *Isochrysis*, *Chaetoceros* oder *Tetraselmis*) zugeführt wird. Der Zucht dieser Algen wird dabei sehr große Bedeutung beigemessen. Die Larven werden dann im Alter von 14 bis 16 Tagen aus den Becken abgefischt und in Becken überführt, in denen sie sich auf Austerschalen, die sich in großen Gittertaschen befinden, ansiedeln können. Die Austerschalen sind hierbei gründlich gereinigt und etwa 6 Monate abgelagert. In jede Gittertasche werden etwa 40 Pfund Austerschalen verbracht. Diese Taschen werden in helle, belüftete Tanks eingesetzt, die gefiltertes Seewasser enthalten. Pro Austerschale werden 100 Larven eingesetzt. Das Ziel ist eine Besiedlungsdichte von 20-30 Jungaustern pro Schale. Die Tanks werden dann für 48 Stunden verdunkelt. Die Gittertaschen werden dann den Tanks entnommen und in Austernparks gebracht.

Hier werden sie dann auf Paletten, an Flößen oder an speziellen Gestellen befestigt. Die Aufzuchtparcs sind abgesteckte, durch Gitter geschützte Parzellen in der Gezeitenzone, durch die planktonreiches Wasser fließt. Nachdem die Austern eine Länge von 25 mm erreicht haben, werden sie aus den Gittertaschen genommen und in abgegrenzte Gebiete umgesiedelt, in denen das weitere Wachstum erfolgt. Hier ergibt sich auch ein gewisser Schwund durch Räuber wie Krabben und Austernwürmer vor allem dann, wenn die Brut beim Umsetzen beschädigt wurde. Unter guten Bedingungen erreichen drei bis fünf Austern pro Schale die Marktreife. In Frankreich geschieht das Mästen und Verfeinern in so genannten Claires, flachen Becken oder ehemaligen Meeressalinen, in denen das Wasser sehr planktonreich aber nicht mehr so salzig ist wie in den Austenparks.

Ein durchschnittlicher Claire ist etwa 40 m lang, 12 m breit und mindestens 0,5 m tief. Der Boden besteht aus Ton. Er wird in einem jährlichen Rhythmus nach dem Ablassen des Wassers durch Luft und Sonne ausgetrocknet. Diese Trocknung bewirkt nach dem Wiederbefüllen des Beckens eine bevorzugte Besiedelung desselben mit speziellen Planktonpartikeln (*Navicula ostrearia*), die den Austern später ein typisches Aroma und einen grünlichen Farbton verleihen. Beides steigert den Marktwert beträchtlich. Innerhalb von zehn bis zwölf Monaten erreichen die Austern ihre optimale Qualität. Die berühmtesten Claires sind jene im französischen Marennes-Oleron.

Am Schluss werden die Austern noch für einige Tage in saubere Bassins verbracht, in denen sie Sand und andere Verunreinigungen ausscheiden (MATTHIESSEN 2001). Eine alternative Methode besteht darin, die Larven auf winzigen Stückchen von Austerschalen anzusiedeln, welche sich auf feinen Filtern befinden. Dies geschieht in eimer- bis fassgroßen Containern. Normalerweise setzt sich bei dieser Methode nur eine Larve auf ein Stückchen Austern fest. Es werden somit Einzeltiere produziert.

Innerhalb Europas besitzt Frankreich die bei weitem größten Marktanteile an der Austernproduktion. Die jährliche Produktionsmenge der französischen Erzeuger, die hauptsächlich für den einheimischen Markt bestimmt ist, beträgt mehr als 100.000 Tonnen Austern. Hauptabnehmer für französische Austern in Europa ist Italien (FAO 2005, MATTHIESSEN 2001).

Tabelle 2: Französische Austern Exporte Januar-September (in Tonnen). Quelle: FAO

Land	2003	2004	Zuwachs/Abnahme in %
Italien	2.860	2.930	+ 2
Belgien	310	280	- 10
Deutsch- land	250	260	+ 4
Spanien	210	250	+ 19
Andere	390	410	+ 5
Gesamt	4.020	4.130	+ 3

Die deutschen Importmengen sind, wie die Tabelle zeigt, gering und liegen unter 1000 Tonnen im Jahr. Frankreich ist, wie auch in Italien, Marktführer.

Tabelle 3: Gesamtmenge der Austernimporte in Deutschland (in Tonnen). Quelle: FAO

Herkunft	2001	2002	Zuwachs/Abnahme %
Frankreich	470	520	+ 11
Andere	360	230	- 36
Gesamt	830	750	- 10

2.1.11 Rechtliche Rahmenbedingungen

2.1.11.1 Anforderungen an Muschelerzeugungsgebiete

Alle Muschelerzeugungsgebiete in der Europäischen Union befinden sich in sog. Muschelgewässern. Die Qualitätsanforderungen an solche Gewässer sind durch die Richtlinie des Rates vom 30. Oktober 1979 beschrieben; es wurden Parameter festgelegt, für die Richtwerte und/oder imperative Werte in den entsprechenden Gewässern eingehalten werden müssen. Neben Grenzen für pH-Wert, Temperatur, Salzgehalt und gelöstem Sauerstoff wurden unter anderem Färbung und Schwebstoffgehalt sowie die Konzentration bestimmter Metalle festgelegt. Diese Richtlinie des Rates wurde im Folgenden in das nationale Recht der einzelnen Erzeugerländer übernommen.

Kommerziell genutzte, europäische Muschelerzeugungsgebiete werden des Weiteren, je nach Grad ihrer fäkalen Verunreinigung in drei Kategorien (A, B oder C) eingeteilt. Die Klassifizierung wurde, basierend auf der Richtlinie Nr. 91/492/EWG des Rates vom 15. Juli 1991, im dritten Abschnitt der Verordnung über die hygienischen Anforderungen an Fischereierzeugnisse und lebende Muscheln (FischHV) geregelt. Im Kapitel 1 der Anlage 2 dieser Verordnung unterscheidet der Gesetzgeber zwischen Gebieten, aus denen die Muscheln zum unmittelbaren Verzehr geerntet werden dürfen (Klasse A), und solchen Gebieten, aus denen die Muscheln erst nach einer entsprechenden Aufbereitung in einem Reinigungszentrum oder nach Umsetzen in andere Gewässer in den Verkehr gebracht dürfen (Klasse B und C).

Grundlage für die Klassifizierung bildet der Gehalt an Fäkalbakterien im Fleisch der aus den jeweiligen Gebieten stammenden Muscheln. Demnach müssen lebende Muscheln aus Gebieten der Klasse A, die zum sofortigen Verzehr bestimmt sind, in einem 5-tube-3-dilution MPN-Test (oder in einem anderen bakteriologischen Verfahren mit entsprechender Genauigkeit) mit weniger als 300 Fäkalcoliformen oder weniger als 230 *E. coli* je 100 g Muschelfleisch und Schalenflüssigkeit kontaminiert sein. Weisen 90 von 100 Muschelproben in dem oben genannten Testverfahren einen Gehalt von maximal 6.000 Fäkalcoliformen oder 4.600 *E. coli* je 100 g Muschelfleisch auf, so dürfen die Tiere zwar geerntet werden, müssen aber vor dem Inverkehrbringen in einem Reinigungszentrum aufbereitet bzw. in ein Umsetzungsgebiet verbracht werden. Bei Muscheln aus Erzeugergebieten der Klasse C liegt der Höchstwert an Fäkalcoliformen bei 60.000 je 100 g Muschelfleisch. Schalentiere aus solchen Gebieten dürfen zwar ebenfalls geerntet werden, müssen aber zuvor für mindestens zwei Monate in ein entsprechendes Umsetzungsgebiet verbracht werden.

Für Muscheln aus den letztgenannten Gebieten gilt, dass nach der Aufreinigung alle Anforderungen von Kapitel V des Anhangs erfüllt sein müssen.

Seit dem 01. Januar 2006 ist die Richtlinie Nr. 91/492/EWG durch die Richtlinie Nr. 2004/41/EG aufgehoben. Somit bildet nun die Verordnung (EG) Nr. 854/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates mit besonderen Verfahrensvorschriften für die amtliche Überwachung von zum menschlichen Verzehr bestimmten Erzeugnissen tierischen Ursprungs die Grundlage für die Klassifizierung der Muschelerzeugungsgebiete. Die Verordnung übernahm in weiten Teilen die oben beschriebene Klassifizierung der Gebiete. Die Einteilung in die Klassen A, B oder C geschieht nun jedoch ausschließlich auf der Grundlage des Gehaltes an *E. coli* in Muschelfleisch und Schalenflüssigkeit. Als Referenzmethode dient weiterhin der 5-tubt-3-dilution MPN-Test nach ISO/TS 16649-3 (ISO 2005). Danach müssen Muscheln aus Gebieten der Klasse A die Anforderungen an lebende Muscheln, die für den unmittelbaren Verzehr bestimmt sind, erfüllen. In Muscheln aus Gebieten der Klasse B dürfen maximal 4.600 *E. coli* je 100 g Muschelfleisch und Schalenflüssigkeit nachgewiesen werden, in Muscheln aus Gebieten der Klasse C max. 46.000 *E. coli* je 100 g Muschelfleisch und Schalenflüssigkeit. Die letztgenannten Muscheln müssen vor dem Inverkehrbringen weiterhin mit entsprechenden, oben genannten Aufreinigungsverfahren hygienisiert werden.

2.1.11.2 Anforderungen an lebende Muscheln, die für den unmittelbaren menschlichen Verzehr bestimmt sind

Lebende Muscheln, die innerhalb der EU in den Verkehr gebracht werden müssen aus Erzeugergebieten stammen, die den unter 2.1.11.1 genannten Anforderungen genügen, sowie den Anforderungen der Anlage 4 Kapitel V Nr. 1.2 der VO zur Durchführung von Vorschriften des gemeinschaftlichen Lebensmittelhygienerechts entsprechen. Die Tiere müssen demnach sichtbare Merkmale aufweisen, die auf ihren Frischezustand und Lebensfähigkeit schließen lassen. Hierzu gehören eine schmutzfreie Schale, eine Klopfreaktion und ausreichende Mengen an Schalenflüssigkeit. Neben den bereits genannten Grenzwerten für *E. coli* dürfen in 25 g Muschelfleisch keine Salmonellen nachgewiesen werden.

Die seit dem 01. Januar 2006 in Kraft getretenen VO (EG) Nr. 853/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates mit spezifischen Hygienevorschriften für Lebensmittel tierischen Ursprungs und VO (EG) Nr. 2073/2005 der Kommission über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel sehen vor, dass fünf Proben á 25 g auf Salmonellen untersucht werden; in keiner der Proben darf der Erreger nachgewiesen werden. Weiterhin dürfen in einer Sammelprobe aus mindestens 10 einzelnen Tieren die genannten Grenzwerte an *E. coli* in 100 g Muschelfleisch und Schalenflüssigkeit nicht überschritten werden. Weiterhin müssen die Tiere auf von Dinoflagellaten produzierte Algentoxine, Radionukleotide, Schwermetalle (Hg, Pb, Cd, Ag, und Ni) und organische Stoffe untersucht werden.

3 Materialien und Methoden

3.1 Probenmaterial

Über einen Zeitraum von 16 Monaten (März 2005 bis Juli 2006) wurden, allerdings mit Unterbrechungen wegen Lieferproblemen, bis zu vier Chargen lebender Pazifischer Felsenaustern (*Crassostrea gigas*) pro Monat aus verschiedenen europäischen Ursprungsgebieten erfasst. Von jeder Charge wurden je 12 Austern auf Noroviren und unter dem Vorbehalt einer ausreichenden Probenmenge auch auf HAV untersucht.

25 g des verbleibenden Probenmaterials wurden zur Erstellung eines mikrobiologischen Profils verwendet. Es wurden insgesamt 477 Einzelproben auf Noroviren und 372 Einzelproben auf HAV getestet. Die Proben stammten von einem Importeur, der seine Produkte deutschlandweit vertreibt. Es handelte sich sowohl um Ware, die aus Frankreich, Irland und den Niederlanden eingeführt wurde, als auch um Deutsche Austern von der Insel Sylt (s. Tabelle 4).

Tabelle 4: Verteilung der Austernproben nach Herkunft

Herkunft	Menge
Frankreich (Joguet, Dublaix)	432
Deutschland (Sylter Royal)	206
Irland (Donegal Rock Oysters)	154
Niederlande (Zeeuwse Oesters)	24

3.2 Methoden

3.2.1 Probennahme im Betrieb

In einem Zeitraum von 16 Monaten wurden insgesamt 12 Probennahmen durchgeführt. Die Proben wurden dabei zufällig aus dem Angebot in der Hauptniederlassung des Importeurs in Bremerhaven ausgewählt, verpackt und gekühlt bei + 4°C in die Berliner Niederlassung verschickt. Von dort erfolgte am selben Tag der Transport der gekühlten Ware mittels Kurier zum Labor. Alle Austern wurden lebend versandt. Die Proben stammten direkt vom Erzeuger und waren in handelsüblichen Verpackungen und Gebindegrößen verpackt.

3.2.2 Molekularbiologische Untersuchungen

3.2.2.1 Probennahme im Labor für die molekularbiologische Untersuchung

Jede Auster wurde mittels eines sterilen Austernmessers geöffnet und danach je 10 g Probenmaterial entnommen. Bei der Probennahme wurde darauf geachtet, dass die Schalen der Tiere fest geschlossen waren und sich eine ausreichende Menge Flüssigkeit in diesen befand. Weiterhin wurden die Organe optisch auf ihre Unversehrtheit untersucht sowie deren Geruch direkt nach dem Öffnen beurteilt. Kleine Austern wurden *in toto* verwendet, bei größeren Tieren wurde der Verdauungstrakt präpariert und eventuell noch fehlendes Probenmaterial gleichmäßig aus allen Teilen der Auster präpariert. Die in den Austern enthaltene Flüssigkeit wurde mit einer sterilen Spritze abgesaugt und dem entnommenen Probenmaterial zugefügt. Die Proben wurden anschließend in sterile Stomacherbeutel verbracht und bis zu ihrer weiteren Bearbeitung verschlossen bei + 6°C aufbewahrt.

3.2.2.2 Probenaufbereitung für die Molekularbiologische Untersuchung^{1, 2}

Die zuvor entnommene Probe wurde im Stomacherbeutel mit Phosphatpuffer (PBS DULBECCO, Rezept s. 10.2.2) 1:10 verdünnt und anschließend in einem elektromechanischen Mixgerät (Stomacher) homogenisiert (Erstverdünnung).

¹ Ein Schema zur Probenaufbereitung zeigt Abbildung 24

² Die Aufbereitung der Proben erfolgte in Anlehnung an ein Protokoll des ILAT, Berlin

Danach wurde das so verdünnte Probenmaterial 48 Stunden im Puffer belassen und während dieser Zeit mindestens dreimal 1 min lang manuell gewalkt. 10 ml des flüssigen Bestandteils wurden dann in ein Zentrifugenröhrchen überführt und 10 min bei 1000 x g sedimentiert. Der Überstand wurde danach durch einen 0,45 µm Spritzenfilter gereinigt. 4 ml der gereinigten Probe wurden auf einen Vivaspin®-Konzentrator Vivaspin 4® (50000 MWCO) gegeben und bei 3000 x g und 15°C so lange zentrifugiert, bis ein Endvolumen von 150 µl erreicht war. Die RNA-Extraktion wurde direkt im Anschluss mit dem QiAmp Viral RNA Minikit®, der Firma Qiagen, Hilden durchgeführt.

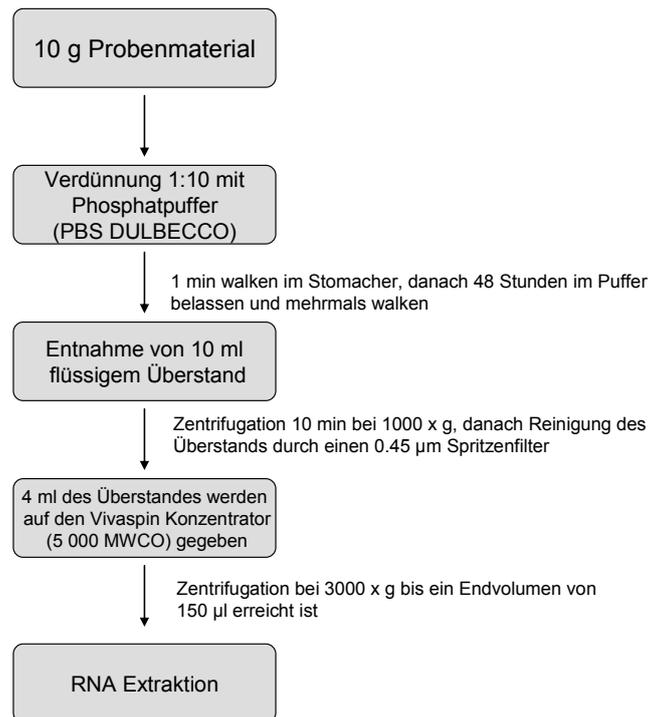


Abbildung 24: Fließschema zur Probenaufbereitung³

3.2.2.3 Norovirus-PCR

Die aus den Austern extrahierten Nukleinsäuren wurden im nächsten Schritt durch reverse Transkription und PCR nachgewiesen. Im Fall der Noroviren wurde die Untersuchung sowohl als konventionelle RT-PCR als auch als Real-Time PCR durchgeführt. In der konventionellen PCR kam dazu das MON Primer System nach BEURET et al. (2002, nach MONROE) und RICHARDS et al. (2004) zur Verwendung. Als Amplifikationskontrolle, welche in der konventionellen PCR durchgeführt wurde, diente die RNA des Phagen MS2 DSM13767 (DREIER et al. 2005). Die Reaktionsbedingungen sind der Tabelle 6 zu entnehmen. Das Real-Time System benutzte das Primer-Sonden-System nach HÖHNE und SCHREIER (2004).

³ Aufbereitung der Proben in Anlehnung an ein Protokoll des ILAT, Berlin

Alle Untersuchungen der konventionellen RT-PCR wurden mit dem Qiagen® OneStep RT-PCR Kit durchgeführt. Für die Real-Time PCR wurde das QuantiTect® Probe RT-PCR Kit der Fa. Qiagen, Hilden verwendet. Die Reaktionsbedingungen sind der Tabelle 5 zu entnehmen.

Tabelle 5: Reaktionsansatz und Durchführung der Norovirus RT-PCR und Real-Time PCR

System	Reaktionsansatz	Programm
Konventionelles Norovirus Nachweissystem für GGI und GGII	<ul style="list-style-type: none"> • 20 µl RNA Template • 10 µl 5 x Qiagen One Step RT – Puffer mit 12,5 mmol/l MgCl₂ • 400 µmol/l je dNTP • 0,25 µmol/l je Primer • 2 µl One Step RT Enzyme Mix • Wasser ad 50 µl 	<ul style="list-style-type: none"> • 30 min Rev. Transkription, 50°C • 15 min init. Denaturierung und Aktivierung der Polymerase, 95°C • 50 Zyklen mit je: <ul style="list-style-type: none"> • Denaturierung (94°C-30 s) • Annealing (56°C-60 s) • Extension (72°C-60 s) • 10 min abschließende Extension, 72°C
Real-Time System für Norovirus GGI	<ul style="list-style-type: none"> • 10 µl RNA Template • 5 µl 5 x Qiagen One Step RT – Puffer mit 12,5 mmol/l MgCl₂ • 400 µmol/l je dNTP • 0,4 µmol/l je Primer • 0,5 µmol/l Sonde TM6 • 1 µl One Step RT Enzyme Mix • Wasser ad 25 µl 	<ul style="list-style-type: none"> • 30 min Rev. Transkription, 50°C • 15 min init. Denaturierung und Aktivierung der Polymerase, 95°C • 50 Zyklen mit je: <ul style="list-style-type: none"> • Denaturierung (94°C-15 s) • Annealing (56°C-60 s) • Extension (72°C-60 s) • 10 min abschließende Extension, 72°C
Real-Time System für Norovirus GGII	<ul style="list-style-type: none"> • 10 µl RNA Template • 5 µl 5 x Qiagen One Step RT – Puffer mit 12,5 mmol/l MgCl₂ • 400 µmol/l je dNTP • 0,4 µmol/l je Primer • 1,5 µmol/l Sonde TM3 • 1 µl One Step RT Enzyme Mix • Wasser ad 25 µl 	<ul style="list-style-type: none"> • Datenaufnahme bei 56°C u. 72°C

Tabelle 6: Reaktionsansatz und Durchführung der Amplifikationskontrolle

System	Reaktionsansatz	Programm
Amplifikationskontrolle MS2	<ul style="list-style-type: none"> • 10 µl RNA Template • 1,5 µl RNA Template MS2 • 5 µl 5 x Qiagen One Step RT – Puffer mit 12,5 mmol/l MgCl₂ • 400 µmol/l je dNTP • 0,2 µmol/l je Primer • 1 µl One Step RT Enzyme Mix • Wasser ad 25 µl 	<ul style="list-style-type: none"> • 30 min Rev. Transkription, 50°C • 15 min init. Denaturierung und Aktivierung der Polymerase, 95°C • 50 Zyklen mit je: <ul style="list-style-type: none"> • Denat. (94°C-15 s) • Annealing (56°C-60 s) • Extension (72°C-60 s) • 10 min abschließende Extension, 72°C

Die PCR Produkte der konventionellen PCR wurden mit Hilfe der Powerpack p 25[®] Elektrophorese in einem 2%igen Agarosegel aufgetrennt und die Ergebnisse anschließend mit dem Alphamager[®] Dokumentationssystem dokumentiert (s. Abbildung 25). Die Daten der Real-Time PCR wurden durch die Software des Biorad[®] iCycler iQ ausgewertet (s. Abbildung 26).

Die als Positivkontrolle dienenden humanen Stuhlproben wurden in PBS-Pufferlösung seriell verdünnt und in einer Verdünnung von 10⁻² der RNA-Extraktion und anschließenden RT-PCR unterzogen. Hierzu wurden 140 µl der verdünnten Probe verwendet.

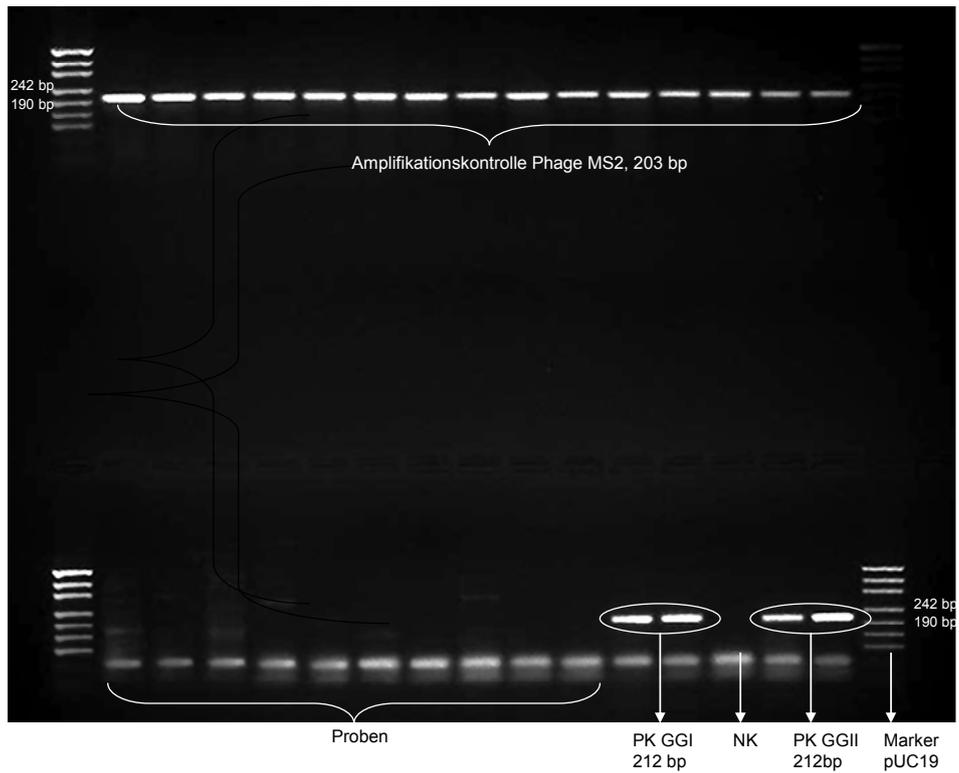


Abbildung 25: Konventionelle RT-PCR, MON Primersystem (PK=Positivkontrolle, NK=Negativkontrolle)

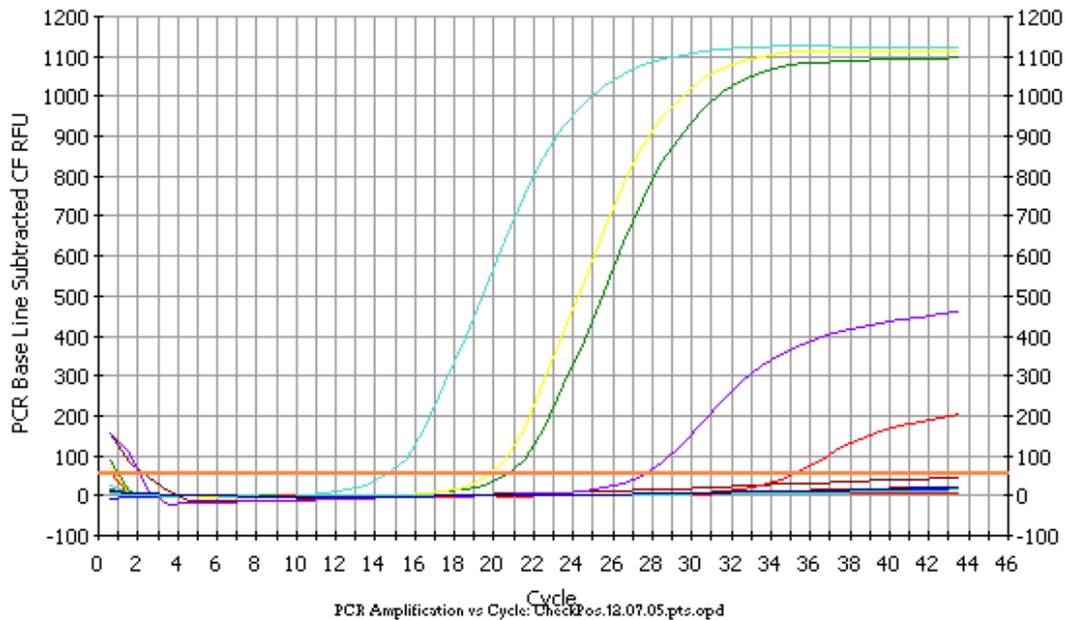


Abbildung 26: Real-Time PCR, Primer-Sondensystem nach HÖHNE und SCHREIER (2004). Dargestellt sind die NV GGII Positivkontrollen und die Negativkontrollen (Wasser)

3.2.2.4 HAV-PCR

Die Untersuchung auf HAV erfolgte ausschließlich mit Hilfe der Real-Time PCR. Alle Reaktionen wurden mit dem RealArt® HAVLC RT-PCR Kit auf einem LightCycler® 2.0 Instrument der Fa. Roche Diagnostics durchgeführt. Das System enthielt ein zusätzliches heterologes Amplifikationssystem, wodurch eine mögliche PCR-Inhibition erkannt werden konnte. Die externen Positivkontrollen für die Untersuchung auf HAV waren dem verwendeten Kit in vier unterschiedlichen Verdünnungen beigelegt. Sie bedurften keiner weiteren Aufbereitung. Die aufgereinigt RNA sowie die Positivkontrollen und die interne Amplifikationskontrolle wurden nach einem vorgegebenen Schema (s. Abbildung 27) pipettiert, anschließend die Real-Time PCR im LightCycler® Instrument 2.0 durchgeführt und durch die zugehörige Software ausgewertet.

Tabelle 7: Reaktionsbedingungen für die HAV Real-Time PCR

Schritt	Temperatur	Zeit
Reverse Transkription	50°C	10 min
Aktivierung d.Hot Start-Enzyms	95°C	10 s
Amplifikation der cDNA	95°C	1 s
	55°C	20 s
	72°C	15 s
Kühlen	40°C	30 s

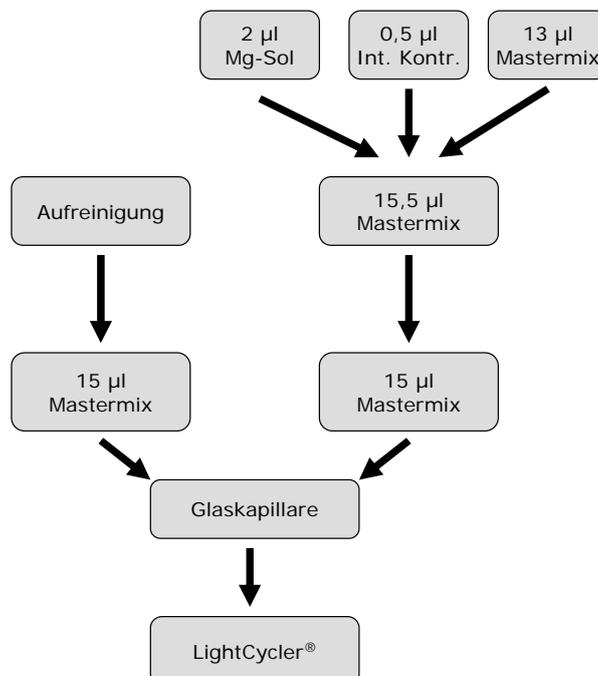


Abbildung 27: Pipettierschema (nach Arbeitsanleitung RealArt® HAV LC RT-PCR Kit)

3.2.3 Bakteriologische Untersuchungen ^{4, 5}

3.2.3.1 Probennahme im Labor für die bakteriologische Untersuchung

Die zu untersuchenden Austern wurden mittels eines sterilen Austernmessers geöffnet, danach 25 g Probenmaterial entnommen und in sterile Stomacherbeutel verbracht. Dabei wurde darauf geachtet, dass ungefähr gleiche Anteile aus allen Organen der Austern verwendet wurden. Die in den Austern enthaltene Flüssigkeit wurde mit einer sterilen Spritze abgesaugt und dem entnommenen Probenmaterial zugefügt.

3.2.3.2 Aufarbeitung der Proben für die bakteriologische Untersuchung

Das entnommene Probenmaterial (25 g) wurde 1:10 mit gepuffertem 1%igen Peptonwasser (Rezept s. 10.1.2.1) verdünnt und anschließend für eine Minute im Stomacher (Stufe normal) homogenisiert. Aus dieser Erstverdünnung wurde dann eine dezimale Verdünnungsreihe bis 10^{-5} unter Verwendung von mit Agar versetztem Peptonwasser (PW) (Rezept s. 10.1.2.2) hergestellt.

3.2.3.3 Isolierung und Differenzierung der einzelnen Keimarten

3.2.3.3.1 Aerobe mesophile Gesamtkeimzahl

Die Bestimmung der aeroben mesophilen Gesamtkeimzahl erfolgte gemäß dem Untersuchungsverfahren L 06.00 – 18, welches in der amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB aufgeführt ist.

Es wurde je eine Plate Count-Agarplatte (PC) (Rezeptur s. 10.1.2.3) in fünf Sektoren aufgeteilt und mit 0,05 ml des Probenansatzes und seiner Verdünnungsstufen tropfenweise beimpft (Drop plating Technik). Nach dem Trocknen der Tropfen wurden die Platten bei 30°C aerob bebrütet. Nach 72 ± 4 Stunden wurden die sichtbaren Kolonien ausgezählt und nach Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor die aerobe mesophile Gesamtkeimzahl pro Gramm Probenmaterial angegeben.

3.2.3.3.2 Aerob wachsende Milchsäurebakterien

Die Bestimmung der aeroben wachsenden Milchsäurebakterien erfolgte nach dem Untersuchungsverfahren L 06.00 – 35, gemäß der amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB.

⁴ Die Rezepturen für die einzelnen Nähr- und Differenzierungsmedien finden sich im Anhang

⁵ Eine Übersicht über die Bebrütungszeiten und –temperaturen der verwendeten Nährböden gibt Tabelle 13

Es wurde je eine Lactobacillus-Agarplatte (LA) (Rezeptur s. 10.1.2.4) in fünf Sektoren aufgeteilt und mit 0,05 ml des Probenansatzes und seiner Verdünnungsstufen tropfenweise beimpft. Nach dem Trocknen der Tropfen wurden die Platten bei 30°C aerob bebrütet. Nach 48 ± 4 Stunden wurden die sichtbaren Kolonien ausgezählt und nach Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor die aerob wachsenden Milchsäurebakterien pro Gramm Probenmaterial angegeben.

3.2.3.3.3 Laktobazillen

Die Bestimmung der Laktobazillen erfolgte gemäß dem Untersuchungsverfahren L 06.00 – 31 der amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB.

Es wurde je eine Lactobacillus-Agarplatte (LS) (Rezeptur s. 10.1.2.5) in fünf Sektoren aufgeteilt und mit 0,05 ml des Probenansatzes und seiner Verdünnungsstufen tropfenweise beimpft. Nach dem Trocknen der Tropfen wurden die Platten bei 30°C anaerob bebrütet. Nach 48 ± 4 Stunden wurden die sichtbaren Kolonien ausgezählt und nach Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor die Laktobazillen pro Gramm Probenmaterial angegeben.

3.2.3.3.4 Pseudomonaden und Aeromonaden

Es wurde je eine Glutamat-Stärke-Phenolrot-Agarplatte (GSP) (Rezeptur s. 10.1.2.6) in fünf Sektoren aufgeteilt und mit 0,05 ml des Probenansatzes und seiner Verdünnungsstufen tropfenweise beimpft. Nach dem Trocknen der Tropfen wurden die Platten bei 30°C aerob bebrütet. Nach 48 ± 4 Stunden wurden die der jeweiligen Koloniemorphologie entsprechenden Kolonien ausgezählt und nach Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor die Pseudomonaden pro Gramm Probenmaterial angegeben.

3.2.3.3.5 Koagulase-positive Staphylokokken

Die Bestimmung der koagulase-positiven Staphylokokken erfolgte gemäß dem Untersuchungsverfahren L 06.00 – 22 der amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB.

Es wurde je eine Staphylokokken-Selektivagarplatte nach Baird-Parker (BP) (Rezeptur s. 10.1.2.11) in fünf Sektoren aufgeteilt und mit 0,05 ml des Probenansatzes und seiner Verdünnungsstufen tropfenweise beimpft. Nach dem Trocknen der Tropfen wurden die Platten bei 37°C aerob bebrütet und nach 40-48 Stunden die typischen Kolonien ausgezählt. Anschließend wurden die Koagulase Bildung der verdächtigen Kolonien getestet. Dazu wurden die ausgewählten Kolonien in mit 5 ml Brain-Heart-Infusion (BHI) (Rezeptur s. 10.1.2.10) gefüllten Reagenzröhrchen überimpft und bei 37°C 20-24 Stunden bebrütet. Nach Ablauf der Bebrütungszeit wurden 0,1 ml der Kultur in ein steriles,

kurzes Reagenzröhrchen verbracht, 0,3 ml Koagulase-EDTA-Kaninchenplasma Bactident® Merck zugegeben, vermischt und bei 37°C aerob bebrütet. Nach vier bis sechs Stunden wurde der Röhrcheninhalt auf Koagulation überprüft und aus den positiven Kolonien nach Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor die Anzahl koagulase-positiver Staphylokokken pro Gramm Probenmaterial ermittelt.

3.2.3.3.6 *Listeria monocytogenes*

Die Bestimmung von *Listeria monocytogenes* erfolgte gemäß dem Untersuchungsverfahren L 00.00 – 22, welches in der amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB aufgeführt ist.

Es wurde je eine PALCAM-Selektivagarplatte (Rezeptur s. 10.1.2.12) in fünf Sektoren aufgeteilt und mit 0,05 ml des Probenansatzes und seiner Verdünnungsstufen tropfenweise beimpft. Nach dem Trocknen der Tropfen wurden die Platten bei 37°C aerob bebrütet. 48 Stunden später wurden von den Platten, auf welchen für *Listerien* charakteristische Kolonien gewachsen waren, fünf dieser Kolonien ausgewählt. Bei weniger als fünf charakteristischen Kolonien wurden alle Kolonien verwendet.

3.2.3.3.6.1 Subkultur

Jede der ausgewählten Kolonien wurde mit einer Impföse auf TSYEA-Agar (Rezeptur s. 10.1.2.13) ausgestrichen und 20-24 h bei 37°C bebrütet.

3.2.3.3.6.2 Bestätigungsreaktionen

3.2.3.3.6.2.1 Katalase-Test

Von dem beimpften TSYEA-Agar wurde eine typische Kolonie auf einen Objektträger übertragen und mit einem Tropfen Bactident® Katalase-Lösung überschichtet. *Listerien* reagieren Katalase-positiv.

3.2.3.3.6.2.2 CAMP-Test

Der verwendete *S. aureus* Teststamm wurde strichförmig quer über die Blutagar-Platte geimpft. Von dem beimpften TSYEA-Agar wurde dazu Koloniematerial im rechten Winkel so aufgeimpft, dass der Impfstrich knapp neben dem Staphylokokken-Impfstrich endete. Als Positiv-Kontrolle wurde ein bestätigter *L. monocytogenes* Stamm verwendet. Die Bebrütung erfolgte für 24 h bei 37°C. Ein positives Ergebnis lag bei einer vollständigen Haemolyse im Bereich der β -Haemolysezone des Staphylokokkenstammes vor.

3.2.3.3.6.2.3 Kohlenhydratspaltung

Von dem beimpften TSYEA wurde jeweils ein xylose- sowie ein rhamnosehaltiger Kohlenhydratnährboden beimpft und 7 Tage bei 37°C bebrütet. Als positiv wurde eine deutliche Gelbfärbung des Mediums bewertet.

Die Identifizierung der einzelnen Listerien Spezies erfolgte nach Tabelle Tabelle 8.

Listeria monocytogenes Kolonien wurden gezählt und nach Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor als KbE/Gramm Probenmaterial angegeben.

Tabelle 8: Identifizierungs-Reaktionen für *Listeria* spp. (nach BAUMGART 2007)

Spezies	Säurebildung		CAMP-Test (<i>S. aureus</i>)	Haemolyse
	Rhamnose	Xylose		
<i>L. monocytogenes</i>	+	-	+	+
<i>L. innocua</i>	v	-	-	-
<i>L. ivanovii</i>	-	+	-	+
<i>L. seligeri</i>	-	+	(+)	(+)
<i>L. welshimeri</i>	v	+	-	-
<i>L. grayi</i>	v	-	-	-

v = variabel

+ = positive Reaktion

(+) = schwache Reaktion

- = negative Reaktion

3.2.3.3.7 Sulfitreduzierende Anaerobier

Die Bestimmung der sulfitreduzierenden Anaerobier erfolgte gemäß dem Untersuchungsverfahren L 06.00 – 20 der amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB.

Es wurde je 1 ml des Probenansatzes auf einer Tryptose-Sulfit-Cycloserin-Agarplatte (TSC) (Rezeptur s. 10.1.2.17) ausgespatelt und nach dem Abtrocknen mit verflüssigtem Nährmedium überschichtet. Nach dem Trocknen wurden die Platten bei 37°C anaerob bebrütet. Nach 24 Stunden wurden die entsprechenden Kolonien ausgezählt und die sulfitreduzierenden Anaerobier pro Gramm Probenmaterial angegeben.

3.2.3.3.8 Enterokokken

Die Bestimmung der Enterokokken erfolgte gemäß dem Untersuchungsverfahren L 06.00 – 32, welches in der amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB aufgeführt ist.

Es wurde je eine CATC Selektivagarplatte (Rezeptur s. 10.1.2.14) in fünf Sektoren aufgeteilt und mit 0,05 ml des Probenansatzes und seiner Verdünnungsstufen tropfenweise beimpft. Nach dem Trocknen der Tropfen wurden die Platten bei 42°C aerob bebrütet. Nach 48 ± 4 Stunden wurden die entsprechenden Kolonien ausgezählt und nach Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor die Enterokokken pro Gramm Probenmaterial angegeben.

3.2.3.3.9 Enterobakteriaceen

Die Bestimmung der Enterobakteriaceen erfolgte gemäß dem Untersuchungsverfahren L 06.00 – 25 der amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB.

Es wurde je eine VRBD-Selektivagarplatte (Rezeptur s. 10.1.2.8) in fünf Sektoren aufgeteilt und mit 0,05 ml. des Probenansatzes und seiner Verdünnungsstufen tropfenweise beimpft. Nach dem Trocknen der Tropfen wurden die Platten bei 30°C anaerob bebrütet. Nach 48 Stunden wurden die entsprechenden Kolonien ausgezählt und nach Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor die Enterobakteriaceen pro Gramm Probenmaterial angegeben.

3.2.3.3.10 Coliforme Keime

Die Bestimmung der coliformen Keime erfolgte gemäß dem Untersuchungsverfahren L 01.00 – 3 der amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB.

Es wurde je eine VRB-Selektivagarplatte (Rezeptur s. 10.1.2.9) in fünf Sektoren aufgeteilt und mit 0,05 ml des Probenansatzes und seiner Verdünnungsstufen tropfenweise beimpft. Nach dem Trocknen der Tropfen wurden die Platten bei 30°C anaerob bebrütet. Nach 48 Stunden wurden die entsprechenden Kolonien ausgezählt und nach Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor die coliformen Keime pro Gramm Probenmaterial angegeben.

3.2.3.3.11 *Escherichia coli*

Wiederbelebungsverfahren

Die Bestimmung von *Escherichia coli* schließt ein Wiederbelebungsverfahren ein, welches unter L 06.00 – 36 der amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB aufgeführt ist.

3.2.3.3.11.1 Wiederbelebungsverfahren

Der mit einem Celluloseacetat-Membranfilter belegte Wiederbelebungs Nährboden (Glutaminat Agar) (Rezeptur s. 10.1.2.16) wurde mit 1 ml der Erstverdünnung beimpft und nachfolgend bei 37°C für 4 h bebrütet.

3.2.3.3.11.2 Bestimmung von *Escherichia coli*

Der vorbebrütete Membranfilter wurde auf Escherichia-coli-Direkt-Agar (ECD) (Rezeptur s. 10.1.2.15) übertragen und 16 bis 18 h bei 44°C bebrütet. Aus dem Anteil der blau-fluoreszierenden und durch den Indoltest bestätigten Kolonien ließ sich die Anzahl von *Escherichia coli* je Gramm Probenmaterial errechnen.

3.2.3.3.12 *Bacillus cereus*

Die Bestimmung präsumptiver *Bacillus cereus* erfolgte gemäß dem Untersuchungsverfahren L 00.00-25, welches in der amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB aufgeführt ist.

Es wurde je eine PEMBA -Selektivagarplatte (Rezeptur s. 10.1.2.18) in fünf Sektoren aufgeteilt und mit 0,05 ml des Probenansatzes und seiner Verdünnungsstufen tropfenweise beimpft. Nach dem Trocknen der Tropfen wurden die Platten bei 37°C aerob bebrütet, 24 Stunden später die entsprechenden Kolonien ausgezählt und nach Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor die präsumptiven *Bacillus cereus* pro Gramm Probenmaterial angegeben.

3.2.3.3.13 Hefen und Schimmelpilze

Die Bestimmung von Hefen und Schimmelpilzen erfolgte gemäß dem Untersuchungsverfahren L 01.00-37, welches in der amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB aufgeführt ist.

Es wurde je eine Bengalrot-Chloramphenicol-Selektivagarplatte (Rezeptur s. 10.1.2.7) in fünf Sektoren aufgeteilt und mit 0,05 ml des Probenansatzes und seiner Verdünnungsstufen tropfenweise beimpft. Nach dem Trocknen der Tropfen wurden die Platten bei 25°C aerob bebrütet. 72 Stunden danach wurden die entsprechenden Kolonien ausgezählt und nach Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor die Hefen und Schimmelpilze pro Gramm Probenmaterial angegeben.

3.2.3.3.14 Salmonellen

Die Identifizierung von Salmonellen erfolgte gemäß dem Untersuchungsverfahren L 00.00–20 der amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB.

Die Stomacherbeutel mit dem Probenansatz wurden unter aeroben Bedingungen 18-24 Stunden lang bei 37°C bebrütet. Aus der bebrüteten Anreicherungsbouillon wurden 0,1 ml entnommen, zu 10 ml Rappaport-Vassiliadis (RV)-Anreicherungslösung (Rezeptur s. 10.1.2.19) hinzugefügt, mit Hilfe eines Reagenzglasschüttlers kurz durchmischt und aerob bei 42°C bebrütet. Parallel dazu wurden 10 ml des vorangereicherten Probenansatzes in 100 ml Selenit-Cystein-Medium (Rezeptur s. 10.1.2.20) überführt, dieses kurz geschwenkt und aerob 18-24 bei 37°C bebrütet.

Nach 18-24 h wurden die angereicherten Probenansätze kurz durchmischt und mit einer sterilen Öse auf Xylose-Lysin-Desoxycholat (XLD)-Agar (Rezeptur s. 10.1.2.22) und modifiziertem Brilliantgrün-Phenolrot-Lactose (BPLS)-Agar (Rezeptur s. 10.1.2.21) ausgestrichen. Die so beimpften Platten wurden 24 Stunden bei 37°C aerob bebrütet. Nach der Inkubation wurden die Platten auf salmonellenverdächtige Kolonien untersucht. Präsumptive Kolonien wurden dann durch biochemische und serologische Untersuchungen identifiziert.

3.2.3.3.14.1 Biochemische Identifizierung

3.2.3.3.14.1.1 Oxidase Test

Von jeder der auf dem Selektivagar ausgewählten Kolonien wurde mit einer sterilen Platindrahtöse ein Teil der zu prüfenden Kolonie aufgenommen, auf die Reaktionszone des Teststäbchens aufgebracht und dort mit der Impföse verrieben. Nach 45 Sekunden wurde die Farbe der Reaktionszone mit der zu verwendenden Farbskala verglichen. Eine negative Reaktion liegt vor, wenn es zu keiner Verfärbung der Reaktionszone kommt.

3.2.3.3.14.2 Enterotube™ II ID-Testkit

Die oxidase-negativen Kolonien wurden mit einer sterilen Platindrahtöse auf Nähragar überimpft und aerob 18-24 Stunden bei 37°C bebrütet. Anschließend wurde ein Enterotube™ II ID-Testkit nach den Anweisungen des Herstellers beimpft und nachfolgend 20-24 Stunden bei 37°C bebrütet. Nach der Bebrütung und Auswertung (einschließlich Indol und Voges-Prosgauer-Test) ließ sich der Keim anhand der erhaltenen, fünfstelligen Schlüsselzahl durch Nachschlagen in den zugehörigen Tabellen (Tabellensammlung: „Computer-Codiertes Identifikations-System“) bestimmen.

3.2.3.3.14.3 Serologische Identifizierung

3.2.3.3.14.3.1 Ausschluss selbstagglutinierender Stämme

Ein Tropfen physiologische Kochsalzlösung wurde auf einen sauberen Objektträger aufgebracht. In diesen Tropfen wurde ein Teil der zu untersuchenden Kultur eingerieben, so dass eine trübe und homogene Suspension entstand. Der Objektträger wurde für 30-60 s vorsichtig kreisförmig bewegt; danach wurde die Reaktion gegen einen dunklen Hintergrund beobachtet. Stämme wurden als selbstagglutinierend angesehen, wenn die Bakterien zu mehr oder weniger deutlichen Einheiten zusammengeklumpt waren. Die serologische Identifizierung dieser selbstagglutinierenden Stämme mit den im Weiteren aufgeführten Verfahren ist nicht möglich.

3.2.3.3.14.3.2 Prüfung mit Salmonella-Antiserum I

Die serologische Identifizierung salmonellenverdächtiger, nicht selbstagglutinierender Kolonien erfolgte zunächst mit dem polyspezifischen Enteroclon Salmonella-Antiserum I (A-E), mit welchem mehr als 90 % aller Salmonella-Isolate im mitteleuropäischen Raum erfasst werden können. Die Untersuchung wurde wie unter 3.2.3.3.14.3.1 beschrieben durchgeführt, anstelle der physiologischen Kochsalzlösung wurde jedoch das Salmonella-Antiserum I verwendet.

3.2.3.3.14.3.3 Prüfung mit Salmonella Antiserum II

Bei einer negativen Reaktion mit Salmonella-Antiserum I erfolgte weiterhin eine Prüfung mit dem polyspezifischen Enteroclon Salmonella-Antiserum II (F-67). Die Untersuchung wurde wie unter 3.2.3.3.14.3.1 beschrieben durchgeführt, anstelle der physiologischen Kochsalzlösung kam jedoch das Salmonella-Antiserum II zur Anwendung.

3.2.3.3.14.4 Auswertung

3.2.3.3.14.4.1 Auswertungsschema

Die Auswertung der biochemischen und serologischen Untersuchung ist in Tabelle 9 dargestellt.

Tabelle 9: Auswertungsschema für die Untersuchung auf Salmonellen

	Biochemische Reaktion	Selbstagglutination	Serologische Reaktion	Interpretation
A	typisch	nein	Antiserum I oder II-positiv	Stämme sind wahrscheinlich Salmonellen
B	typisch	nein	alle Reaktionen negativ	es kann sich um Salmonellen handeln
C	typisch	ja	nicht getestet	
D	nicht typisch	nein	Antiserum I oder II-positiv	
E	nicht typisch	nein	alle Reaktionen negativ	Stämme werden nicht als Salmonellen angesehen

3.2.3.3.14.4.2 Endgültiger Nachweis

Stämme nach Buchstabe A (Tabelle 9) wurden als Salmonellen angesehen. Bei Stämmen nach Buchstabe B bis D konnte es sich um Salmonellen handeln. Alle isolierten Stämme nach Buchstabe A bis D wurden zur endgültigen Identifizierung an das Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) gesandt. Dabei wurden die vom BfR geforderten Voraussetzungen für die Art und Weise der Einsendung zu identifizierender Keime eingehalten. Stämme nach Buchstabe E wurden nicht als Salmonellen angesehen.

4 Ergebnisse

4.1 Bakterieller Kontaminationsstatus der untersuchten Proben⁶

4.1.1 Aerobe Gesamtkeimzahl

Die Bestimmung der aeroben Gesamtkeimzahl (GKZ) ergab Belastungen für die untersuchten Austernproben von $<10^2$ bis $3,0 \times 10^6$ KBE pro Gramm. Hierbei wiesen die meisten Proben (22 von 38) Kontaminationen im Bereich von 10^2 KbE/g Untersuchungsmaterial auf, wie Abbildung 28 ausweist.

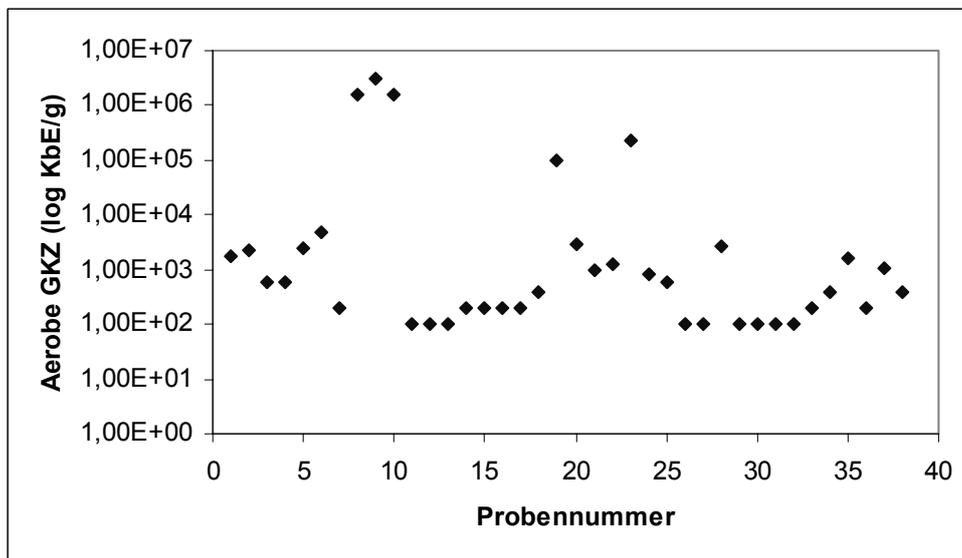


Abbildung 28: Aerobe Gesamtkeimzahl der untersuchten Austernproben

Lediglich in fünf Proben wurde eine Belastung von mehr als $1,0 \times 10^5$ KbE/g ermittelt (s. Tabelle 10). Hierbei stammten je zwei Proben aus Deutschland und Frankreich und eine Probe aus Irland. Die höchsten Werte erreichte die Probe aus Irland ($3,0 \times 10^6$ KbE/g). Die drei am höchsten belasteten Austernproben entfielen auf den dritten Untersuchungsmonat (Juli 2005). Tabelle 10 enthält die entsprechenden Ergebnisse.

⁶ Alle Ergebnisse für die mikrobiologische Untersuchung finden sich in Tabelle 20

Tabelle 10: Proben mit aeroben Gesamtkeimzahlen über 10^5 KbE pro Gramm Probenmaterial

Probennummer	Ursprungsgebiet	Verpackungsdatum	GKZ
8	Frankreich, L'Houmeau	18.07.2005	$1,6 \times 10^6$
9	Irland, Donegal	15.07.2005	$3,0 \times 10^6$
10	Deutschland, Sylt	15.07.2005	$1,6 \times 10^6$
19	Deutschland, Sylt	25.11.2005	$1,0 \times 10^5$
23	Frankreich, Oléron	30.12.2005	$2,2 \times 10^5$

4.1.2 Aerob wachsende Milchsäurebakterien

Die Belastung der untersuchten Proben mit aerob wachsenden Milchsäurebakterien lag bei 31 Proben unter 10^2 KbE pro Gramm Probenmaterial. Vier Austern wiesen Werte von weniger als 10^3 KbE/g auf, weitere drei Proben Werte im Bereich von 10^3 KbE/g auf.

4.1.3 Laktobazillen

Die Belastung der untersuchten Proben mit Laktobazillen lag in 30 Fällen unter 10^2 KbE pro Gramm Probenmaterial. Vier Austern wiesen Werte von weniger als 10^3 KbE/g auf, weitere vier Proben bewegten sich im Bereich von 10^3 KbE/g.

4.1.4 Enterobakteriazeen

Die Gehalte an Enterobakteriazeen wurden nach den Richt- und Warnwerten der DGHM für Seefische beurteilt. Es muss hier allerdings angemerkt werden, dass Seefische, im Gegensatz zu Austern, nicht zum Rohverzehr vorgesehen sind. Bei der Untersuchung der Proben traten bei der überwiegenden Zahl keine auffälligen Befunde bzw. Normabweichungen auf. Die Richtwerte für Enterobakteriazeen (10^4 KbE/g) wurden von einer Probe überschritten und von fünf Proben nur knapp unterschritten (s. Tabelle 11). Es ist anzumerken, dass die drei am höchsten belasteten Proben alle aus dem dritten Untersuchungsmonat (Juli 2005) stammten.

Tabelle 11: Proben, die die Richt- bzw. Warnwerte der DGHM für Enterobakteriaceen überschritten oder knapp unterschritten

Probennummer	Ursprungsgebiet	Verpackungsdatum	Enterobakteriaceen
8	Frankreich, L'Houmeau	18.07.2005	$3,6 \times 10^4$
9	Irland, Donegal	15.07.2005	$6,0 \times 10^3$
10	Deutschland, Sylt	15.07.2005	$5,4 \times 10^3$
19	Deutschland, Sylt	25.11.2005	$1,6 \times 10^3$
23	Frankreich, Oléron	30.12.2005	$3,5 \times 10^3$

4.1.5 Pseudomonaden

Auch die Gehalte an Pseudomonaden wurden, mit den gleichen Einschränkungen wie unter 4.1.4 angeführt, nach den Richt- und Warnwerten der DGHM für Seefische beurteilt. Bei der Untersuchung waren auch hier bei der überwiegenden Zahl der Proben keine auffälligen Befunde bzw. Normabweichungen zu erheben. Die Richtwerte für Pseudomonaden (10^6 KbE/g) wurden von drei Proben nur knapp unterschritten. Wie Tabelle 12 zeigt, stammten auch hier alle drei Proben aus dem dritten Untersuchungsmonat (Juli 2007).

Tabelle 12: Proben, die die Richt- bzw. Warnwerte der DGHM für Pseudomonaden überschreiten oder knapp unterschreiten

Probennummer	Ursprungsgebiet	Verpackungsdatum	Pseudomonaden
8	Frankreich, L'Houmeau	18.07.2005	$2,6 \times 10^5$
9	Irland, Donegal	15.07.2005	$2,5 \times 10^5$
10	Deutschland, Sylt	15.07.2005	$2,9 \times 10^5$

4.1.6 Aeromonaden

Die Belastung der untersuchten Proben mit Aeromonaden lag bei 35 Proben unter 10^2 KbE pro Gramm Probenmaterial. Drei Proben wiesen Werte im Bereich von 10^5 KbE/g auf. Dabei handelte es sich um die in Tabelle 12 aufgeführten Proben, welche ebenfalls grenzwertige Gehalte an Pseudomonaden aufwiesen.

4.1.7 *Clostridium perfringens*

Die Belastung der untersuchten Proben mit *Clostridium perfringens* lag stets unter 10 KbE pro Gramm Probenmaterial.

4.1.8 Koagulase positive Staphylokokken

Bei allen Proben lag die Belastung mit Koagulase positiven Staphylokokken bei weniger als 10^2 KbE pro Gramm Probenmaterial.

4.1.9 Enterokokken

Die Kontamination der untersuchten Proben mit Enterokokken überschritt nie die Nachweisgrenze von 10^2 KbE pro Gramm Probenmaterial.

4.1.10 Coliforme Keime

Die Belastung der untersuchten Proben mit Coliformen Keimen lag bei 31 Proben unter 10^2 KbE pro Gramm Probenmaterial. Sieben Proben wiesen Werte von weniger als 10^3 KbE/g auf.

4.1.11 *Bacillus cereus*

Bei einer Nachweisgrenze von 10^2 KbE pro Gramm Probenmaterial konnte aus keiner der untersuchten Proben mit *Bacillus cereus* isoliert werden.

4.1.12 Hefen

Die Zahl der Hefen blieb immer unterhalb der Nachweisgrenze von 10^2 KbE/g Probenmaterial.

4.1.13 Schimmelpilze

Die Belastung der untersuchten Proben mit Schimmelpilzen lag bei 30 Proben unter 10^2 KbE pro Gramm Probenmaterial. Vier Proben wiesen Werte von weniger als 10^3 KbE/g auf, weitere vier Proben erreichten Werte im Bereich von 10^3 KbE/g.

4.1.14 Belastung der Proben mit *Escherichia coli*

Alle untersuchten Proben lagen unterhalb der Nachweisgrenze von 10 KbE pro Gramm Probenmaterial.

4.1.15 *Salmonella* spp.

Salmonella spp. konnten aus keiner der untersuchten Proben isoliert werden.

4.1.16 *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes war in keiner der untersuchten Proben nachzuweisen.

4.2 Viraler Kontaminationsstatus der untersuchten Proben⁷

4.2.1 Nachweis von Norovirus-RNA

In keiner der untersuchten Proben konnte Norovirus-RNA nachgewiesen werden

4.2.2 Nachweis von Hepatitis A-Virus-RNA

In keiner der untersuchten Proben konnte Hepatitis A-Virus-RNA nachgewiesen werden.

⁷ Alle Ergebnisse für die molekularbiologischen Untersuchungen finden sich in Tabelle 21

5 Diskussion

5.1 Mikrobielle Belastung der untersuchten Proben

Die Belastung von Schalentieren mit Bakterien kann Auskunft über den Frischegrad und damit verbunden den Genusswert der untersuchten Proben liefern. Gramnegative, psychrotrophe Bakterien wie *Pseudomonas* spp., *Aeromonas* spp. und *Shewanella* spp. führen zum Verderb gekühlter, eiweißreicher Lebensmittel (BAUMGART 2007). Gleichzeitig besitzen diese Keime als opportunistische Krankheitserreger eine große Bedeutung, da sie bei immunologisch supprimierten Menschen zu Wundinfektionen, Infektionen der Atemwege, Harnwegsinfekten und Meningitiden führen können (s. 2.1.4).

Auf der anderen Seite können Bakterien als Indikatoren einer fäkalen Kontamination dienen. Sie bilden somit eine Grundlage zur Überwachung des Biotops bei Seafood aus Aquakulturen (s. 5.2).

5.1.1 Verderbserreger

5.1.1.1 *Pseudomonas* spp.

Dieser Keim macht den größten Teil der Primärflora von Fischen aus und bildet auch beim proteolytischen bzw. lipolytischen Verderb von kühlgelagerten See- und Süßwasserfischen die Hauptverderbnisflora. Ein erhöhter bzw. grenzwertig erhöhter Gehalt im Bezug auf die Richtwerten der DGHM für Pseudomonaden in frischen und gefrorenen Seefischen ist somit als beginnender Verderb der Proben zu bewerten.

Bei der Untersuchung der Proben waren bei der überwiegenden Zahl keine auffälligen Befunde bzw. Normabweichungen zu erheben. Andererseits wurden die Richtwerte der DGHM für Pseudomonaden in frischen und gefrorenen Seefischen (10^6 KbE/g) von drei Proben nur knapp unterschritten (s. Tabelle 12). Es muss hier allerdings angemerkt werden, dass Seefische, im Gegensatz zu Austern, nicht zum Rohverzehr vorgesehen sind.

5.1.1.2 *Aeromonas* spp.

Beim Fischverderb bilden Aeromonaden häufig einen Teil der Verderbsflora. So zeigte sich, dass Aeromonaden beim Verderb von Süßwasserfischen, welche bei höheren Temperaturen gelagert wurden, eine Rolle spielen (GORCZYCA et al. 1985). Ein erhöh-

ter bzw. grenzwertig erhöhter Gehalt an Aeromonaden ist somit ebenfalls als beginnender Verderb der Proben zu bewerten (s. 5.1.1.1).

Die Belastung der untersuchten Proben mit Aeromonaden lag bei 35 Proben unter 10^2 KbE pro Gramm Probenmaterial. Drei Proben wiesen Werte im Bereich von 10^5 KbE/g auf. Dabei handelte es sich um die Proben, welche ebenfalls grenzwertige Gehalte an Pseudomonaden aufwiesen (s. 5.1.1.1).

5.1.1.3 Enterobakteriäzen

Die Gehalte an Enterobakteriäzen wurden ebenfalls nach den Richt- und Warnwerten der DGHM für Seefische beurteilt. Es gelten die gleichen Einschränkungen wie unter 5.1.1.1. Bei der Untersuchung der Proben waren bei der überwiegenden Zahl keine auffälligen Befunde bzw. Normabweichungen zu ermitteln. Die Richtwerte für Enterobakteriäzen (10^4 KbE/g) wurden von einer Probe überschritten und von fünf Proben nur knapp unterschritten (s. Tabelle 11).

Neben ihrer Bedeutung bei der Überwachung des Biotops (s. 5.2.1.3) nehmen *Enterobacteriaceae* Einfluss auf den Verderb von Fischen und Fischerzeugnissen. Es kann bei der Verarbeitung dieser Produkte zu Kreuzkontamination zwischen Haut und Darm sowie dem Filet kommen oder eine Kontamination durch das Personal erfolgen.

Eine solche Kreuzkontamination zwischen der Schale und dem Probenmaterial ist auch bei Austern denkbar. Auf der anderen Seite kann die Kontamination bereits während der Aufzucht der Tiere stattgefunden haben und würde in diesem Fall auf eine mögliche Belastung des Biotops mit Enterobakteriäzen hinweisen.

5.2 Nachweis von Indikatorkeimen

Der unmittelbare Nachweis infektiöser Viruspartikel in Lebensmitteln oder Trinkwasser, noch bevor diese zum Verbraucher gelangen, ist zunächst der nächstliegende Weg diese Erreger zu erfassen und ihre Verbreitung zu unterbinden. In der Praxis stellt sich dieser direkte Virusnachweis jedoch oftmals als sehr schwierig dar: einige Viren, wie z.B. Noroviren, lassen sich nicht oder nur sehr schlecht in Zellkulturen vermehren. Moderne molekular diagnostische Methoden wie PCR und Real-Time PCR sind nunmehr in der Lage, virales Genom im Lebensmittel zu detektieren. Wegen der sehr unterschiedlichen Lebensmittelmatrices können jedoch die oftmals in der Humanmedizin etablierten Testsysteme nicht ohne weiteres in diesen Bereich übertragen werden und sind zudem an einen hohen finanziellen Aufwand und entsprechende Laborausstattung gebunden. Weiterhin sagt der Nachweis von viralem Genom mittels der PCR nichts über die Anwesenheit infektiöser Viruspartikel aus. GASSILLOUD et al. berichteten 2003,

dass sich in Mineralwasser das virale Genom sehr viel länger nachweisen lässt, als der infektiöse Viruspartikel. Aufgrund dieser Schwierigkeiten wurden Versuche unternommen, einen geeigneten Indikatorkeim zu finden, der eine virale Kontamination anzeigt, wenn er im Lebensmittel vorliegt.

5.2.1 Bakterien als Indikatorkeime

5.2.1.1 Aerobe Gesamtkeimzahl

Die aerobe Gesamtkeimzahl in frisch gewonnenen Meeresfrüchten liegt im Durchschnitt zwischen 10^2 und 10^5 KbE pro Gramm (ICMSF 1986). Die Daten der vorliegenden Austernproben zeigten Belastungen von $<10^2$ bis $3,0 \times 10^6$ KBE pro Gramm. Hierbei wiesen die meisten Proben (22 von 39) Kontaminationen im Bereich von 10^2 KbE/g Untersuchungsmaterial auf. Lediglich in drei Proben wurden Werte von mehr als $1,0 \times 10^6$ KbE/g ermittelt (s. Tabelle 10).

Diese Resultate entsprechen denen anderer Erhebungen: WRIGHT et al. (1996) beobachteten in Austern Keimzahlen zwischen $8,5 \times 10^2$ und $4,6 \times 10^5$ KbE/g. ARIAS et al. (1999) ermittelten Keimzahlen in Muscheln, die zwischen $3,0 \times 10^5$ und $1,9 \times 10^7$ KbE/g lagen. Die letztgenannten, hohen Keimzahlen wurden bei dieser Untersuchung parallel zu einer ungewöhnlichen Belastung mit Fäkalcoliformen beobachtet.

Im vorliegenden Fall konnten bei den drei Proben, welche eine aerobe, mesophile Gesamtkeimzahl von $>10^6$ KbE/g aufwiesen, ebenfalls erhöhte Gehalte an Enterobacteriaceen ($>10^4$ KbE/g), Pseudomonaden ($>10^5$ KbE/g) und Aeromonaden festgestellt werden.

5.2.1.2 *Clostridium perfringens*

Die Belastung der untersuchten Proben mit *Clostridium perfringens* lag bei weniger als 10 KbE pro Gramm Probenmaterial. Die in der Literatur häufig beschriebenen, hohen Kontaminationsgrade von Fisch, Meeresfrüchten und insbesondere auch von Muscheln mit diesem Keim (WEN und MCCLANE 2004, INAL et al. 1973) konnten hier nicht bestätigt werden. Ein Grund hierfür ist sicherlich in den verschiedenen Kulturverfahren für Miesmuscheln und Austern zu suchen. Miesmuscheln werden oftmals in so genannten Bodenkulturen gefarmt, was bedeutet, dass die Saatmuscheln direkt auf einem geeigneten Untergrund ausgebracht werden, wo sie sich dann anheften und bis zur Ernte wachsen. Gerade diese Kulturform könnte verantwortlich für eine erhöhte Belastung mit *C. perfringens* sein. *C. perfringens*, der als Keim ubiquitär vorkommt und am häufigsten im Boden zu finden ist (10^3 bis 10^4 KbE/g), wurde in geringeren Konzentrationen auch in marinen Sedimenten nachgewiesen, wobei hier von einer Verunreinigung

ausgegangen werden kann (LABBE 1989). Der direkte Kontakt mit diesen kontaminierten Sedimentschichten könnte in Verbindung mit der hohen Filtrationsrate von Muscheln und entsprechenden Strömungsverhältnissen zu einer erhöhten Belastung mit *C. perfringens* führen. Im Gegensatz zu der beschriebenen Kulturmethode für Miesmuscheln werden Saataustern, welche auf entsprechend präparierte Dachziegel verbracht wurden, in einer Art „Regal“ aufgereiht. Wenn die Austern eine gewisse Größe erreicht haben, werden sie in Säcke aus einem Netzmaterial verbracht und wachsen dort bis zur Marktreife heran (MATTHIESSEN 2001). Die Austern haben in der gesamten Zuchtperiode keinen direkten Kontakt mit dem Boden, was, neben anderen Faktoren, die geringe Belastung mit *C. perfringens* erklären könnte.

5.2.1.3 *Escherichia coli*

Als Indikator für die Fäkalkontamination der untersuchten Austern wurde entsprechend der Empfehlung des Scientific Committee on Veterinary Measures relating to Public Health (2002) *E. coli* als Parameter gewählt. Es muss an dieser Stelle angemerkt werden, dass die Untersuchung nicht mittels des empfohlenen MPN-Verfahrens, sondern mithilfe der fluoreszenzoptischen Technik zur Bestimmung von *E. coli* durchgeführt wurde. Die Nachweisgrenze dieser Methode liegt bei 10 KbE pro Gramm. Alle hier untersuchten Proben erbrachten Kontaminationen unterhalb dieser Nachweisgrenze.

Wie auch schon unter 2.1.11 aufgeführt, wird *E. coli* standardmäßig als Indikatorkeim für verschiedene Viren genutzt, da ersterer meist in sehr viel höheren Konzentrationen auftritt als die anzuzeigenden Viren und zudem normalerweise nicht humanpathogen ist. Die erwünschte Korrelation zwischen diesem Keim und den Viren, die er anzeigen soll, besteht jedoch in vielen Fällen nicht (LODDER-VERSCHOOR et al. 2005, LEES 2000, CHRISTENSEN et al. 1998). Der Nutzen von *E. coli* als Markerorganismus in tropischen und subtropischen Gebieten ist heute wegen der Vermehrungsfähigkeit des Keims in kontaminierten Abwässern ohnehin stark umstritten (DESMARIS et al. 2002, SOLOGABRIELE et al. 2000). HAZEN und TORNAZOS konnten 1990 *E. coli* sogar in einigen nicht fäkal kontaminierten Gewässern in tropischen Gebieten nachweisen. Es ist somit zu überlegen, ob es nicht andere, besser geeignete Bakterien gibt, die eine fäkale Kontamination - gerade in marinen Habitaten - anzeigen.

5.3 Art und Herkunft des Probenmaterials

Alle untersuchten Proben Pazifischer Felsenaustern stammen aus kommerziell genutzten Austernzuchtgebieten innerhalb Europas. Diese Regionen werden nach der seit dem 01. Januar 2006 geltenden Richtlinie Nr. 2004/41/EG des Rates in drei Kategorien (A, B oder C) eingeteilt. Die Klassifikation richtet sich dabei nach der Anzahl von *E. coli*

in 100 g Muschelfleisch und Schalenflüssigkeit. Lebende Muscheln, die zum unmittelbaren Verzehr bestimmt sind, dürfen nicht mehr als 230 *E. coli* je 100 g Muschelfleisch und Schalenflüssigkeit enthalten. Weisen 90 % der untersuchten Muscheln max. 4.600 *E. coli* je 100 g Muschelfleisch auf (Klasse B), so dürfen die Tiere erst nach Aufbereitung in einem Reinigungszentrum oder nach Umsetzen in andere Gewässer in den Verkehr gebracht werden. Nach der Reinigung oder dem Umsetzen müssen dann alle Anforderungen an Muscheln der Kategorie A erfüllt sein. Weisen die Muscheln mehr als 46.000 *E. coli* pro 100 g Muschelfleisch auf (Klasse C), so dürfen sie erst nach Umsetzen über einen langen Zeitraum (mindestens zwei Monate), eventuell in Verbindung mit einer weitergehenden Reinigung in einem Reinigungszentrum, geerntet und in den Verkehr gebracht werden. Da in der vorliegenden Untersuchung die Auswahl der Austern stichprobenartig durch den Importeur erfolgte, sind Muscheln einiger Herkunftsländer nur in sehr geringem Umfang in der Erhebungsmenge enthalten.

Es wäre insofern sinnvoll gewesen, sich auf bestimmte Herkunftsländer zu beschränken, um anhand einer größeren Stichprobenzahl eine genauere Aussage treffen zu können.

Über den Zusammenhang zwischen fäkalen Verunreinigungen der Muscheln und dem Ausbruch viral bedingter Gastroenteritiden beim Menschen nach Verzehr derselben ist bereits häufig berichtet worden (LEES 2000, CHRISTENSEN et al. 1998, PERRET et al. 1995, HELLER et al. 1986).

Die bakteriologische Untersuchung der Austern zeigte, dass in keiner der Proben erhöhte Gehalte an Fäkalcoliformen oder *E. coli* vorlagen. Die Nachweisgrenze für *E. coli* lag bei dem hierfür gewählten Verfahren mit 10 KbE/g Probenmaterial zwar über der für Gebiete der Klasse A geforderten Höchstmenge, Muscheln mit höheren Kontaminationsgraden können erfahrungsgemäß mit der Methode jedoch sicher identifiziert werden. Alle untersuchten Proben wiesen Gehalte an *E. coli* von $<10^1$ KBE/g auf. Diese Werte korrelieren deutlich mit den negativen Ergebnissen der Untersuchung auf Noroviren und Hepatitis A. Dass diese Korrelation nicht immer gegeben ist, zeigen die Studien von LODDER-VERSCHOOR et al. (2005), LEES (2000) und CHRISTENSEN et al. (1998). Hier fanden sich humanpathogene Viren in Proben, die den Klasse A Standards entsprachen. Für diesen Befund kann es unterschiedliche Gründe geben: zum einen werden Muscheln, die aus fäkal kontaminierten Zuchtgebieten der Klasse B stammen, zur Selbstreinigung in unbelastete Gewässer überführt oder in Reinigungszentren behandelt. Dadurch wird die Belastung mit Fäkalcoliformen und *E. coli* deutlich verringert, was vor allem durch einen „Spüleffekt“ zu begründen ist. Gerade Austern der Gattung *Crassostrea* haben - abhängig von der Wassertemperatur und anderen Umweltfaktoren - mit 200 bis 1680 ml pro Stunde, eine enorm hohe Filtrationsrate. Im

Vergleich hierzu liegt der Wasserdurchfluss der Europäischen Auster *Ostrea edulis* bei 100-700 ml pro Stunde (MATHERS 1974). Die hohen Filtrationsraten der Pazifischen Felsenaustern bedingen jedoch gleichzeitig eine erhöhte Wahrscheinlichkeit, pathogene Viren aus dem Umgebungswasser herauszufiltern und zu akkumulieren (LODDER-VERSCHOOR et al. 2005). Durch die ausgeprägte Umweltstabilität und die niedrige infektiöse Dosis der hier untersuchten Viren kann es somit trotz einer niedrigen Belastung mit den als Indikatorkeimen genutzten *E. coli* zu viral bedingten humanen Infektionen und Erkrankungen kommen.

Auf der anderen Seite ist die Überlebensfähigkeit der meisten humanpathogenen Viren bei höheren Temperaturen stark eingeschränkt. So überleben die meisten Viren Temperaturen von 20°C nur für Stunden. Gerade im Sommer wäre eine Reduktion der Virenlast in den Austern im warmen Wasser also durchaus denkbar.

5.4 Materialien und Methoden

Bei der Diskussion der Resultate unter methodologischen Aspekten soll zunächst festgehalten werden, dass sich die Aufbereitung der Probenmatrix unproblematisch gestaltet. Die Austern wurden bei der Aufbereitung, abhängig von ihrer Größe, entweder *in toto* zerkleinert oder es wurde der Verdauungstrakt der Muschel, in welchem das Tier eventuell vorhandenes Virusmaterial akkumulieren würde, präpariert und anschließend wie unter 3.2.2.2 beschrieben weiterverarbeitet. Trotz einer optimalen Durchführung dieses Aufbereitungsvorgangs kann ein geringer Verlust von Virus RNA nicht vollständig ausgeschlossen werden. Dieser resultiert vor allem aus einem unvollständigen Aufschluss der Zellwände während der Zerkleinerung und Homogenisierung des Probenmaterials. Weiterhin kann es bereits durch Verzögerungen während des Probenverkehrs zu Verlusten kommen. Vor allem bei suboptimalen Transportbedingungen kann es rasch zu einem Abbau der viralen RNA kommen. Gleiches gilt für Verzögerungen bei der Durchführung der Probenaufbereitung. Diese Verluste wiegen umso schwerer, da im Regelfall von einer sehr geringen Kontaminationsdosis der Muscheln ausgegangen werden muss (MÄDE 2005). Auch ein zu starkes Walken während der Aufbereitung kann sich als problematisch erweisen. Bei einer hohen mechanischen Belastung werden die Probenbestandteile weiter zerstört und die dabei austretende Flüssigkeit kann die sich anschließenden Konzentrationsschritte behindern. Das hier durchgeführte mehrfache manuelle Walken (s. 3.2.2.2 u. Abbildung 24) ist somit der mechanischen Variante vorzuziehen.

Für die RNA-Extraktion wurde ein kommerziell erhältliches Kit benutzt. So konnten laborspezifische Einflussfaktoren weitgehend ausgeschlossen werden.

Entsprechend dem Anforderungskatalog des Sektorkomitees Lebensmittelanalytik zur Qualitätslenkung in der molekularbiologischen Diagnostik (2006) wurden als qualitätssichernde Maßnahmen bei allen PCR-Untersuchungen (RealTime- und konventionelle RT-PCR) Präparationspositiv- und negativkontrollen mitgeführt. Die als Positivkontrolle dienenden humanen Stuhlproben der Genogruppen I und II wurden in PBS-Pufferlösung seriell verdünnt und in einer Verdünnung von 10^{-2} der RNA-Extraktion und anschließenden RT-PCR unterzogen. Hierzu wurden 140 μ l der verdünnten Probe verwendet. Als Negativkontrolle diente Wasser. Die in der konventionellen RT-PCR durchgeführte externe Amplifikationskontrolle mit der RNA des Phagen MS2 zeigte eine Hemmung der Reaktionen zuverlässig an (s. 2.1.9.1). Einschränkend muss allerdings erwähnt werden, dass bei einer suboptimalen Zusammensetzung des Reaktionsgemisches keine vollständige Inhibition auftritt. Die Inhibitionskontrolle reagiert in diesem Fall positiv, die Reaktion läuft jedoch mit geringerer PCR Effizienz ab, was sich in einer verminderten Sensitivität widerspiegelt. Diese verminderte Sensitivität könnte dazu führen, dass das System die hier erwarteten geringen Kontaminationsdosen der Austern nicht erfassen konnte. Falsch negative Ergebnisse lassen sich deshalb nicht vollkommen ausschließen.

Nach Ergebnissen von MÄDE et al. (2006) sowie von VINJE et al. (2003) und BEURET et al. (2002) zeigte sich der konventionelle Nachweis von Noroviren mit dem MON-Primersystem als ausreichend sensitiv. Die Nachweisgrenze liegt laut den Untersuchungen von MÄDE et al. (2006) bei 20 PCR-U, was bei einer Infektionsdosis von 10-100 infektiösen Viruspartikeln (BREESE et al. 2002, KRUSE et al. 2002) als ausreichend gelten darf. Beim Nachweis von Noroviren der Genogruppe II erbringt auch das Real-Time System eine befriedigende Sensitivität, welche derjenigen einer konventionellen RT-PCR entspricht (MÄDE 2005). Einschränkend muss allerdings erwähnt werden, dass nicht alle in Deutschland auftretenden Genotypen durch das System erfasst werden (MÄDE et al. 2006). Noroviren der Genogruppe I ließen sich mit der hier verwendeten Primer-Sonden Kombination nicht nachweisen. Die Empfindlichkeit dieser Methode ist somit nicht ausreichend um Lebensmittel und Tupferproben mit einer hinreichenden Sensitivität auf Noroviren zu untersuchen (MÄDE 2005). Dies liegt wohl auch an den - im Vergleich zum GG II System - erheblich schwächeren Fluoreszenzsignalen. Aus diesem Grund müssen die Primer-Sonden Systeme für die Real Time PCR noch weiter entwickelt werden, um in Zukunft auch die Real Time PCR in der Routinediagnostik einsetzen zu können. Dies gilt insbesondere für die Noroviren der Genogruppe I, auch wenn sie von wesentlich geringerer epidemiologischer Bedeutung sind als die der Genogruppe II.

Für die Untersuchung auf HAV wurde komplett auf ein kommerziell erhältliches Testkit zurückgegriffen, um laborspezifische Einflussfaktoren weitestgehend auszuschließen. Bei der Aufbereitung der Proben und der RNA-Extraktion gelten jedoch die gleichen Einschränkungen, wie oben beschrieben. Neben der Verwendung der dem Kit in vier unterschiedlichen Verdünnungen beigefügten Positivkontrollen wurde auch hier als Negativkontrolle Wasser verwendet. Das System enthielt ein zusätzliches heterologes Amplifikationssystem, wodurch eine mögliche Inhibition der Reaktion (s. 2.1.9.1) erkannt werden konnte.

Die analytische Nachweisgrenze des verwendeten HAV PCR Kits wurde unter Verwendung des LightCycler[®] Instruments mit dem vorläufigen internationalen HAV-Standard bestimmt. Dieser wurde einer RNA-Aufreinigung mit dem QIAmp[®] Viral RNA Mini Kit der Fa. Qiagen unterzogen. Von dem extrahierten Standard wurde eine Verdünnungsreihe von 1 bis nominal 0,000316 IU/ μ l erstellt und mit dem Testkit analysiert. Die Untersuchungen wurden an drei verschiedenen Tagen in Form von Achtfach-Bestimmungen durchgeführt. Die analytische Nachweisgrenze des artus[®] HAV LC RT-PCR Kits liegt danach bei 56 IU/ml ($p=0,05$) unter Berücksichtigung des oben genannten Aufreinigungsverfahrens. Somit können 56 IU/ml mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% detektiert werden.

6 Schlussfolgerungen

6.1 Belastung der Austern mit Noro- und Hepatitis A-Viren

Im Hinblick auf die Virus-Prävalenz zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Studie, dass sich die überprüften Proben, die zeitlich unabhängig von Norovirusausbrüchen in Deutschland und den drei Importländern gesammelt worden waren, frei von Noroviren erwiesen. Gleiches galt für die Untersuchung auf Hepatitis A-Viren. Für die Interpretation der Resultate ist dabei zu beachten, dass alle Muscheln direkt vom Importeur bzw. Großhändler stammten. Proben bei Abgabe an den Endverbraucher wurden nicht untersucht. Dieser Umstand ist insofern von Bedeutung, als die Rekontamination durch Verkaufs- und Küchenpersonal, neben der Verunreinigung durch unbelebte Vektoren wie Bedarfsgegenstände, die größte Rolle bei der Übertragung von Virusmaterial spielt. Aufbauend auf dieser Arbeit wäre somit die Untersuchung von Proben, welche direkt aus dem Einzelhandel stammen, aussagekräftiger.

Weiterhin muss angemerkt werden, dass die Proben im Rahmen der betriebsinternen Qualitätsstandards des Großhändlers einer ersten Kontrolle im Ursprungsgebiet unterzogen und erst dann in die Hauptniederlassung überführt werden. Auch die Kontrollen von Transport- und Lagertemperatur unterliegen den Maßgaben dieser internen Qualitätssicherung. Dementsprechend weisen nahezu alle untersuchten Proben eine sehr niedrige mikrobiologische Belastung auf. Dies gilt sowohl für die Indikatorbakterien als auch für die Verderbserreger. Die gleichzeitige Abwesenheit von Noro- und Hepatitis A-Viren spiegelt somit die in der Literatur häufig beschriebene Korrelation von mikrobieller Belastung und der Anwesenheit von humanpathogenen enteralen Viren wieder (LEES 2000, CHRISTENSEN et al. 1998, PERRET et al. 1995, HELLER et al. 1986). Wegen der geringen Prävalenz der Noroviren und Hepatitis A-Viren bei Anlieferung der Ware scheint diese Stelle in der Kette von der Austernbank zur Oysterbar für ein Gefahrenmonitoring wenig geeignet zu sein. Hier bieten eine Überwachung des Biotops einerseits sowie des Einzelhandels andererseits wahrscheinlich größere Sicherheit bei der Beherrschung des Risikos. In einigen anderen Erhebungen an Austern konnten durchaus Noro- und Hepatitis A-Viren nachgewiesen werden. So fanden BOXMAN et al. (2006) in 4,8 % der untersuchten Austernproben aus niederländischer Aquakultur Noroviren. Weiterhin konnten die Untersucher in einer von acht importierten Proben Noroviren ermitteln (12,5 %). Die Probe stammte aus Irland. Es ist anzumerken, dass die Detektion der Viren, die dem Genotyp GII/4 angehörten, mit dem Primersystem nach

HÄFLINGER et al. (1997) durchgeführt wurde. Dieses System wurde für die Untersuchung von Noroviren aus Muscheln optimiert. Der Nachteil hierbei ist jedoch, dass die PCR Produkte dieses Assays nicht mit denen übereinstimmen, die für die Norovirusdiagnostik im humanen Bereich eingesetzt werden. Dadurch gestaltet sich die Aufklärung epidemiologischer Zusammenhänge als sehr schwierig. Das System wurde aus diesem Grund nicht in der vorliegenden Arbeit genutzt.

CROCI et al. (2007) konnten bei einer Biotopuntersuchung in der Adria eine vergleichsweise hohe Belastung der Proben mit Noroviren und HAV feststellen. So enthielten 12 % der Proben mit weniger als 230 *E. coli*/100 g Noroviren. In 5 % konnte HAV nachgewiesen werden. 2 % der Proben enthielten sowohl Noro- als auch Hepatitis A-Viren. Noch stärker ist die Belastung bei Proben, die mehr als 230 *E. coli*/100 g aufwiesen. Hier konnten in 29 % der Proben Noroviren und in 12 % der Proben HAV detektiert werden. Die Wasserqualität der Adria als ein halb umschlossener Teil des Mittelmeeres ist stark durch den Zustrom des Po beeinflusst. Mit einer Durchflussmenge von $1585 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ stammt aus ihm rund 5 % der Frischwasserzufuhr. Die Po-Ebene ist sehr dicht besiedelt und das Wasser dieses Flusses dementsprechend stark mit industriellen und kommunalen Abwässern belastet. Die Wasserqualität wird weiterhin maßgeblich durch die Wind- und Stömungsverhältnisse in diesem Gebiet beeinflusst (GAČIĆ et al. 2001). Obwohl 93 % der untersuchten Proben den Anforderungen der Richtlinie 2004/41/EG im Bezug auf *E. coli* entsprachen, ist eine virale Belastung von Meeresfrüchten aus Zuchtgebieten, die zumindest zeitweise durch entsprechende Umweltfaktoren mit fäkal kontaminiertem Wasser belastet sind somit durchaus nachvollziehbar. Weiterhin ist *E. coli* - wie schon unter 5.2.1.3 beschrieben - nicht immer ein zuverlässiger Indikator einer viralen Kontamination.

LODDER-VERSCHOOR et al. (2005) führten ein einjähriges Monitoring verschiedener kommerzieller und nicht kommerzieller Austernzuchtgebiete in der Oosterschelde (NL) durch. Neben der Untersuchung der mikrobiellen Belastung wurden alle 36 kommerziellen und 28 nichtkommerziellen Proben auf verschiedene humanpathogene Viren (Noroviren, Rotaviren, Enteroviren, Astroviren und HAV) untersucht. In insgesamt 14 Proben konnten die Untersucher Enteroviren detektieren. Andere humanpathogene Viren ließen sich nicht nachweisen. Man muss einschränkend hinzufügen, dass mit dem PCR Assay, welches hier verwendet wurde, auch bovine Enteroviren nachgewiesen werden können. Der Ursprung der hier in den Austern gefundenen Viren muss somit als ungeklärt betrachtet werden. Weiterhin gibt es heute keine Erkenntnisse über einen kausalen Zusammenhang zwischen dem Verzehr von kontaminierten Meeresfrüchten und einer Enterovirusinfektion.

Auch in diesem Fall beschreiben die Autoren die Korrelation zwischen einer viralen Kontamination und der *E. coli* Belastung der Proben als ungenügend und stellen den Wert dieses Bakteriums als Indikator stark in Frage.

Es bleibt festzuhalten, dass die Belastung des Biotops mit humanpathogenen Viren stark von verschiedenen Umwelteinflüssen abzuhängen scheint. Neben jahreszeitlichen Einflüssen wie Temperatur, Wind- und Strömungsverhältnissen spielen die Kontamination von Frischwasser zuleitenden Flüssen und die Durchflussraten innerhalb des Biotops sicher eine entscheidende Rolle bei der Verteilung von infektiösem viralem Material.

6.2 Nachweis von Indikatorkeimen

Dass sich der Zusammenhang zwischen einer fäkalen Belastung und dem Auftreten viral bedingter Gastroenteritiden nicht immer so deutlich darstellt wie in dieser Studie, zeigen die Ergebnisse von LODDER-VERSCHOOR et al. (2005), LEES (2000) und CHRISTENSEN et al. (1998). Die Autoren konnten darstellen, dass Muscheln, welche keine erhöhte Belastung mit *E. coli* aufwiesen, humanpathogene Viren enthielten. CABELLI et al. (1982) berichteten, dass zwischen der Anzahl der Fäkalcoliformen in Badegewässern und dem Auftreten viral bedingter Gastroenteritiden bei den Schwimmern nur eine sehr geringe Korrelation festzustellen sei. In dieser Studie erwiesen sich Enterokokken als der am besten geeignete Indikator. Es zeigte sich, dass Enterokokken die Klärung von Abwässern weitgehend überleben und auch höhere Überlebensraten in marinen Habitaten zeigen als beispielsweise *E. coli*. Allerdings liegt die Anzahl der Enterokokken in geklärten und ungeklärten Abwässern um ein bis zwei Zehnerpotenzen unter der von *E. coli*. Vor allem *Enterococcus faecalis* zeichnet sich durch eine hohe Salztoleranz und eine ausgeprägte Umweltstabilität aus. So zeigt der Keim Wachstum in einem Temperaturbereich von 10°C bis 45°C in Anwesenheit von 6,5 % NaCl bei pH 9,6 (BAUMGART 2007). Weiterhin gehen einige Autoren davon aus, dass *Enterococcus faecalis* - im Gegensatz zu *Escherichia coli* - über ein recht eingeschränktes Wirtsspektrum verfügt; POURCHER et al. (1991) fanden den Erreger im Darm von Menschen, Hühnern und Möwen, jedoch nicht oder nur in sehr geringer Zahl bei Rindern, Pferden, Kaninchen, Schafen und Schweinen. Diese Ergebnisse konnten 2002 in einer Untersuchung von WHEELER et al. bestätigt werden. Die Untersucher wiesen den Keim ebenfalls nur im Darm von Menschen, Hühnern und Hunden nach (POURCHER et al. haben 1991 keine Kotproben von Hunden untersucht). Wiederum konnte *Enterococcus faecalis* nicht im Darm von Rindern, Rotwild (wild und in Gehegehaltung) und Schweinen nachgewiesen werden.

Ein derart eingeschränktes Wirtsspektrum würde den Nutzen von *Enterococcus faecalis* als Indikatorkeim für die hier besprochenen Viren noch steigern, da so eine Kontamination durch humane Fäkalien leichter nachzuweisen wäre und sich die Quelle einer solchen Kontamination schneller identifizieren ließe.

6.2.1 Bakteriophagen als Indikatoren einer fäkalen Kontamination

Wie unter 5.2.1 beschrieben, sind in den vergangenen Jahren verschiedene Bakterien, darunter Fäkalcoliforme, *Escherichia coli* und Enterokokken, als Indikatoren für eine fäkale Kontamination vorgeschlagen und genutzt worden. Einige Studien haben jedoch wiederholt gezeigt, dass diese bakteriellen Indikatoren eine Kontamination durch fäkal-oral übertragbare, humanpathogene Viren in den untersuchten Gewässern nicht immer sicher anzeigen (DURAN et al. 2003, GERBA 1987; BERG et al. 1978). Mehrere Autoren haben in diesem Zusammenhang bereits die Vorteile von Bakteriophagen als Indikatoren einer fäkalen Kontamination beschrieben (COLE et al. 2003, ENDLEY et al. 2003a, HOT et al. 2003, HSU et al. 2002, HAVELAAR 1993, GERBA 1987, HAVELAAR et al. 1986).

Bakteriophagen sind Viren, die Bakterienzellen infizieren. Sie wurden erstmals 1915 durch Frederick TWORT und 1917 durch Felix D'HERELLE beschrieben. Inzwischen hat man eine Vielzahl verschiedener Bakteriophagen isoliert und kennt heute Phagen für alle bekannten Bakterienspezies. Bakteriophagen sind in der Natur weit verbreitet und wurden bereits im Grundwasser (PILLAI und NWACHUKU 2000), Flusswasser (HOT et al. 2003), Berieselungswasser (CEBALLOS et al. 2003), Abwässern (NELSON et al. 2004), im Meerwasser (JIANG und CHU 2004) und Bioaerosolen (ESPINOSA und PILLAI 2002) nachgewiesen. Weiterhin fanden sie sich in Muscheln (CROCI et al. 2000) und auf der Oberfläche verschiedener Gemüse (ENDLEY et al. 2003a, 2003b).

Die Verwendung von Coliphagen als Indikatoren einer fäkalen Kontamination basiert auf der Annahme, dass ihre Anwesenheit im Wasser gleichzeitig die Anwesenheit von Bakterien anzeigt, welche die Phagen für ihre Vermehrung benötigen. Die Begründung zur Nutzung dieser Viren als Marker für eine Kontamination mit fäkal-oral übertragbaren, humanpathogenen Viren liegt in ihrer sehr ähnlichen Größe und Umweltstabilität sowie in nahezu identischen Transportwegen und Verbreitungs- und Verteilungsmustern. Zusätzlich finden sich Coliphagen in recht hoher Anzahl in der Umwelt, vermehren sich in dieser aber schwer und können mit einem Bruchteil des finanziellen Aufwandes ermittelt werden, der für den Nachweis von Noro- oder Hepatitis A-Viren nötig wäre.

Coliphagen finden sich im Stuhl von Menschen, Rindern und Schweinen mit einer Dichte zwischen 10^1 und 10^7 pfu/g (HAVELAAR et al. 1986, OSAWA et al. 1981, DHILLON et al. 1976). In nahezu allen ungeklärten Abwässern weisen sie eine Dichte zwischen

10^4 und 10^6 pfu/ml auf. Generell vermehren sie sich nicht in der Umwelt, da sie, wie alle Viren, einen Wirtsorganismus für die Replikation benötigen. Eine Ausnahme können hier solche Gewässer sein, in denen sich auch *E. coli* vermehrt (s. 2.1.3.2.1). Allerdings wurde bis heute noch nie über eine solche Vermehrung in der Natur berichtet. Ein Grund dafür ist wohl die Tatsache, dass Phagen für eine effektive Infektion des Wirtsorganismus und die anschließende Vermehrung in demselben Temperaturen von mehr als 30°C benötigen. Auch weitere für die Phagenvermehrung wichtige Parameter (optimale Dichte von Bakterien und Phagen, physiologische Bedingungen für die Bakterien) finden sich in einem natürlichen aquatischen Habitat kaum (MUNIESA und JOFRE 2004). Als Indikatoren für enterale Viren in Gewässern wurden somatische Coliphagen, F+ RNA Coliphagen (*Leviviridae*) und *Bacteroides fragilis*-infizierende Phagen (*Siphoviridae*) vorgeschlagen (JOFRE et al. 1995, HAVELAAR 1993, IAWPCR 1991).

Somatische Coliphagen gehören zu einer sehr heterogenen Gruppe von Phagen mit unterschiedlichen Charakteristika, die sich jedoch alle bestimmter Rezeptoren in der Zellwand des Wirtsbakteriums bedienen. Die Wirtsstämme sind *E. coli* bzw. *Enterobacteriaceae*.

Alle bekannten F+ RNA Coliphagen gehören zur Familie *Leviviridae*. Obwohl sie sich in ihren Eigenschaften unterscheiden bilden sie eine homogene Gruppe (DURAN et al. 2003). Ihre Wirte sind Bakterien, die das F-Plasmid besitzen, welches ursprünglich bei *E. coli* K12 entdeckt wurde. Die Infektion des Wirtsbakteriums erfolgt über andocken an die F-Pili, für die das F-Plasmid codiert.

Die meisten Bakteriophagen, die *Bacteroides fragilis* infizieren, gehören zur Familie *Siphoviridae* und scheinen ebenfalls eine homogene Gruppe zu bilden (PUIG et al. 1999).

Zahlreiche Studien belegen für bestimmte Bedingungen eine höhere Resistenz, im Vergleich zu den klassischen Indikatoren, vor allem für *Bacteroides fragilis*-infizierende Phagen, für somatischen Coliphagen, insbesondere aus der Familie *Siphoviridae*, bzw. für F+ RNA Coliphagen. ALLWOOD et al. (2004) haben die Anwesenheit von F+ RNA Coliphagen als starken Indikator für die Anwesenheit von Noroviren in Wasserproben postuliert. Ihre Ausführungen beruhen dabei auf Modellversuchen zur Überlebensfähigkeit von *E. coli*, F+ RNA Coliphagen und Felinen Caliciviren in dechloriertem Wasser, welches für 28 Tage bei 4°C , 25°C und 37°C gelagert wurde. Die Untersucher berichteten weiterhin über die hohe Korrelation bei den Überlebensraten der Felinen Caliciviren und dem F+ Phagen MS2 auf der Oberfläche von Blattsalaten. HUMPHREY und MARTIN (1993) berichteten über den Wert somatischer Coliphagen als Indikatoren einer fäkalen Kontamination von Pazifischen Austern während deren Reinigung in unbelaste-

tem Wasser. DORE und LEES (1995) untersuchten die Persistenz von F+ RNA Phagen im Verdauungstrakt fäkal kontaminierter Muscheln und kamen hier zu dem Ergebnis, dass sich die Phagen sehr gut zum Nachweis einer völligen Eliminierung der Kontaminanten eignen.

Auf der anderen Seite beobachteten CROCI et al. (2000), dass weder *E. coli* noch F+ Phagen verlässliche Indikatoren für eine Kontamination von Muscheln aus der Adria mit enteralen Viren darstellen. Nur in 3 von 36 untersuchten Proben (8 %) konnten F+ Bakteriophagen nachgewiesen werden. Obwohl alle drei Proben positiv auf HAV getestet wurden, ließen sich nur in einer Probe Enteroviren nachgeweisen. Ähnliche Ergebnisse erbrachten die Studien von MUNIAIN-MUJICA et al. (2003). Die Untersucher fanden jedoch eine hohe Korrelation beim Nachweis von Phagen des *Bacteroides fragilis* Stamms RYC20 und enteralen Viren in Muscheln. Bereits 1994 berichteten LUCENA et al. über die - gegenüber anderen Indikatororganismen - hohen Überlebensraten von *Bacteroides*-Phagen in Muscheln. Weiterhin konnten die Autoren feststellen, dass die Verteilungs- und Überlebensmuster dieser Phagen denen von humanen Viren in einem marinen Habitat am stärksten ähneln.

Generell kann festgehalten werden, dass Bakteriophagen aufgrund ihrer Ähnlichkeit mit humanen Viren - bezogen auf Umweltstabilität und Verteilungsmuster - durchaus als Indikatoren für eine Kontamination mit enteralen Viren geeignet erscheinen. Weitere Vorteile bilden die Apathogenität für den Menschen und der recht einfache und kostengünstige Nachweis. Es sind jedoch weitere Untersuchungen notwendig, um Nutzen und Vorteile der Bakteriophagen gegenüber den „klassischen“ Indikatororganismen zu belegen.

7 Zusammenfassung

7.1 Bakterieller und viraler Kontaminationsstatus von Pazifischen Felsenaustern - einjähriges Monitoring des „Berliner Angebots“

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Belastung mit relevanten bakteriellen und viralen Erregern am Beispiel von in Berlin vertriebenen Pazifischen Felsenaustern unterschiedlicher Herkunft zu bestimmen.

Hierzu wurden im Rahmen eines mehr als einjährigen Monitoring pro Monat - allerdings mit Unterbrechungen wegen Lieferproblemen - jeweils drei Chargen pazifischer Felsenaustern (*Crassostrea gigas*) aus verschiedenen europäischen Ursprungsgebieten untersucht. Jede Charge enthielt dabei 24 Muscheln, von denen je Zwölf auf Noroviren bzw. Hepatitis A-Viren (HAV) untersucht wurden. Es wurden insgesamt 477 Einzelproben auf Noroviren und 372 Einzelproben auf HAV getestet. Weiterhin wurden aus jeder Charge 25 g Probenmaterial für den mikrobiologischen Gesamtstatus entnommen. Die Proben stammten von einem Importeur, der seine Produkte deutschlandweit vertreibt. Es handelte sich sowohl um Ware, die aus Frankreich, Irland und den Niederlanden eingeführt wurde, als auch um Deutsche Austern von der Insel Sylt.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, dass in den überprüften Proben weder Noroviren noch HAV nachgewiesen werden konnten. Auch Salmonellen, *Listeria monocytogenes* und *E. coli* ließen sich nicht isolieren. Lediglich 13 % der untersuchten Proben zeigten eine erhöhte aerobe Gesamtkeimzahl, bei weiteren 13 % konnten erhöhte bzw. grenzwertige Gehalte an Enterobakteriaceen nachgewiesen werden. In drei der untersuchten Proben (7 %) lagen erhöhte bzw. grenzwertige Gehalte an Pseudomonaden und Aeromonaden im Bezug auf die Richtwerten der DGHM vor.

Für die Interpretation der Resultate ist zu beachten, dass alle Muscheln direkt vom Importeur bzw. Großhändler stammten. Proben bei Abgabe an den Endverbraucher wurden nicht untersucht. Dieser Umstand ist insofern von Bedeutung, als die Rekontamination durch Verkaufs- und Küchenpersonal - neben der Verunreinigung durch unbelebte Vektoren wie Bedarfsgegenstände - die größte Rolle bei der Übertragung von Pathogenen spielt. Aufbauend auf dieser Arbeit wäre somit die Untersuchung von Proben, welche direkt aus dem Einzelhandel stammen, aussagekräftiger. Wegen der geringen Prävalenz der Noroviren und Hepatitis A-Viren bei Anlieferung der Ware,

scheint diese Stelle in der Kette von der Austernbank zur Oysterbar für ein Gefahrenmonitoring wenig geeignet zu sein.

Hier bietet eine Überwachung des Biotops einerseits sowie des Einzelhandels andererseits wahrscheinlich größere Sicherheit bei der Beherrschung des Risikos.

Aus methodologischer Sicht kann festgestellt werden, dass sich die konventionelle RT-PCR mit dem MON-Primer System sehr gut eignet, um Lebensmittelproben auf Noroviren zu untersuchen. In der Real-Time PCR fehlte hierzu eine entsprechend sensitive Primer-Sonden Kombination zur Detektion der Genogruppe I. Auch das GG II System muss trotz seiner guten Sensitivität weiter verbessert werden, um der großen Heterogenität innerhalb der Noroviren gerecht zu werden.

Das artus HAV LC RT-PCR Kit[®] ist zurzeit das einzig kommerziell erhältliche System zur Detektion von HAV mittels der Real Time PCR. Es weist eine sehr gute Sensitivität auf, das Handling gestaltet sich einfach und unproblematisch.

8 Summary

8.1 Bacterial and viral contamination of Pacific Rock Oysters (*Crassostrea gigas*) – one year monitoring of the “Berlin-Supply”

The present study aimed at determining the contamination of pacific rock oysters from different origins with relevant bacterial and viral organisms.

For that purpose, oyster samples were taken regularly between March 2005 and July 2006 from different European origins (France, Netherlands, Ireland and Germany). A total of 477 samples were analysed for norovirus and of 372 samples for HAV. In addition 25 g sample material from every charge was tested for the bacterial contamination. The analysis included the compulsory microbiological parameters *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. as well as the determination of the total bacterial count and of the contamination with Lactobacillus, Lactic Bacteria, *Pseudomonas* spp. *Aeromonas* spp. coagulase-positive Staphylococci, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*, *Enterobacteriaceae*, Enterococci, Coliforms, Moulds and Yeasts.

The results of this study show that in the investigated samples norovirus and HAV could not be detected. The same applies to *Salmonella*, *E. coli* and *Listeria monocytogenes*. Only 13% of the samples showed an increased total aerobic bacterial count, with further 13% had elevated levels of *Enterobacteriaceae*. Three of the samples (7%) showed increased levels of *Pseudomonas* spp. and *Aeromonas* spp.

For the interpretation of the results it is important to recognize that all samples were collected at a local wholesaler. Recontamination through sale and kitchen staff plays next to the pollution caused by abiotic vectors, such as customer goods, the largest role in the transmission of the virus. The examination of retail samples is probably more significant. Due to the low prevalence of noroviruses and Hepatitis A-viruses at the time of delivery, other points in the chain, from oystersfarm to oysterbar, seems to be more appropriate for a monitoring.

The conventional RT-PCR system with MON-primers is suitable to investigate food samples for noroviruses. In the Real-Time PCR sensitive primer-probe combinations for the detection of Genogroup I noroviruses were missing. The GG II system has to be improved further due to the great heterogeneity within the noroviruses, although it showed a good sensitivity.

The artus HAV LC RT-PCR Kit® is currently the only commercially available system for the detection of HAV through the Real Time PCR. It has a very good sensitivity and the handling is very easy and straightforward.

9 Literatur

- ADLER, J.L., ZICKL, R. (1969). Winter vomiting disease. *J. Infect. Dis.* **119**, 668-673
- AHNE, W. (2000). Metazoa. In: AHNE, LIEBICH, STOHRER, WOLF Zoologie, Kap. 5.3, 1. Auflage. Schattauer Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart
- ALLWOOD, P.B., MALIK, Y.S., HEDBERG, C.W., GOYAL, S.M. (2004). Effect of temperature and sanitizers on the survival of feline calicivirus, *Escherichia coli*, and F-specific coliphage MS2 on leafy salad vegetables. *J. Food Prot.* **67**, 1451-1456
- AMMON, A. BRÄUNING, J. (2002). Gesundheitsberichterstattung des Bundes. *Lebensmittelbedingte Erkrankungen in Deutschland*. Heft **01/02**. Verlag Robert-Koch-Institut
- ANDO, T., NOEL, J.S., FANKHAUSER, R.L. (2000). Genetic classification of „Norwalk-like viruses“. *J. Infect. Dis.* **119**, 336-348 (Suppl. 2)
- ANDO, T., MONROE, S.S., GENTSCH, J.R., JIN, Q., LEWIS, D.C., GLASS, R.I. (1995). Detection and differentiation of antigenically distinct Small-Round-Structured Viruses (Norwalk-Like Viruses) by Reverse Transcription-PCR and Southern Hybridization. *J. Clin. Microbiol.* **33**, 64-71
- ANONYMOUS (1992). Microbiological criteria for raw molluscan shellfish. *J. Food Prot.* **55**, 667-671
- ARIAS, C.R., MACIÁN, M.C., AZNAR, R., GARAY, E., PUJALTE, M.J. (1999). Low incidence of *Vibrio vulnificus* among *Vibrio* isolates from sea water and shellfish of the western Mediterranean coast. *J. Appl. Microbiol.* **86**, 125-134
- BAKER, D., JIA, J. (2000). Small ponds make a big difference. Integrating fish with crop and livestock farming. Some basic facts about aquaculture. FAO, Rom
- BAYNE, B.L., WIDDOWS, J., THOMPSON, R.J. (1976). Physiological integrations. In: Bayne, B.L. (Hrsg.) *Marine mussels*. Cambridge University Press. Cambridge, USA, 261-299
- BAUMGART, J. (2007). Markerorganismen, Kap. III.2.3 Enterokokken. In: *Mikrobiologische Untersuchung von Lebensmitteln*, J. Baumgart, B. Becker (Hrsg.). Behr's Verlag, Hamburg, 21-26
- BERG, G., METCALF, T.G. (1978). Indicators of viruses. In: *Indicators of viruses in water and food* (G. Berg, Hrsg.), Ann Arbor Science Publishers, Ann Arbor, MI, USA, 267-296

- BERG, G., DAHLING, D.R., BROWN, G.A., BERMAN, D. (1978). Validity of fecal coliforms, total coliforms and fecal streptococci as indicators of viruses in chlorinated primary sewage effluents. *Appl. Environ. Microbiol.* **36**, 880-884
- BERLOTTI-CIARLET, A., CRAWFORD, S.E., HUTSON, A.M., ESTES, M.K. (2003). The 3' end of Norwalk virus mRNA contains determinants that regulate the expression and stability of the Kapsid protein VP1: a novel function for the VP2 protein. *J. Virol.* **77**, 10957-10974
- BESSETTI, J. (2007). PCR Inhibition. An Introduction to PCR Inhibitors.
Internet: http://www.promega.com/profiles/1001/ProfilesinDNA_1001_09.pdf
- BEURET, C., KOHLER, D., BAUMGARTNER, A., LÜTHI, T.M. (2002). Norwalk-like virus sequences in mineral waters: one-year monitoring of three brands. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 1925-1931
- BOXMAN, I.L.A., TILBURG, J.J.H.C., TE LOEKE, N.A.J.M., VENNEMA, H., JONKER, K., DE BOER, E., KOOPMANS, M. (2006). Detection of noroviruses in shellfish in the Netherlands. *Int. J. Food Microbiol.* **108**, 391-396
- BRANDS, D.A., INMAN, A.E., GERBA, C.P., MARÉ, C.J., BILLINGTON, S.J., SAIF, L.A., LEVINE, J.F., JOENS, L.A. (2005). Prevalence of *Salmonella* spp. in oysters in the United States. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 893-897
- BROWN, E.A., ZAJAC, A.J., LEMON, S.M. (1994). In vitro characterization of an internal ribosomal entry site (IRES) present within the 5' nontranslated region of Hepatitis A-virus RNA: comparison with the IRES of encephalomyocarditis virus, *J. Virol.* **68**, 1066-1074
- BREESE, J.S., WIDDOWSON, M.-A., MONROE, S.S., GLASS, R.I. (2002). Foodborne viral gastroenteritis: challenges and opportunities. *Clin. Infect. Dis.* **35**, 748-753
- BRYNESTAD, S., GRANUM, P.E. (2002). *Clostridium perfringens* and foodborne infections. *Int. J. Food Microbiol.* **74**, 195-202
- BUCK, B.H. (2002). Open Ocean Aquaculture und Offshore Windparks. Eine Machbarkeitsstudie über die multifunktionale Nutzung von Offshore-Windparks und Offshore Marikultur im Raum Nordsee. *Berichte zur Polar und Meeresforschung*, 412
- CABELLI, V.J., DUFOUR, A.P., LEVIN, M.A., MCCAGE, L.J. (1982). Swimming associated gastroenteritis and water quality. *Am. J. Epidemiol.* **115**, 606-616
- CABELLI, V.J. (1983). Health effects for marine recreation waters. *USEPA 600/1-80-031*. Health Effects Research Laboratory, Research Triangle Park, N.C. USA

CEBALLOS, B.S., SOARES, N.E., MORAES, M.R., CATAO, R.M., KONIG, A. (2003). Microbiological aspects of an urban river used for unrestricted irrigation in the semiarid region of north-east Brazil. *Water Sci. Technol.* **47**, 51–57

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (1999). Prevention of Hepatitis A through active or passive immunization. Recommendation of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *Morbidity and Mortality Weekly Report* **48(RR-12)**, 1-37

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (2004a). Diagnosis and management of foodborne illnesses: a primer for physicians and other health care professionals. *Morbidity and Mortality Weekly Report* **53(RR-4)**, 17

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (2004b). National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004.

Internet: <http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/nnis/2004NNISreport.pdf>

CHAKRAVARTY, S., HUTSON, A.M., ESTES, M.K., PRASAD, B.V.V. (2005). Evolutionary trace residues in Noroviruses: importance in receptor binding, antigenicity, virion assembly, and strain diversity. *J. Virol.* **79**, 554-568

CHINA, B., DE SCHAEZTEN, M.-A., DAUBE, G. (2003). Les mollusques bivalves, des aliments dangereux? *Ann. Méd. Vét.* **147**, 413-422

CHRISTENSEN, B.F., LEES, D., HENSHILWOOD, K., BJERGSKOV, T., GREEN, J. (1998). Human enteric viruses in oysters causing a large outbreak of human food borne infection in 1996/97. *J Shellfish Res.* **17**, 1633-1635

CLIVER, D.O. (1997). Virus transmission via food. *Food Technol.* **51**, 71-78

COLBY, J.-W., ENRIQUEZ-IBARA, L.G., FLICK, G.J. (1995). Shelf life of fish and shellfish. In: G. CHARALAMBOUS (Hrsg.) Shelf life studies of foods and beverages, chemical, biological, physical and nutritional aspects. Elsevier, New York, 85-143

COLE, D., LONG, S.C., SOBSEY, M.D. (2003). Evaluation of F+ RNA and DNA coliphages as source-specific indicators of fecal contamination in surface waters. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 6507–6514

COSTA-MATTIOLI, M., FERRE, V., MONPOEHO, S., GARCIA, L., COLINA, L., BILLAUDEL, S., VEGA, I., PEREZ-BERCOFF, R., CRISTINA, J. (2001a). Genetic variability of Hepatitis A virus in South America reveals heterogeneity and co-circulation during epidemia outbreaks, *J. Gen. Virol.* **82**, 2647–2652

- COSTA-MATTIOLI, M., MONPOEHO, S., SCHVOERER, C., BESSE, B., ALEMAN, M.H., BILLAUDEL, S., CRISTINA, J., FERRE, V. (2001b). Genetic analysis of Hepatitis A-virus outbreak in France confirms the co-circulation of subgenotypes Ia, Ib and reveals a new genetic lineage, *J. Med. Virol.* **65**, 233–240
- CRISTINA, J., COSTA-MATTIOLI, M. (2007). Genetic variability and molecular evolution of Hepatitis A-virus. *Virus Research* **127**, 151-157
- CROCI, L., DE MEDICI, D., SCALFARO, C., FIORE, A., DIVIZIA, M., DONIA, D., COSENTINO, A.M., MORETTI, P., COSTANTINI, G. (2000). Determination of enteroviruses, virus, bacteriophages and *Escherichia coli* in Adriatic Sea mussels. *J. Appl. Microbiol.* **88**, 293–298
- CROCI, L., LOSIO, M.N., SUFFREDINI, E., PAVONI, E., DI PASQUALE, S., FALLACARA, F., ARCANGELI, G. (2007). Assessment of human enteric viruses in shellfish from the northern Adriatic sea. *Intern. J. Food Microbiol* **114**, 252-257
- CROEMANS, T.L. (1997). Understanding and preventing virus transmissions via foods. *Food Technol.* **51**, pp. 20
- Custom Medical Stock Photo 3660 West Irving Park Road Chicago, Illinois 60618-4132, USA
- Deutsches Akkreditierungssystem Prüfwesen GmbH (2006). Anforderungskatalog des Sektorkomitees Lebensmittelanalytik. Qualitätslenkung in der molekularbiologischen Diagnostik, Anhang V
- Internet: <http://www.dap.de/doc.html>
- DESMARIS, T.R., SOLO-GABRIELE, H.M., PALMER, C.J. (2002). Influence of soil on fecal indicator organisms in a tidally influenced subtropical environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 1165-1172
- Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) (2007). Empfehlung der Fachgruppe Lebensmittelmikrobiologie und -hygiene der DGHM. Präambel für Richt- und Warnwerte der DGHM (Stand 30.11.2007) (Arbeitsgruppe Mikrobiologische Richt- und Warnwerte in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe "Lebensmittelmikrobiologie der Staatlichen Veterinäruntersuchungsamt / Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt (SVUA/CVUA) NRW). Veröffentlichte mikrobiologische Richt- und Warnwerte zur Beurteilung von Lebensmitteln, 24 Seefische
- Internet: <http://www.lm-mibi.uni-bonn.de/DGHM.html#25>
- DE WIT, M.A.S., KOOPMANS, M.P., VAN DUYNHOVEN, Y.T.H.P. (2001). Risk Factors for Norovirus, Sapporo-like Virus, and Group A Rotavirus Gastroenteritis. *Emerging Infectious Diseases*, **9**, 1563-1570

DE WIT, M.A.S., KOOPMANS, M.P., KORTBEEK, L.M., WANNET W.J., VINJE, J., VAN LEUSDEN, F. (2001). Sensor, a population-based cohort study on gastroenteritis in the Netherlands: incidence and etiology. *Am. J. Epidemiol.* **154**, 666-674

D'HERELLE, F. (1917). Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques. *C.R. Acad. Sci. Paris* **165**, 373–375.

DHILLON, T.S., DHILLON, E.K.S., CHAU, H.C., LI, W.K., TSANG, A.H.C. (1976). Studies on bacteriophage distribution - virulent and temperate bacteriophage content of mammalian feces. *Appl. Environ. Microbiol.* **32**, 68–74

DOLIN, R., BLACKLOW, N.R., DUPONT, H., BUSCHO, R.F., WYATT, R.G., KASEL, J.A., HORNICK, R., CHANOCK, R.M. (1972). Biological properties of Norwalk agent of acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine* **140**, 578-583

DORE, W.J., LEES, D.N. (1995). Behavior of *Escherichia coli* and male-specific bacteriophage in environmentally contaminated bivalve molluscs before and after depuration. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 2830–2834

DREIER, J., STÖRMER, M., KLEESIEK, K. (2005). Use of bacteriophage MS2 as an internal control in viral transverse transcription-PCR assays. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 4551-4557

DUIZER, E., SCHWAB, K.J., NEILL, F.H., ATMAR, R.L., KOOPMANS, M.P.G., ESTES, M.K. (2004). Laboratory efforts to cultivate Noroviruses. *J. Gen. Virol.* **85**, 79-87

DURAN, A.E., MUNIESA, M., MOCE-LLIVINA, L., CAMPOS, C., JOFRE, J., LUCENA, F. (2003). Usefulness of different groups of bacteriophages as model micro-organisms for evaluating chlorination. *J. Appl. Microbiol.* **95**, 29–37

DUTKA, B.J., CHAU, A.S.Y., COBURN, J. (1974). Relationship between bacterial indicators of water pollution and fecal sterols. *Water Res.* **8**, 1047-1055

ESCHERICH, T. (1885). Die Darmbakterien des Neugeborenen und des Säuglings. *Fortschr. Med.* **3**, 515-522, 547-554

ENDLEY, S.E., VEGA, E., LINGENG, L., HUME, M., PILLAI, S.D. (2003a). Male-specific coliphages as an additional fecal contamination indicator for screening fresh carrots. *J. Food Prot.* **66**, 88–93

ENDLEY, S., JOHNSON, E., PILLAI, S.D. (2003b). A simple method to screen cilantro and parsley for fecal indicator viruses. *J. Food Prot.* **66**, 1506–1509

- ESPINOSA, I.Y., PILLAI, S.D. (2002). Impaction-based sampler for detecting male-specific bacteriophages in bioaerosols. *J. Rapid Methods Autom. Microbiol.* **10**, 117–127
- ESTES, M.K., BALL, J.M., GUERRERO, R.A., OPEKUN, A.R., GILGER, M.A., PACHECO, S.S., GRAHAM, D.Y. (2000). Norwalk virus vaccines: Challenges and progress. *J. Infect. Dis.* **181**, 367-373 (Suppl. 2)
- FANKHAUSER, R.L., MONROE, S.S., NOEL, J.S., HUMPHREY, C.D., BREESE, J.S., PARASHAR, U.D., ANDO, T., GLASS, R.I. (2002). Epidemiologic and molecular trends of „Norwalk-like viruses“ associated with outbreaks with gastroenteritis in the United States. *J. Infect. Dis.* **186**, 1-7
- FAO (1999). Aquaculture Production Statistics 1988–1997. *Fisheries Circular* **815** Rev. 11, FAO, Rome
- FAO SPECIES FACT SHEET (2001). A world overview of species of interest to fisheries, *Crassostrea gigas*, SIDP-Species Identification and Data Programme
- Internet: <http://www.fao.org> (Stand: 25.07.2007)
- FAO (2002). Cultured Aquatic Species Information Programme, *Crassostrea giga*
- Internet: <http://www.fao.org> (Stand: 25.07.2007)
- FAO (2004). The State of World Fisheries and Aquaculture (2004) PART 1, World review of fisheries and aquaculture, Fisheries Resources: Trends in Production, Utilization and Trade
- Internet: <http://www.fao.org>
- FAO (2005). National Aquaculture Sector Overview France
- Internet: http://www.fao.org/fishery/countrysector/naso_france
- FAO (2006). Trends in aquaculture production
- Internet: <http://www.fao.org> (Stand: 25.07.2007)
- FEHLHABER, K. (1992). Mikroorganismen. In: FEHLHABER, K. und P. JANETSCHKE Veterinärmedizinische Lebensmittelhygiene. Gustav Fischer Verlag Jena, 24-83
- FEINSTONE, S.M., KAPIKIAN, A.Z., PURCELL, R.H. (1973). Hepatitis A-detection by immune electron microscopy of a virus-like antigen associated with acute illness. *Science* **182**, 1026–1028
- FUJIOKA, R.S., SHIZUMURA, L.K. (1985). *Clostridium perfringens*: a reliable indicator of stream water quality. *J. Water Pollut. Control Fed.* **57**, 986-992

- GAČIĆ, M., POULAIN, P.-M., ZORE-ARMANDA, M., BARALE, V. (2001). Overview. In: B. Cushman-Roisin, M. Gačić, P.-M. Poulain and A. Artegiani (Ed.) *Physical Oceanography of the Adriatic Sea. Past, Present and Future*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1–44
- GALTSOFF, P. S. (1964). The American oyster. *Fishery bulletin (US.)* **64**, 1-480
- GASSILOUD, B., SCHWARTZBROD, L., GANTZER, C. (2003). Presence of viral genomes in mineral water: a sufficient condition to assume infectious risks? *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 3965-3969
- GAULIN, C.D., RAMSAY, D., CARDINAL, P., D'HALEWYN, M.A. (1999). Epidemic of gastroenteritis of viral origin associated with eating imported raspberries, *Canadian Journal of Public Health* **90**, 37–40
- GERBA, C.P. (1987). Phage as indicators of fecal pollution. In: *Phage Ecology* (S.M. Goyal, C.P. Gerba and G. Bitton, Hrsg.), Wiley Interscience, New York, 197–210
- GLASS, I.R., NOEL, J., ANDO, T., FANKHAUSER, R., BELLIOU, G., MOUNTS, A., PARASHAR, U.D., BRESEE, J.S., MONROE, S.S. (2000). The epidemiology of enteric Caliciviruses from humans: a reassessment using new diagnostics. *J. Infect. Dis.* **181**, 254-261
- GORCZYCA, E., SUMNER, J.L., COHEN, D., BRADY, P. (1985). Mesophilic fish spoilage. *FOOD TECHNOLOGY IN AUSTRALIA*, **37**, 24-26
- GOSERT, R., EGGER, D., BIENZ, K. (2000). A cytopathic and a cell culture adapted Hepatitis A-virus strain differ in cell killing but not in intracellular membrane rearrangements, *Virology* **266**, 157–169
- GOSLING, E. (2003 a). Kap. 2: Morphology of the Bivalves. In: *Bivalve Molluscs: Biology, Ecology and Culture*, 1. Auflage, Wiley-Blackwell
- GOSLING, E. (2003 b). Kap. 3: Ecology of the Bivalves. In: *Bivalve Molluscs: Biology, Ecology and Culture*, 1. Auflage, Wiley-Blackwell
- GOSLING, E. (2003 c). Kap. 4: How Bivalves Feed. In: *Bivalve Molluscs: Biology, Ecology and Culture*, 1. Auflage, Wiley-Blackwell
- GOSLING, E. (2003 d). Kap. 9: Bivalve Culture. In: *Bivalve Molluscs: Biology, Ecology and Culture*, 1. Auflage, Wiley-Blackwell
- GOTZ, H., EKDAHL, K., LINDBACK, J., DE JONG, B., HEDLUND, K.O., GISECKE, J. (2001). Clinical spectrum and transmission characteristics of infection with Norwalk-like virus: findings from a large community outbreak in Sweden. *Clin. Infect. Dis.* **33**, 622-628

- GREEN, J., VINJE, J., GALLIMORE, C.I., KOOPMANS, M., HALE, A., BROWN, D.G. (2000). Kapsid protein diversity among Norwalk-like viruses. *Virus Genes* **20**, 227–236
- GREEN, K.Y., CHANOCK, R.M., KAPIKIAN, A.Z. (2001). Human caliciviruses In: D.M. Knipe and P. Howley (Hrsg.) *Fields Virology*, Williams and Wilkins, Lippincott, Philadelphia, 847–874
- GREEN, K.Y., BELLIOU, G., TAYLOR, J., VALDESUSO, J., LEW, J., KAPIKAN, A.Z., LIN, F.-Y. (2002). A predominant role for Norwalk-like viruses as agents of epidemic gastroenteritis in Maryland nursing homes for the elderly. *J. Infect. Dis.* **185**, 133-146
- HÄFLIGER, D., GILGEN, M., LÜTHY, J., HÜBNER, P. (1997). Seminested RT-PCR systems for small round structured viruses and detection of enteric viruses in seafood, *Intern. J. Food Microbiol.* **37**, 27–36
- HALLANDER, H., THORE, M., WOLLIN, R. (2002). Referensmetodik för laboratoriediagnostik vid kliniskt mikrobiologiska laboratorier. Smittskyddsinstitutet (Swedish Institute for Infectious Disease Control).
- Internet: <http://www.smittskyddsinstitutet.se>
- HAVELAAR, A.H. (1993). Bacteriophages as models of human enteric viruses in the environment. *ASM News*, **59**, 614–619
- HAVELAAR, A.H., FURUSE, K., HOGEBOM, W.M. (1986). Bacteriophages and indicator bacteria in human and animal feces. *J. Appl. Bacteriol.* **60**, 255–262
- Haws, M. (2002). The Basics of Pearl Farming: A Layman's Manual. *Center for Tropical and Subtropical Aquaculture Publication* **127**, 1-79
- HAZEN, T.C., TORNAZOS, G.A. (1990). Tropical source water. In: *Drinking Water Microbiology* (G.A. McFeters, Hrsg.), Springer Verlag, New York, USA, 32-54
- HELLER, D., GILL, O.N., RAYNHAM, E., KIRKLAND, T., ZADICK, P.M., STANWELL-SMITH, R. (1986). An outbreak of gastrointestinal illness associated with consumption of raw depurated oysters. *Br. Med. J.* **292**, 1726-1727
- HERNÁNDEZ, F., MONGE, R., JIMÉNEZ, C., TAYLOR, L. (1997). Rotavirus and Hepatitis A virus in market lettuce (*Latuca sativa*) in Costa Rica. *Intern. J. Food Microbiol.* **37**, 221–223
- HIRSH, D.C. (1999a). *Family Enterobacteriaceae*. In: HIRSH, D.C., ZEE, Y.C *Veterinary Microbiology*. Blackwell Science Ltd., 65-68
- HIRSH, D.C. (1999b). *Pseudomonas*. In: HIRSH, D.C., ZEE, Y.C *Veterinary Microbiology*. Blackwell Science Ltd., 100-101

HIRSH, D.C. (1999c). *Salmonella*. In: HIRSH, D.C., ZEE, Y.C Veterinary Microbiology. Blackwell Science Ltd., 75-79

HOEHNE, M., SCHREIER, E. (2004). Detection and characterization of norovirus outbreaks in Germany: application of a one-tube RT-PCR using a fluorogenic real-time detection system. *J Med Virol.* **72**, 312-319

HOLLINGER, F.B., EMERSON, S.U. (2001). Hepatitis A-virus. In: D.M. KNIPE and P.M. HOWLEY (Hrsg.), *Field's Virology* (4th ed.), Lippincott/Williams & Wilkins, Philadelphia, 799–840

HOT, D., LEGEAY, O., JACQUES, J., GANTZER, C., CAUDRELIER, Y., GUYARD, K., LANGE, M. ANDREOLETTI, L. (2003). Detection of somatic phages, infectious enteroviruses and enterovirus genomes as indicators of human enteric viral pollution in surface water. *Water Res.* **37**, 4703–4710

HSU, F.C., SHIEH, Y.S., SOBSEY, M.D. (2002). Enteric bacteriophages as potential fecal indicators in ground beef and poultry meat. *J. Food Prot.* **65**, 93–99

HUMPHREY, T.J., MARTIN, K. (1993). Bacteriophage as models for virus removal from Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) during re-laying. *Epidemiol. Infect.* **111**, 325–335

HUSS, H.H. (Hrsg.) (1995). Quality and quality changes in fresh fish. *FAO Fisheries technical Paper*, **348**, FAO, Rome

HUSSAIN, Z., DASB, B.C., HUSAIN, S.A., ASIMA, M., CHATTOPADHYAY, S., MALIK, A., POOVORAWAN, A. (2005). Hepatitis A-viral genotypes and clinical relevance: clinical and molecular characterization of Hepatitis A-virus isolates from northern India. *Hepatol. Res.* **32**, 16–24

IAWPRC Study Group on Health Related Water Microbiology (1991). Bacteriophages as model viruses in water quality control. *Water Res.* **25**, 529–545.

IBELGAUFTS, H. (1993). *Gentechnologie von A bis Z*. VCH Verlagsgesellschaft mbH Weinheim

ICMSF, International Commission on Microbiological Specifications for Foods (1986). *Microorganisms in foods*. Vol. 2 Sampling for microbiological analysis: Principles and specific applications

Internet: <http://www.icmsf.iit.edu/pdf/icmsf2.pdf>

ICMSF, International Commission on Microbiological Specifications for Foods (1996a). Kap. 14, *Salmonellae*. In: *Microorganisms in Foods. Microbiological Specifications of Food Pathogens*, 1st Ed. Chapman & Hall, London, UK, 217-264

ICMSF, International Commission on Microbiological Specifications for Foods (1996b). Kap. 7, Intestinally Pathogenic *Escherichia coli*. In: Microorganisms in Foods. Microbiological Specifications of Food Pathogens, 1st Ed. Chapman & Hall, London, UK, 126-140

INAL, T., HILDEBRANDT, G., HILDEBRANDT, U. (1973). Kontamine deniz suyu ve ürünlerinde Clostridium perfringens'in mevcudiyeti üzerine arařtırmalar. Türk Hijyen Ve Tecrübi Biyoloji Dergisi 33, 27-43

INNIS, M.A., GELFAND, D.H. (1990). Optimization of PCRs. In: INNIS, M.A., GELFAND, D.H. SMINSKY, J.J., WHITE. T.J. (Hrsg). PCR protocols: a guide to methods and applications. San Diego: Academic Press

INOUE, S., YAMASHITA, K., YAMADERA, S., YOSHIKAWA, M., KATO, N., OKABE, N. (2000). Surveillance of viral gastroenteritis in Japan: pediatric cases and outbreak incidents. *J. Infect. Dis.* **181**, 270-274

International Organization For Standardization (2005). ISO/TS 16649-3:2005. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of beta-glucuronidase-positive *Escherichia coli* - Part 3: Most probable number technique using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-glucuronide. ISO, Geneva, Switzerland

Internet: <http://www.iso.org>

International Organization For Standardization (2006). International Standard ISO/IEC 17025:2005 Technical Corrigendum. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. ISO, Geneva, Switzerland

Internet: <http://www.iso.org>

JAY, J.M. (1996). Seafoods. Modern food microbiology (5th Ed.), Chapman & Hall, New York, 118-130

JIANG, S.C., CHU, W. (2004). PCR detection of pathogenic viruses in southern California urban rivers. *J. Appl. Microbiol.* **97**, 17-28

JOFRE, J., OLLE, E., RIBAS, F., VIDAL, A., LUCENA, F. (1995). Potential usefulness of bacteriophages that infect *Bacteroides fragilis* as model organisms for monitoring virus removal in drinking water treatment plants. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 3227-3231

KAGEYAMA, T., SHINOHARA, M., UCHIDA, K., FUKUSHI, S., HOSHINO, F.B., KOJIMA, S., TAKAI, R., OKA, T., TAKEDA, N., KATAYAMA, K. (2004). Coexistence of multiple genotypes, including newly identified genotypes, in outbreaks of gastroenteritis due to Norovirus in Japan, *J. Clin. Microbiol.* **42**, 2988-2995

KAPIKIAN, A.Z., WYATT, R.G., DOLIN, R. (1972). Visualization of 27 nm particle associated infectious nonbacterial gastroenteritis. *J Virol.* ; **10**, 1075

KAPLAN, J.E., FELDMAN, R., CAMPBELL, D.S., LOOKABAUGH, C., GARY, G.W. (1982). The frequency of a Norwalk-like pattern of illness in outbreaks of acute gastroenteritis. *Am. J. Public Health*, **72**, 1329-1932

KARST, S.M., WOBUS, C.E., LAY, M., DAVIDSON, J., VIRGIN, H.W. (2003). STAT1-dependent innate immunity to a Norwalk-like virus. *Science*. **299**, 1575–1578

KATAYAMA, K., SHIRATO-HORIKOSHI, H., KOJIMA, S., KAGEYAMA, T., OKA, T., HOSHINO, F., FUKUSHI, S., SHINOHARA, M., UCHIDA, K., SUZUKI, Y., GOJOBORI, T., TAKEDA, N. (2002). Phylogenetic analysis of the complete genome of 18 Norwalk-like viruses. *Virology* **299**, 225-239

KAYSER, F.H. (1993). Erreger bakterieller Infektionen. In: F.H. KAYSER, K.A. BIENZ, J. ECKERT, J. LINDENMANN (Hrsg.): Medizinische Mikrobiologie, Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, 8. Auflage, Kap.4, 152-274

KHAN, M.A., PARRISH, C.C., SHAHIDI, F. (2005). Enumeration of total heterotrophic and psychrotrophic bacteria using different types of agar to evaluate the microbial quality of blue mussels (*Mytilus edulis*) and sea scallops (*Placopecten magellanicus*). *Food Res. Intern.* **38**, 751-758

KINNE, O. (1991). Aquakultur und die Ernährung von Morgen. In: HEMPEL, G. (Hrsg.): Biologie der Meere. Spektrum der Wissenschaft: Verständliche Forschung, Heidelberg, Berlin, New York, Spektrum Akademischer Verlag, 188-197

KREIKENBROCK, L., SCHACH, S. (2005). Epidemiologische Methoden. 4. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag

KRUGMAN, S., GILES, J.P., HAMMOND, J. (1967). Infectious hepatitis. Evidence for two distinctive clinical, epidemiological, and immunological types of infection, *JAMA* **200**, 365–373

KRUSE, H., BROWN, D., LEES, D., LE GUYADER, S., LINDGREN, S., KOOPMANS, M., MARCI, A., VON BONSDORFF, C.H. (2002). Opinion of the Scientific Committee on Veterinary Measures relating to Public Health on Norwalk-like Viruses. European Commission, Directorate C-Scientific Opinions. C2- Management of Scientific Committees; Scientific Co-Operation and Networks

KÜNKEL, U., SCHREIER, E. (2002). Caliciviren. Virale Auslöser akuter Gastroenteritiden. *Bundesgesundheitsblatt* **45**, 534-542

- KURITSKY, J.N., OSTERHOLM, M.T., KORLATH, J.A., WHITE, K.E., KAPLAN, J.E. (1985). A statewide assessment of the role of Norwalk virus in outbreaks of food-borne gastroenteritis, *Journal of Infectious Diseases* **151**, 568
- LABBE, R. (1989). *Clostridium perfringens*. In: DOYLE, M. P. (Hrsg.): Foodborne bacterial pathogens. Marcel Dekker Inc. New York, New York, 191-234
- LEE, P.G., TURK, P.E. (1998). Overview of a modern, shore-based hatchery for offshore mariculture support. In: STICKNEY, R. R. (Hrsg.): Joining forces with industry-open ocean aquaculture, proceedings of the third annual international conference, May 10-15, Corpus Christi, Texas. TAMU-SG-99-103, Corpus Christ, Texas Sea Grant College Program, 87-102
- LEES, D. (2000). Viruses and bivalve shellfish. *Int. J. Food Microbiol.* **59**, 81-116
- LEMON, S.M. (1997). Type A viral hepatitis: epidemiology, diagnosis and prevention. *Clinical Chemistry* **43**, 1494-1499
- LODDER-VERSCHOOR, F., DE RODA HUSMAN, A.M., VAN DEN BERG, H.H.J.L., STEIN, A., VAN PELT-HEERSCHAP, H.M.L., VAN DER POEL, W.H.M. (2005). Year-round screening of noncommercial and commercial oysters for the presence of human pathogenic viruses. *J. Food Protect.* **68**, 1853-1859
- LONGO, M.C., BERNINGER M.S., HARTLEY, J.L. (1990). Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions, *Gene* **93**, pp. 125–128
- LOPMAN, B.A., REACHER, M.H., DUIJNHOVEN, Y.V., HANON, F., BROWN, D., KOOPMANS, M. (2003). Viral gastroenteritis outbreaks in Europe, 1995-2000. *Emerg. Infect. Dis.* **9**, 90-96
- LUCENA, F., LASOBRAS, J., MCINTOSH, D., FORCADELL, M., JOFRE, J. (1994). Effect of distance from the polluting focus on relative concentrations of *Bacteroides fragilis* phages and coliphages in mussels. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 2272–2277
- MÄDE, D. (2005). Viren in Lebensmitteln. Aktueller Stand der Diagnostik. *Fleischwirtschaft* **6**, 96-100
- MÄDE, D., KAHLE, S., TRÜBNER, K. (2005). Detection of norovirus in food and environmental samples by RT-PCR-application in routine diagnostics. *Arch. Lebensmittelhyg.* **56**, 8-13
- MÄDE, D., REITING, R., DREIER, J., HEUN-MÜNCH, B., LOSS, U., HAGEN, M., BURKHARDT, S., SCHRADER, CH., BECKER, B. (2006). Nachweis von Noroviren in Umgebungsproben. Ergebnisse eines Ringversuchs zur Methodenentwicklung. *Arch. Lebensmittelhyg.* **57**, 29-35

- MANUCCI, P.M. (1992). Outbreak of Hepatitis A among Italian patients with haemophilia. *The Lancet* **339**, 819
- MARTIN, A., LEMON, S.M. (2006). Hepatitis A-virus: from discovery to vaccines, *Hepatology* **43**, 164–172
- MARTIN, A., ESCRIOU, N., CHAO, S.F., LEMON, S.M., GIRARD, M., WYCHOWASKI, C. (1995). Identification and site-directed mutagenesis of the primary (2A/2B) cleavage site of the Hepatitis A-virus polyprotein: functional impact on the infectivity of HAV transcripts. *Virology* **213**, 213–222
- MARTINEZ-URTAZA, J., SACO, M., DE NOVOA, J., PEREZ-PIÑEIRO, P., PEITEADO, J., LOZANO-LEON, A., GARCIA-MARTIN, O. (2004). Influence of environmental factors and human activity on the presence of *Salmonella* serovars in a marine environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 2089-2097
- MATHERS, N.F (1974). Some comparative aspects of filter-feeding in *Ostrea edulis* L. and *Crassostrea angulata* (Lam.). *Proc. malac. Soc. Lond.* **41**, 89-97
- MATSUI S.M., GREENBERG, H.B. (2000). Immunity to Calicivirus infection. *J. Infect. Dis.* **181**, 331–335
- MATTHIESSEN, G.C. (2001). Oyster Culture in Western Europe. In: Oyster Culture, Kap. 8, Fishing News Books, 1. Auflage, Wiley-Blackwell
- MEAD, P.S., SLUTSKER, L., DIETZ, V., MCCRAIG, L.F., BREESE, J.S., SHAPIRO, C., GRIFFIN, P.M., TAUXE, R.V. (1999). Synopsis. Food related illness and death in the United States. *Emerg. Infect. Dis.* **5**, 607-625
- MIESCIER, J.J., HUNT, D.A., REDMAN, J., SALINGER, A., LUCUS, J.P. (1992). Molluscan oysters, mussels and clams. In: C. VANDERZANT and D.F. SPLITTSTOESSER (Hrsg.) Compendium of methods for the microbiological examination of foods (3rd Ed.). American Public Health Association Inc. Washington DC, 897-918
- MODROW, S., FALKE, D., TRUYEN U. (2003a). Caliciviren. In: Molekulare Virologie, Kap. 14.6, 2. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg-Berlin
- MODROW, S., FALKE, D., TRUYEN U. (2003b). Picornaviren. In: Molekulare Virologie, Kap. 14.1, 2. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg-Berlin
- MUNIAIN-MUJIKA, I., CALVO, M., LUCENA, F., GIRONES, R. (2002). Comparative analysis of viral pathogens and potential indicators in shellfish. *Intern. J. Food Microbiol.* **83**, 75-85
- MUNIESA, M., JOFRE, J. (2004). Factors influencing the replication of somatic coliphages in the water environment. *Antonie Van Leeuwenhoek J. Microbiol.* **86**, 65–76

- NAINAN, G.L., MARGOLIS, H.S., ROBERTSON, B.H., BALAYAN, M., BRINTON, M.A. (1991). Sequence analysis of a new Hepatitis A-virus naturally infecting cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*). *J. Gen. Virol.* **72**, 1685–1689
- NAINAN, G.L., XIA, G., VAUGHAN, G., MARGOLIS, H.S. (2006). Diagnosis of Hepatitis A-virus infection: a molecular approach, *Clin. Microbiol. Rev.* **19**, 63–79
- NAOUMOV, N.V. (2007). Liver infections Hepatitis A and E. *Medicine* Vol. **35**, **1**, Liver disorder Part 1 of 2, 35-38
- NAOUMOV, N.V. (2003). Hepatitis viruses, including TTV. In: D. WARRELL, T. COX, J. FIRTH and E. BENZ (Hrsg.), *Oxford textbook of medicine* (4th ed), Oxford University Press, Oxford, 414-419
- NELSON, K.L., CISNEROS, B.J., TCHOBANOGLOUS, G., DARBY, J.L. (2004). Sludge accumulation, characteristics, and pathogen inactivation in four primary waste stabilization ponds in central Mexico. *Water Res.* **38**, 111–127
- Newell, R.I.E., Langdon, C.J. (1996). Mechanisms for physiology of larval and adult feeding. In: *The Eastern Oyster, Crassostrea virginica*. V. S. Kennedy, R. I. E. Newell and A. F. Able (Hrsg.), 75–169. 1st edition, Maryland Sea Grant College, Maryland, USA
- NYGÅRD, K., ANDERSSON, Y., LINDKVIST, P., ANCKER, C., ASTEBERG, I., DANNETUN, E., EITREM, R., HELLSTRÖM, L., INSULANDER, M., SKEDEBRANT, L., STENQVIST, K., GIESECKE, J. (2001). Imported rocket salad partly responsible for increased incidence of Hepatitis A cases in Sweden, 2000–2001. *Euro Surveillance* **6** (10), 151–153
- OLIVER, S.L., DASTJERDI, A.M., WONG, S., EL-ATTAR, L., GALLIMORE, C., BROWN, D.W.G., GREEN, J., BRIDGER, J.C. (2003). Molecular characterization of bovine enteric caliciviruses: a distinct third genogroup of norovirus (Norwalk-like viruses) unlikely to be of risk to humans. *J. Virol.* **77**, 2789–2798
- OSAWA, S., FURUSE, K., WATANABE, I. (1981). Distribution of ribonucleic acid coliphages in animals. *Appl. Environ. Microbiol.* **41**, 164–168
- PARRINO, T.A., SCHREIBER, D.S., TRIER, J.S. (1977). Clinical immunity in acute gastroenteritis caused by Norwalk agent. *N. Engl. J. Med.* **297**, 86–89
- PAYMENT, P., FRANCO, E. (1993). *Clostridium perfringens* and somatic coliphages as indicators of the efficacy of drinking water treatment for viruses and protozoan cysts. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 2418-2424
- PERRET, K., KUDESIA, G. (1995). Gastroenteritis associated with oysters. *Commun. Dis Rep.* **5**, 141-156

PILLAI, S.D, NAWCHUKU, N. (2000). Field testing of coliphage methods for screening groundwater for fecal contamination. *Proc. Am. Water Qual. Technol. Conf.* Salt Lake City, UT, USA

POTASMAN, I., PAZ, A., ODEH, M. (2002). Infectious outbreaks associated with bivalve shellfish consumption: a worldwide perspective. *Clin. Infect. Dis.* **35**, 921-928

POURCHER, A.M., DEVRIESE, L.A., HERNANDEZ, J.F., DELATTRE, J.M. (1991). Enumeration by a miniaturized method of *Escherichia coli*, *Streptococcus bovis*, and enterococci as indicators of the origin of fecal pollution of waters. *J. Appl. Bacteriol.* **70**, 525-530

PUIG, A., QUERALT, N., JOFRE, J., ARAUJO, R. (1999). Diversity of *Bacteroides fragilis* strains in their capacity to recover phages from human and animal wastes and from fecally polluted wastewater. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 1772-1776

RANA, K.J. (1997). Aquatic environments and use of species subgroups. In: Review of the state of word aquaculture. FAO Fisheries Circular FIRI/C886 (Rev. 1), Rome, Food and Agriculture Organisation (FAO), 7-16

REMANE, A. STORCH, V., WELSCH, U. (1986), Mollusca. In: System. Zoologie, Kap. 4, 3. Aufl. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart-New York

RICHARDS, G.P., WATSON, M.A., FANKHAUSER, R.L., MONROE, S.S. (2004). Genogroup I and II noroviruses detected in stool samples by real-time reverse transcription PCR using highly degenerate universal primers. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 7179-7184

ROBERTSON, B.H., KHANNA, B., NAINAN, O.V., MARGOLIS, H.S. (1991). Epidemiologic patterns of wild-type Hepatitis A-virus determined by genetic variation, *J. Infect. Dis.* **163**, 286-292

ROBERTSON, B.H., JANSEN, R.W., KHANNA, B., TOTSUKA, A., NAINAN, O.V., SIEGL, G., WIDELL, A.M., MARGOLIS, H.S., ISOMURA, S., ITO, K., ISHIZU, T., MORITSUGU, Y., LEMON, S.M. (1992). Genetic relatedness of Hepatitis A-virus strains recovered from different geographical regions, *J. Gen. Virol.* **73**, 1365-1377

ROBERT-KOCH-INSTITUT (2002), Salmonellose, RKI Ratgeber Infektionskrankheiten-Merkblätter für Ärzte. Aktualisierte Fassung vom Dezember 2002; Erstveröffentlichung im *Epidem. Bulletin* **01/1997**

ROBERT-KOCH-INSTITUT (2004). Erkrankungen durch Noroviren in Deutschland in saisonaler Darstellung von 2001-2004. *Epidem. Bulletin* **36**

ROBERT-KOCH-INSTITUT (2005). Zur Situation der Hepatitis A-in Deutschland, 2004, *Epidem. Bulletin* **14**

- ROBERT-KOCH-INSTITUT (2006). Hepatitis A. RKI Ratgeber Infektionskrankheiten-Merkblätter für Ärzte, Erstveröffentlichung im *Epidem. Bulletin* **27/1999**
- ROBERT-KOCH-INSTITUT (2007), Noroviren. RKI-Ratgeber Infektionskrankheiten-Merkblätter für Ärzte, Erstveröffentlichung im *Epidem. Bulletin* **4/2000**
- RÖNNEBÄCK, P. (2001): Shrimp aquaculture-state of the art. Swedish EIA Centre, Report **1**. Swedish University of Agriculture Sciences (SLU), Uppsala
- ROSENBLUM, L.S., MIRKIN, I.R., ALLEN, D.T., SAFFORD, S., HADLER, S.C. (1990). A multifocal outbreak of Hepatitis A-traced to commercially distributed lettuce, *Am. J. Publ. Health* **80** (9), 1075–1080
- SAIKA, R.K. (1989). The design and optimization of the PCR. In: Ehrlich, H.A. PCR Technology, Principles and Applications for DNA Amplification. Stockton Press, New York
- SCHUBERT, R. (1992). *Aeromonas* und *Plesiomonas*. In: F. BURKHARDT (Hrsg.): Mikrobiologische Diagnostik. Verlag Thieme, Stuttgart, New York, 109-111
- SCHWARZ, B.A., BANGE, R., VAHLENKAMP, T.W., JOHNE, R., MÜLLER, H. (2002). Detection and quantitation of group A rotaviruses by competitive and real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *J. Virol. Meth.* **105**, 277-285
- SCOTT, T.M. (2002). Use of DNA fingerprinting and novel molecular methods to identify sources of *Escherichia coli* in the environment. Ph.D. thesis. University of Florida, Gainesville, FL, USA
- SENCKENBERG Forschungsinstitut und Naturmuseum (2007). Bioinvasion der Pazifischen Auster (*Crassostrea gigas*, Thunberg 1793), im Niedersächsischen Wattenmeer
Internet: http://www.senckenberg.de/root/index.php?page_id=1887
- SETHI, D., WHEELER, J., RODRIGUES, L.C., FOX, S., RODERICK, P. (1999). Investigation of underascertainment in epidemiological studies based in general practice. *Int. J. Epidemiol.* **28**, 106-112
- SOLO-GABRIELE, H.M., WOLFERT, M.A., DESMARIS, T.R., PALMER, C.J. (2000). Sources of *Escherichia coli* in a coastal subtropical environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 230-237
- TACON, A.G.J. (1998). Global trends in aquaculture and aquafeed production. In: *International Aquafeed Directory and Buyers' Guide 1997/1998*, Turret Rai Group PLC, Rickmansworth, UK, 5-37

TAYLOR, M.R. (1997). Molecular epidemiology of South African strains of Hepatitis A-virus: 1982–1996, *J. Med. Virol.* **51**, 273–279

TWORT, F.W. (1915). An investigation on the nature of ultra-microscopic viruses. *Lancet* **186**, 1241–1243

VAN REGENMORTEL, M.H.V., FAUQUET, C.M., BISHOP, D.H.L., CARSTENS, E., ESTES, M., LEMON, S., MANILOFF, J., MAYO, M.A., MCGEOCH, D., PRINGLE, C.R., WICKNER, R.B. (Hrsg.) (2000). Hepatitis A-In: Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. New York, San Diego Academic Press

VILLAR, L.M., LAMPE, E., MEYER, A., GASPAR, A.M. (2004). Genetic variability of Hepatitis A-virus isolates in Rio de Janeiro: implications for the vaccination of school children. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **37** 1779–1787

WARNER, R.D., CARR, R.W., MCCLESKEY, F.K., JOHNSON, P.C., ELMER, L.M., DAVISON, V.E. (1991). A large nontypical outbreak of Norwalk virus — gastroenteritis associated with exposing celery to nonpotable water and with *Citrobacter freundii*. *Archives of Internal Medicine* **151** (12), 2419–2424

WEHNER, R., GEHRING, W. (1995). *Mollusca* (Weichtiere). In: Zoologie, Kap. 12.8, 23. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York

WEHRMANN A., HERLYN, M., BUNGENSTOCK, F., HERTWECK, G., MILLAT, G. (2000): The distribution gap is closed - First record of natural settled pacific oysters *Crassostrea gigas* in the East Frisian Wadden Sea, North Sea. *Senckenbergiana marit.*, **30** (3/4): 153-160

WEHRMANN, A., SCHMIDT, A. (2005). Die Einwanderung der Pazifischen Auster in das Niedersächsische Wattenmeer: In: WWF Deutschland, 1. Aufl. Frankfurt am Main

WEN, Q., MCCLANE, B.A. (2004). Detection of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* type A isolates in american retail foods. *Appl. Environ. Microbiol.* **70** (5), 2685-2691

WHEELER, A.L., HARTEL, P.G., GODFREY, D.D., HILL, J.L., SEGARS, W.I. (2002). Potential of *Enterococcus faecalis* as a human faecal indicator for microbial source tracking. *J. Environ. Qual.* **31**, 1286-1293

WHO (2000). Hepatitis A-Vaccine. WHO position paper. *Weekly Epidemiological Record* **75**, 38-42

Internet: <http://www.who.int/vaccines/en/hepatitisa.shtml> (Stand 25.06.2007)

WHO (2003). WHO Surveillance Programme for Control of Foodborne Infections and Intoxications in Europe, Seventh Report 1993-1998. Hrsg.: BgVV – FAO/WHO Collaborating Centre for Research and Training in Food Hygiene and Zoonoses

Internet: http://www.bfr.bund.de/internet/7threport/7threp_ctryreps_fr.htm (Stand 27.11.2003)

WIDDOWSON, M.A., CRAMER, E., HADLEY, L., BRESEE, J., BEARD, R.S., BULENS, S., CHARLES, M., CHEGE, W., ISAKBAEVA, E., WRIGHT, J., MINTZ, E., MESSWY, J., GLASS, R.I., MONROE, S.S. (2004). Outbreaks of acute gastroenteritis on cruise ships and on land: identification of a predominant strain of Norovirus (NV). *J. Infect. Dis.* **190**, 27-36

WIDELL, A., HANSSON B.G., MOESTRUP, T., NORDENFELT, E. (1983). Increased occurrence of Hepatitis A-with cyclic outbreaks among drug addicts in a Swedish community. *Infection* **11**, 198-200

WRIGHT, A.C., HILL, R.T., JOHNSON, J.A., ROGHMAN, M.-C., COLWELL, R.R., MORRIS JR., J.G. (1996). Distribution of *Vibrio vulnificus* in the Chesapeake Bay. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 717-724

Verordnung über die hygienischen Anforderungen an Fischereierzeugnisse und lebende Muscheln

Bundesgesetzbl. I 1994, S. 737, neugefasst durch Bek. v. 08.06.2000, I 819, zuletzt geändert durch Art. 1 V v. 02.04.2003 I 478

Richtlinie 79/923/EWG des Rates vom 30. Oktober 1979 über die Qualitätsanforderungen an Muschelgewässer

ABl. der RG Nr. L 281, 0047-0052

Richtlinie 91/492/EWG des Rates vom 15. Juli 1991 zur Festlegung von Hygienevorschriften für die Erzeugung und Vermarktung lebender Muscheln

ABl. der RG Nr. L 268, 0001-0014

Verordnung zur Durchführung von Vorschriften des gemeinschaftlichen Lebensmittelhygienerechts

Bundesgesetzbl. I Nr. 39 2007, S. 1891

Gesetz zur Verhütung und Bekämpfung von Infektionskrankheiten beim Menschen (Infektionsschutzgesetz-IfSG)

Bundesgesetzbl. I 2000, S. 1045, zuletzt geändert durch Art. 2 § 3 Abs. 4 G v. 1.09.2005 I 2618

Berichtigung der Richtlinie 2004/41/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 21. April 2004 zur Aufhebung bestimmter Richtlinien über Lebensmittelhygiene und Hygienevorschriften für die Herstellung und das Inverkehrbringen von bestimmten Erzeugnissen tierischen Ursprungs sowie zur Änderung der Richtlinien 89/662/EWG und 92/118/EWG des Rates und der Entscheidung 95/408/EG des Rates (ABl. L 157 vom 30.4.2004)

ABl. der EG Nr. L 195 S. 0012-0015

Berichtigung der VO (EG) NR. 854/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 29. April 2004 mit besonderen Verfahrensvorschriften für die amtliche Überwachung von zum menschlichen Verzehr bestimmten Erzeugnissen tierischen Ursprungs (Abl. L 139 vom 30.04.2004)

ABl. der EG Nr. L 226 S. 0083-0127

VO (EG) NR. 853/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 29. April 2004 mit spezifischen Hygienevorschriften für Lebensmittel tierischen Ursprungs

ABl der EG Nr. L 139 S. 0055-0205

VO (EG) NR. 2073/2005 der Kommission vom 15. November 2005 über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel zuletzt geändert durch VO (EG) NR. Nr. 1441/2007 der Kommission vom 5. Dezember 2007

ABl. der EG Nr. L 322 S. 0012-0029

Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch

Bundesgesetzbl. I 2006 S. 945

Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (Herausgeber). Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 Abs. 1 LFGB, Band I (Lebensmittel) ISBN 3-410-11220-0

Opinion of the scientific committee on veterinary measures relating to public health on Norwalk-like viruses (2002).

European Commission, Health & Consumer Protection Directorate-General

10 Anhang

10.1 Nährmedien und Reagenzien für die bakteriologische Untersuchung

10.1.1 Herstellung der Nährböden, Verwendung

Die Herstellung aller Nährböden erfolgt aus kommerziell erhältlichen Trockennährböden in Chargen zu je 1 Liter, Peptonwasser 5 Liter. Zur Herstellung wird dabei im Institut für Lebensmittel bereitetes, demineralisiertes Wasser verwendet. Die autoklavierten oder im Dampftopf sterilisierten Medien werden langsam im Wasserbad (eingestellt auf 47°C) auf 45-50°C abgekühlt und anschließend in sterile Petrischalen (90 mm Ø) mit einer Schichtdicke von ca. 2mm gegossen.

Jede Petrischale wird durch aufzuklebende Etiketten gekennzeichnet, das Etikett enthält das Herstellungsdatum sowie ein Kürzel für die Art des enthaltenden Mediums. Bei längerer Lagerung der Agarplatten wurden diese in verschlossenen Kunststoffbeuteln im Nährbodenkühlraum bei 4 +/- 2°C aufbewahrt.

Die Verwendung der Nährböden erfolgte erst nach Freigabe durch die Qualitätskontrolle (Überprüfung von pH Wert, Schichtdicke, Gelstabilität, Blasenbildung, Farbe und Sterilität). Direkt vor der Verwendung erfolgte eine Vortrocknung der Platten. Sie wurden entweder bei Raumtemperatur oder im Brutschrank bei 42°C für etwa 15 min vortrocknet. Nach dem Beimpfen wurden die Platten dann, entsprechend der jeweiligen Arbeitsanweisung, mit der Bodenseite nach oben inkubiert. Dabei wurden nicht mehr als 10 Platten übereinander gestapelt.

10.1.2 Nähr- und Differenzierungsmedien für die bakteriologischen Untersuchungen

10.1.2.1 Peptonwasser, gepuffert

- Zur Voranreicherung von Bakterien, insbesondere von *Enterobacteriaceae*, aus Lebensmitteln und anderem Untersuchungsmaterial
- Zusammensetzung (g/l):
 - Pepton 10,00
 - Natriumchlorid 5,00
 - Dinatriumhydrogenphosphat 3,50
 - Kaliumdihydrogenphosphat 1,50
- Zubereitung:
 - 20 g Peptonwasser, gepuffert, in 1,0 l demineralisiertem Wasser auf dem Magnetrührer suspendieren
 - 15 min bei 121°C autoklavieren
 - das Medium wird immer in Chargen von 5,0 l hergestellt
- gebrauchsfertiges Peptonwasser ist hellbraun und klar, pH 7,2 +/- 0,2
- Validierung: das beschriebene Verfahren entspricht sachlich der Methode gem. L 00.00 – 20 der amtlichen Sammlung nach § 64 LFGB
- Wirkungsweise: Das Nährstoffangebot des Mediums ermöglicht eine hohe Wiederbelebungsrate von Zellen, die z.B. während der Lebensmittelkonservierung subletal geschädigt wurden
- Bebrütung: 16-20 h bei 37°C

10.1.2.2 Peptonwasser mit Agarzusatz (PW)

- Verdünnungslösung
- Zusammensetzung (g/l):
 - Pepton aus Casein, tryptisch 1,00
 - Natriumchlorid 8,50
 - Agar-Agar 0,75
- Zubereitung:
 - die Nährbodenbestandteile werden in der jeweiligen Menge in demineralisiertem Wasser auf dem Magnetrührer suspendiert
 - 15 min bei 121°C autoklaviert
 - das Medium wird immer in Chargen von 5,0 l hergestellt, bei Abfüllen in Reagenzgläser wird es nochmals autoklaviert, danach erfolgt die pH-Kontrolle.
- gebrauchsfertiges Peptonwasser ist klar und farblos (bei Kühlung leicht getrübt), pH 7,0 +/- 0,2
- Validierung: das beschriebene Verfahren entspricht sachlich der Methode gem. L 06.00 – 16 der amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §64 LFGB

10.1.2.3 Plate-Count-Agar (PC)

- Nährboden zur Bestimmung der aeroben Keimzahl in Lebensmitteln
- Zusammensetzung (g/l):
 - Pepton aus Casein 5,00
 - Hefeextrakt 2,50
 - Glucose 1,00
 - Agar-Agar 14,00
- Zubereitung:
 - 22,5 g Trockennährboden werden in 1,0 l demineralisiertem Wasser auf Magnetrührer suspendiert
 - 15 min bei 121°C autoklavieren
- gebrauchsfertiger Nährboden ist klar und schwach gelblich bis farblos, pH 7,0 +/- 0,2
- Validierung: das beschriebene Verfahren entspricht sachlich der Methode gem. L 06.00 – 18 der amtlichen Sammlung nach §64 LFGB
- Wirkungsweise: hemmstoff- und indikatorfrei
- Bebrütung: 72 +/- 2 h bei 30°C

10.1.2.4 Lactobacillus-Agar nach De Man, Rogosa und Sharpe (MRS-Agar) (LA)

- Selektivagar zur Untersuchung von Lebensmitteln auf aerob wachsende Milchsäurebakterien
- Zusammensetzung (g/l):
 - Pepton aus Casein 10,00
 - Fleischextrakt 10,00
 - Hefeextrakt 4,00
 - D(+)-Glucose 20,00
 - di-Kaliumhydrogenphosphat 2,00
 - Tween 80 1,00
 - di-Ammoniumhydrogencitrat 2,00
 - Natriumacetat 5,00
 - Magnesiumsulfat 0,20
 - Mangansulfat 0,04
 - Agar-Agar 14,00
- Zubereitung:
 - 68,2 g Trockennährboden werden in 1,0 l demineralisiertem Wasser auf dem Magnetrührer suspendiert
 - 60 min bei 100°C im Dampftopf sterilisieren
- gebrauchsfertiger Nährboden ist klar und schwach gelblich bis farblos, pH 5,7 +/- 0,2
- Validierung: das beschriebene Verfahren entspricht sachlich der Methode gem. L 06.00 – 35 der amtlichen Sammlung nach § 64 LFGB
- Wirkungsweise: es sind die für Laktobazillen als spezielle Wachstumsfaktoren bekannten Substanzen Polysorbat, Acetat, Magnesium und Mangan enthalten. Da der Nährboden nur eine geringe Selektivität besitzt, können auch *Pediococcus*- und *Leuconostoc* Spezies sowie andere Begleitkeime wachsen
- Bebrütung: 48 +/- 2 h bei 30°C, aerob
- Kolonien sind klein, opak und weiß, Ø 1-3 mm
- die Begleitflora wächst nach Herstellerangaben als Mikrokolonien (Ø < 1 mm).

10.1.2.5 Sorbinsäure-Agar

- Selektivagar zur Untersuchung von Lebensmitteln auf aerob wachsende Milchsäurebakterien
- die Rezeptur entspricht, bis auf den Zusatz von 0,4 g Sorbinsäure je l Agar, der des MRS-Agar.
- der gebrauchsfertige Nährboden ist klar und schwach gelblich bis farblos, pH 5,0 +/- 0,2
- Bebrütung: 48 +/- 2 h bei 30°C, anaerob
- Kolonien sind klein opak und weiß, Ø 1-3 mm

10.1.2.6 Glutamat-Stärke-Phenolrot-Agar (GSP) (Pseudomonas-Aeromonas-Selektivagar nach Kielwein, Basis)

- Selektivagar zum Nachweis und zur Isolierung von Pseudomonaden und Aeromonaden in Lebensmitteln
- Zusammensetzung (g/l):
 - Stärke, löslich 20,00
 - Natrium-L(+)-glutamat 10,00
 - Kaliumdihydrogenphosphat 2,00
 - Magnesiumsulphat 0,50
 - Phenolrot 0,36
 - Penicillin-G-Natrium 100.000 I.E.
 - Agar-Agar 12,00
- Herstellung der Penicillin-G-Lösung: 1 Mio. I.E. Penicillin-G als Natrium- oder Kaliumsalz in 10 ml A. dest lösen und durch Filtration sterilisieren, Haltbarkeit: 2 Wochen bei 4-8°C, lichtgeschützt
- Zubereitung:
 - 45 g Trockennährboden werden in 1,0 l demineralisiertem Wasser auf dem Magnetrührer suspendiert
 - 15 min bei 121°C autoklavieren
 - dem auf ca. 50°C abgekühlten Nährboden 1 ml sterile Penicillin-G-Lösung zugeben, auf Magnetrührer mischen und gießen
- gebrauchsfertiger Nährboden ist opalescent und rot, pH 7,2 +/- 0,2
- Validierung: angegebene Zusammensetzung und Art und Weise der Herstellung entsprechen den Angaben des Herstellers der Fertigmischung (Merck)
- Wirkungsweise: die Nährgrundlage, Glutamat und Stärke, kann von vielen Begleitkeimen nicht verwertet werden. Durch die Zugabe von Penicillin wird die Selektivität weiter verbessert. Aeromonaden bauen Stärke unter Säurebildung ab – Umschlag des Indikators Phenolrot nach gelb (nicht bei Pseudomonaden)
- Bebrütung: 48 +/- 2 h bei 30°C
- Kolonien: Pseudomonaden: groß, Ø 2-3 mm, blauviolett, Umgebung rotviolett, Aeromonaden zwar ebenso groß aber gelb, Umgebung gelb

10.1.2.7 Bengalrot-Chloramphenicol-Agar (Rose-Bengal-Chloramphenicol) (RO)

- Selektivagar zum Nachweis und zur Isolierung von Hefen und Schimmelpilzen in Lebensmitteln
- Zusammensetzung (g/l):
 - Mycologisches Pepton 5,00
 - Glucose 10,00
 - di-Kaliumhydrogenphosphat 1,00
 - Magnesiumsulfat 0,50
 - Bengalrot 0,05
 - Agar-Agar 15,50
 - Chloramphenicol-Supplement: 50,00 mg je Röhrchen
- Zubereitung:
 - 32 g Trockennährboden werden in 1,0 l demineralisiertem Wasser auf dem Magnetrührer suspendiert
 - pro 500 ml Basisnährboden den Inhalt eines Röhrchens Chloramphenicol-Selektiv-Supplement (gelöst in 3 ml Ethanol) hinzufügen
 - 5 min bei 121°C autoklavieren
- gebrauchsfertiger Nährboden ist klar und pink, pH 7,2 +/- 0,2
- Validierung: das beschriebene Verfahren entspricht sachlich der Methode gem. L 06.00 – 37 der amtlichen Sammlung nach § 64 LFGB
- Wirkungsweise: das selektiv wirkende Chloramphenicol unterdrückt das Bakterienwachstum. Bengalrot kann von Hefen und Schimmelpilzen intrazellulär aufgenommen werden, dies erleichtert die Koloniezahlbestimmung vor allem kleiner Kolonien, weiterhin begrenzt Bengalrot die Größe von Schimmelpilzkolonien und verhindert so, dass langsamer wachsende Stämme überwuchert werden
- dieser Agar wird vor allem für frische, proteinhaltige Lebensmittel empfohlen, deren kontaminierende Flora hauptsächlich aus gram-negativen Stäbchen besteht
- Bebrütung: 96 +/- 2 h bei 25°C

10.1.2.8 Kristallviolett-Neutralrot-Galle-Glucose-Agar (Violet Red Bile Dextrose) (VRBD oder VG) nach Mossel

- Selektivagar zum Nachweis und zur Keimzahlbestimmung von *Enterobacteriaceae* in Lebensmitteln
- Zusammensetzung (g/l):
 - Pepton aus Fleisch 7,00
 - Hefeextrakt 3,00
 - Natriumchlorid 5,00
 - Glucose 10,00
 - Neutralrot 0,03
 - Gallensalzmischung 1,50
 - Kristallviolett 0,002
 - Agar-Agar 13,00
- Zubereitung:
 - 39,5 g Trockennährboden werden in 1,0 l demineralisiertem Wasser auf dem Magnetrührer suspendiert
 - 60 min bei 100°C im Dampftopf sterilisieren, auf dem Magnetrührer abkühlen lassen
- gebrauchsfertiger Nährboden ist klar und dunkelrot (beerenlila), pH 7,3 +/- 0,2
- Validierung: das beschriebene Verfahren entspricht sachlich der Methode gem. L 06.00 – 25 der amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §64 LFGB
- Wirkungsweise: Kristallviolett und Gallensalze hemmen weitgehend die Begleitflora. Der Abbau von Glucose unter Säurebildung wird durch einen Farbumschlag nach Rot und eventuell Ausfällung von Gallensäuren um die betreffenden Kolonien angezeigt. Da alle *Enterobacteriaceae* Glucose unter Säurebildung abbauen, sind sie auf diese Weise komplett erfassbar.
- Kolonien: rot mit rötlichem Präzipitathof
- Bebrütung: 48 +/- 2 h bei 30°C, anaerob

10.1.2.9 Kristallviolett-Neutralrot-Galle-Agar (Violet Red Bile Agar, VRB) nach Davis

- Selektivagar zum Nachweis und zur Keimzahlbestimmung von Coliformen Keimen in Lebensmitteln
- Zusammensetzung (g/l):
 - Pepton aus Fleisch 7,00
 - Hefeextrakt 3,00
 - Natriumchlorid 5,00
 - Lactose 10,00
 - Neutralrot 0,03
 - Gallensalzmischung 1,50
 - Kristallviolett 0,002
 - Agar-Agar 13,00
- Zubereitung:
 - 39,5 g Trockennährboden werden in 1,0 l demineralisiertem Wasser auf dem Magnetrührer suspendiert
 - 60 min bei 100°C im Dampftopf sterilisieren und auf dem Magnetrührer abkühlen lassen
- gebrauchsfertiger Nährboden ist klar und dunkelrot (beerenlila), pH 7,4 +/- 0,2
- Validierung: das beschriebene Verfahren entspricht sachlich der Methode gem. L 01.00 – 3 der amtlichen Sammlung nach §64 LFGB
- Wirkungsweise: Kristallviolett und Gallensalze hemmen weitgehend die Begleitflora. Der Abbau von Laktose unter Säurebildung wird durch einen Farbumschlag nach Rot und Ausfällung von Gallensäuren um die betreffenden Kolonien angezeigt.
- Kolonien:

Aussehen der Kolonien	Mikroorganismen
rot mit rötlichem Präzipitathof, Ø 1-2 mm	Lactose-positive <i>Enterobacteriaceae</i> , Coliforme und <i>E. coli</i>
Pinke, stecknadelspitzgroße Kolonien	Enterokokken, evtl. Klebsiellen
Farblos	Laktose-negative <i>Enterobacteriaceae</i>

- Bebrütung: 48 +/- 2 h bei 30°C, anaerob

10.1.2.10 Hirn-Herz Bouillon (BHI)

- Kulturmedium nach ROSENOW zur Anzucht zahlreicher, anspruchsvoller Keime wie Streptokokken, Pneumokokken und Meningokokken. Die Bouillon ist insbesondere für die Anzucht von Staphylokokken, bei denen ein Koagulase-Test durchgeführt werden soll, geeignet.
- Zusammensetzung (g/l):
 - Nährsubstrat (Hirn-Extrakt, Herz-Extrakt und Peptone) 27,5
 - D(+)-Glucose 2,00
 - Natriumchlorid 5,00
 - Dinatriumhydrogenphosphat 2,50
- Zubereitung:
 - 37 g BHI-Basis werden in 1,0 l demineralisiertem Wasser auf dem Magnetrührer suspendiert
 - 15 min bei 121°C autoklavieren
- die gebrauchsfertige Bouillon ist klar und braun, pH 7,4±0,2
- Validierung: das beschriebene Verfahren entspricht sachlich der Methode gem. L 06.00 – 22 der amtlichen Sammlung nach § 64 LFGB
- Bebrütung: 24-48 h bei 37°C, aerob

10.1.2.11 Baird-Parker-Nährboden-Basis (Staphylokokken Selektivagar Basis nach BAIRD-PARKER)

- Selektivagar zum Nachweis und zur Keimzahlbestimmung von Staphylokokken in Lebensmitteln
- Zusammensetzung (g/l):
 - Pepton aus Casein 10,0
 - Fleischextrakt 5,00
 - Hefeextrakt 1,00
 - Natriumpyruvat 10,0
 - Glycine 12,0
 - Lithiumchlorid 5,00
 - Agar-Agar 15,0
 - Eigelb-Tellurit Emulsion 50 ml
- Zubereitung:
 - 58 g Baird-Parker-Nährbodenbasis werden in 0,95 l demineralisiertem Wasser auf dem Magnetrührer suspendiert
 - 15 min bei 121°C autoklavieren
 - nach dem Abkühlen auf 45-50°C Eigelb-Tellurit Emulsion zufügen
- der gebrauchsfertige Nährboden ist opalescent und gelblich-braun, pH 6,8 +/- 0,2
- Validierung: das beschriebene Verfahren entspricht sachlich der Methode gem. L 06.00 – 22 der amtlichen Sammlung nach § 64 LFGB
- Wirkungsweise: Lithiumchlorid und Tellurit hemmen das Wachstum der Begleitflora während Pyruvat und Glycine das Wachstum der Staphylokokken stimulieren.
- Wachstum: Staphylokokken, die auf diesem Medium wachsen, zeigen zwei typische Charakteristika:
 1. charakteristische Höfe und Ringe werden infolge der Lipolyse und Proteolyse rund um die Kolonie ausgebildet
 2. die Reduktion von Tellurit zu Tellurium führt zu einer Schwarzfärbung der Kolonien
- die Eigelb- und Telluritreaktion findet sich im Allgemeinen parallel zu einer positiven Koagulase-Reaktion und kann so als Indikator für Letztere dienen.
- Bebrütung: 24-48 h bei 37°C, aerob

10.1.2.12 PALCAM Listeria Nährboden Basis (PALCAM Listeria Selektiv Agar Basis nach VAN NETTEN et al.)

- Medium nach VAN NETTEN et al. (1989) zur Detektion, Isolation, Selektion und Differenzierung von *Listeria monocytogenes* aus Stuhlproben, Lebensmittelproben und stark kontaminierten Umgebungsproben.
- Zusammensetzung (g/l):
 - Pepton 23,0
 - Hefeextrakt 3,00
 - Stärke 1,00
 - Natriumchlorid 5,00
 - Agar-Agar 13,0
 - D(-)mannitol 10,0
 - Ammonium Eisen (III) Citrat 0,50
 - Esculin 0,80
 - Glucose 0,50
 - Lithiumchlorid 15,0
 - Phenolrot 0,08
- PALCAM Listeria Selektiv Supplement nach VAN NETTEN et al. (mg/Einheit):
 - Polymixin-B-Sulfat 5,00
 - Ceftadizim 10,0
 - Acriflavin 2,50
- Zubereitung:
 - 35,9 g PALCAM Listeria-Nährbodenbasis in 0,5 l demineralisiertem Wasser auf dem Magnetrührer suspendieren
 - 15 min bei 121°C autoklavieren
 - den Inhalt einer Einheit PALCAM Listeria Selektiv Supplement nach VAN NETTEN et al. in 1 ml sterilem, demineralisiertem Wasser lösen, zu dem auf 50°C abgekühlten Medium geben und auf dem Magnetrührer verteilen
- der gebrauchsfertige Nährboden ist klar und dunkelrot, pH 7,2 +/- 0,2
- Validierung: das beschriebene Verfahren entspricht sachlich der Methode gem. L 00.00 – 22 der amtlichen Sammlung nach § 64 LFGB
- Wirkungsweise: PALCAM Agar gewährleistet eine quantitative Kultivierung von *Listeria monocytogenes* während gleichzeitig die gram-negative und der Großteil

der gram-positiven Begleitflora gehemmt werden. Die Selektivität des Mediums resultiert aus den Inhaltsstoffen Polymixin, Acriflavin, Ceftazidim und Lithiumchlorid. *L. monocytogenes* verstoffwechselt das im Medium enthaltene Aesculin zu Glucose und Aesculetin. Aesculetin formt mit Eisen(III)-Ionen olivgrüne bis schwarze Komplexe welche dann den Kolonien eine charakteristische Färbung verleihen. Mannitol-positive Begleitflora (Enterokokken, Staphylokokken) wächst als gelbe Kolonien, wenn sie nicht gehemmt werden.

- Wachstum: *L. monocytogenes* wächst als grau-grüne Kolonie mit einem schwarzen Hof rund um die Kolonie. Wenn die Kolonien sehr dicht beieinander liegen, erscheint der gesamte Agar schwarz-braun.
- Bebrütung: 48 +/- 2 h bei 37°C, aerob

10.1.2.13 *Listeria*-Anreicherungs Nährboden (TSYEA)

- Medium zur Anreicherung von *Listeria* spp. aus Milch und Milchprodukten sowie anderen Lebensmitteln.
- Zusammensetzung (g/l):
 - Caseinpepton-Sojamehlpepton-Lösung (CASO-Bouillon) 30,0
 - Hefeextrakt 6,00
 - Agar-Agar 16,0
- Zubereitung:
 - 36 g TSYEB-Trockennährboden und 16 g Agar-Agar in 1,0 l demineralisiertem Wasser auf dem Magnetrührer suspendieren
 - 15 min bei 121°C autoklavieren
- der gebrauchsfertige Nährboden ist klar und hellgelb, pH 7,3 +/- 0,2
- Validierung: das beschriebene Verfahren entspricht sachlich der Methode gem. L 00.00 – 22 der amtlichen Sammlung nach § 64 LFGB
- Bebrütung: 20-24 h bei 37°C, aerob

10.1.2.14 Citrate Azide Tween Carbonate (CATC) Nährboden-Basis (CATC Selektivagar Basis nach BURKWALL und HARTMANN (1964) modifiziert durch REUTER (1968))

- Medium zur Identifikation von Enterokokken in Lebensmitteln
- Zusammensetzung (g/l):
 - Pepton aus Casein 15,0
 - Hefeextrakt 5,00
 - Kaliumdihydrogenphosphat 5,00
 - Natriumcitrat 15,0
 - Polysorbat 80 (Polyoxyethylen(20)-sorbitanmono-Oleat) (Tween 80) 1,00
 - Agar-Agar 15,0
- Zusätzlich:
 - Natriumcarbonat 2,00
 - 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid 0,10
 - Natriumacid 0,40
- Zubereitung:
 - 56 g Baird-Parker-Nährbodenbasis in 1,0 l demineralisiertem Wasser auf dem Magnetrührer suspendieren
 - 15 min bei 121°C autoklavieren
 - 20 ml einer 10%igen Natriumcarbonat-Lösung, 10 ml einer 1%igen 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid-Lösung und 4 ml einer 10%igen Natriumacid-Lösung (alle Lösungen filtersterilisiert) zu dem auf 50°C abgekühlten Medium hinzufügen und auf dem Magnetrührer verteilen
- der gebrauchsfertige Nährboden ist klar und hellgelb, pH 7,0 +/- 0,2
- Validierung: das beschriebene Verfahren entspricht sachlich der Methode gem. L 06.00 – 32 der amtlichen Sammlung nach § 64 LFGB
- Wirkungsweise: Die hohen Konzentrationen von Citrat und Acid hemmen das Wachstum einer mikrobiellen Begleitflora nahezu vollständig. Enterokokken reduzieren das farblose 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid zu rotem Formazan, was zur Rotfärbung der Kolonien führt.
- Wachstum: *Ent. faecalis*, *Ent. faecium*, *Str. zymogenes* und *Str. liquefaciens* wachsen als rote Kolonien. Begleitkeime wachsen als farblose Kolonien.
- Bebrütung: 24 h bei 37°C, aerob

10.1.2.15 Fluorocult ECD Agar (*E. coli* Direct Agar)

- Zusammensetzung (g/l):
 - Pepton aus Casein 20,0
 - Lactose 5,00
 - Natriumchlorid 5,00
 - Gallensalze 1,50
 - Di-Kaliumhydrogenphosphat 4,00
 - Kaliumdihydrogenphosphat 1,50
 - Agar-Agar 15,0
 - Tryptophan 1,00
 - 4-methylumbelliferyl- β -D-glucuronid 0,07
- Zubereitung:
 - 55,1 g ECD-Nährbodenbasis in 1,0 l demineralisiertem Wasser auf dem Magnetrührer suspendieren
 - 15 min bei 121°C autoklavieren
- der gebrauchsfertige Nährboden ist klar und gelblich-braun, pH 7,0 +/- 0,2
- Validierung: das beschriebene Verfahren entspricht sachlich der Methode gem. L 06.00 – 36 der amtlichen Sammlung nach § 64 LFGB
- Wirkungsweise: Die Gallensalzmischung hemmt weitestgehend das Wachstum einer mikrobiellen Begleitflora. Durch das Vorliegen einer Fluoreszenz unter UV-Licht und einer positiven Indol-Reaktion kann *E. coli* unter anderen Kolonien identifiziert werden.
- Identifikation: *E. coli* fluoresziert unter der UV-Lampe hellblau. Zur Bestätigung werden die verdächtigen Kolonien mit 10-20 μ l Kovacs Indol-Reagenz überschichtet. Eine Rotfärbung nach 2-10 Sekunden zeigt die Indolbildung.
- Bebrütung: 18-24 h bei 44°C, aerob

10.1.2.16 Glutamat-Nährlösungs-Basis

- Zusammensetzung (g/l):
 - Lactose 10,0
 - Natriumformiat 0,25
 - L-Cystin 0,02
 - L-Asparaginsäure 0,024
 - L-Arginin 0,02
 - Thiamin 0,001
 - Nikotinsäure 0,001
 - Panthotensäure 0,001
 - Magnesiumsulfat 0,10
 - Eisen(III)-ammoniumcitrat 0,01
 - Calciumchlorid 0,01
 - Dikaliumhydrogenphosphat 0,90
 - Bromkresolpurpur 0,01
- Zusätzlich:
 - Agar-Agar 16,0
- Zubereitung:
 - 2,5 g Ammoniumchlorid in 1 l demineralisiertem Wasser lösen. 11,4 g Glutamat-Nährlösungs-Basis und 6,4 g Natriumglutamat zur Ammoniumchlorid-Lösung geben und vollständig lösen. Vor dem Autoklavieren Agar-Agar zufügen und vollständig lösen.
 - 10 min bei 116°C autoklavieren
- der gebrauchsfertige Nährboden ist klar und hellblau, pH 6,7 +/- 0,1
- Validierung: das beschriebene Verfahren entspricht sachlich der Methode gem. L 06.00 – 36 der amtlichen Sammlung nach § 64 LFGB
- Wirkungsweise: Der Agar dient der Wiederbelebung geschädigter Zellen aus gefrorenen, getrockneten und hitzebehandelten Lebensmitteln und aus solchen mit niedrigem pH-Wert.
- der mit einem Celluloseacetat-Membranfilter belegte Nährboden wird mit 1 ml der Erstverdünnung beimpft und nachfolgend 4 h bei 37°C aerob bebrütet

10.1.2.17 Tryptose Sulfit Cycloserin (TSC) Nährbodenbasis nach HARMON et al.

- Medium nach HARMON et al. (1971) zur Identifikation von vegetativen und sporulierten Formen von *Clostridium perfringens* in Lebensmitteln
- Zusammensetzung (g/l):
 - Tryptose 15,0
 - Pepton aus Sojamehl 5,00
 - Hefeextrakt 5,00
 - Natriumdisulfit 1,00
 - Ammonium Eisen(III)citrat 1,000
 - Agar-Agar 15,0
- Zusätzlich:
 - Cycloserin 4,00
- Zubereitung:
 - 42 g TSC-Nährbodenbasis in 1,0 l demineralisiertem Wasser auf dem Magnetrührer suspendieren
 - 15 min bei 121°C autoklavieren
 - 0,4 g Cycloserin (10 ml einer filtersterilisierten 5%igen Lösung) zu dem auf 50°C abgekühlten Medium hinzufügen und auf dem Magnetrührer verteilen
- der gebrauchsfertige Nährboden ist opak und gelblich-braun, pH 7,6 +/- 0,2
- Validierung: das beschriebene Verfahren entspricht sachlich der Methode gem. L 06.00 – 20 der amtlichen Sammlung nach § 64 LFGB
- Wirkungsweise: Die Inhaltstoffe bieten *Clostridium perfringens* optimale Wachstumsbedingungen. Kolonien, die Schwefelwasserstoff produzieren, zeigen durch die Reaktion mit Sulfit und Eisensalz eine Schwarzfärbung. Cycloserin hemmt die mikrobielle Begleitflora und begrenzt gleichzeitig das Wachstum der sich entwickelnden Kolonien. Weiterhin wird eine störende Verteilung der geschwärzten Bereiche um die Kolonien herum verhindert.
- Wachstum: *Clostridium perfringens* wächst als schwarze Kolonie. Zur genauen Identifikation sind weitere Tests notwendig.
- Bebrütung: 18-24 h bei 37°C, anaerob

10.1.2.18 *Bacillus-Cereus*-Selektivnährboden (Polymyxin-Eigelb-Mannit-Bromthymolblau-Agar, PEMBA)

- Medium zur Isolierung und Koloniezahlbestimmung von *Bacillus cereus*
- Zusammensetzung (g/l):
 - Pepton 1,00
 - Mannit 10,0
 - Natriumchlorid 2,00
 - Magnesiumsulfat 0,10
 - Dinatriumhydrogenphosphat 2,50
 - Kaliumdihydrogenphosphat 15,0
 - Bromthymolblau 0,12
 - Natriumpyruvat 10,0
- Zusätzlich:
 - *Bacillus-Cereus*-Selektiv-Supplement
 - Polymyxin B 50000 IE
 - Eigelb Emulsion 25 ml
- Zubereitung:
 - 41,0 g *Bacillus-Cereus*-Agar-Basis in 950 ml demineralisiertem Wasser auf dem Magnetrührer suspendieren und vorsichtig bis zum vollständigen Lösen erhitzen
 - 15 min bei 121°C autoklavieren
 - den Inhalt eines Röhrchens *Bacillus-Cereus*-Selektiv-Supplement aseptisch in 2 ml sterilem Aqua dest. lösen. Den gelösten Inhalt und 25 ml Eigelb Emulsion aseptisch zu dem auf 50°C abgekühlten Medium hinzufügen und auf dem Magnetrührer vermischen.
- der gebrauchsfertige Nährboden ist opak und gelb, pH 7,2 +/- 0,2
- Validierung: das beschriebene Verfahren entspricht sachlich der Methode gem. L 06.00 – 20 der amtlichen Sammlung nach § 64 LFGB
- Wirkungsweise: Der Peptonanteil von 0,1% und der Zusatz von Natriumpyruvat sorgen für eine gute Eigelb-Präzipitation und Sporenbildung. Der pH-Indikator Bromthymolblau zeigt eine Mannit-Verwertung an. Die Endkonzentration von 100 IE Polymyxin B je ml gebrauchsfertigem Agar sorgt für eine Hemmung der mikrobiellen Begleitflora.

- Wachstum: *Bacillus cereus* wächst als gezackte, etwa 5 mm große, türkis bis pfauenblau gefärbte Kolonie umgeben von einer ausgeprägten Eigelb-Präzipitation mit gleicher Färbung.
- Bebrütung: 18-24 h bei 37°C, aerob

10.1.2.19 Rappaport-Vassiliadis (RV)-Anreicherungslösung

- zur selektiven Anreicherung von Salmonellen
- Zusammensetzung (g/l):
 - Sojapepton 5,00
 - Natriumchlorid 8,00
 - Kaliumdihydrogenphosphat 0,75
 - Magnesiumchlorid x 6 H₂O 40,0
 - Malachitgrün 0,04
- Zubereitung:
 - 30 g Rappaport-Vassiliadis (RV)-Anreicherungslösung in 1,0 l demineralisiertem Wasser suspendieren und bis zum vollständigen Lösen vorsichtig erhitzen.
 - je 10 ml Volumen in Endgefäße abfüllen.
 - 15 min bei 115°C autoklavieren
- gebrauchsfertige Rappaport-Vassiliadis (RV)-Anreicherungslösung ist klar und türkis-blau, pH 5,2 +/- 0,2
- Validierung: das beschriebene Verfahren entspricht sachlich der Methode gem. L 00.00 – 20 der amtlichen Sammlung nach § 64 LFGB
- Wirkungsweise: Die Zusammensetzung wurde entwickelt, um folgende Eigenschaften von Salmonellen im Vergleich mit anderen Enterobakteriaceen auszunutzen:
 - Überlebensfähigkeit bei relativ hohem osmotischen Druck
 - Vermehrung bei niedrigen pH-Werten
 - vergleichsweise höhere Resistenz gegenüber Malachitgrün
 - relativ niedrige Ansprüche an das Nährstoffangebot
- Bebrütung: 24 h bei 42°C +/- 1°C, aerob

10.1.2.20 Selenit-Cystin-Lösung-Basis

- zur Anreicherung von Salmonellen aus Faeces, Lebensmitteln und anderen Materialien
- Zusammensetzung (g/l):
 - Caseinpepton 5,00
 - Lactose 4,00
 - Dinatriumhydrogenphosphat 10,0
 - L-Cystin 0,01
- Zubereitung:
 - 4 g Natriumbiselenit in 1,0 l demineralisiertem Wasser lösen
 - 19 g Selenit-Cystin-Lösung-Basis in der Basislösung suspendieren und vorsichtig bis zum Lösen erhitzen
 - in Endgefäße zu 100 ml abfüllen
 - 10 min im Dampftopf (100°C) halten
- gebrauchsfertige Selenit-Cystin-Lösung ist klar und gelblich, pH 7,0 +/- 0,2
- Validierung: das beschriebene Verfahren entspricht sachlich der Methode gem. L 00.00 – 20 der amtlichen Sammlung nach § 64 LFGB
- Bebrütung: 18-24 h bei 36°C, aerob

10.1.2.21 Brilliantgrün-Phenolrot-Lactose-Saccharose Agar

- Selektivnährmedium zur Isolation von Salmonellen
- Zusammensetzung (g/l):
 - Pepton aus Fleisch 5,00
 - Pepton aus Casein 5,00
 - Fleischextrakt 5,00
 - Natriumchlorid 3,00
 - Dinatriumhydrogenphosphat 2,00
 - Lactose 10,0
 - Saccharose 10,0
 - Phenolrot 0,08
 - Brilliantgrün 0,0125
 - Agar-Agar 12,0
- Zubereitung:
 - 57,0 g BPLS-Agar-Basis in 1 l demineralisiertem Wasser auf dem Magnetrührer suspendieren
 - 15 min bei 121°C autoklavieren
- der gebrauchsfertige Nährboden ist klar und rot, pH 6,9 +/- 0,2
- Validierung: das beschriebene Verfahren entspricht sachlich der Methode gem. L 00.00 – 20 der amtlichen Sammlung nach § 64 LFGB
- Wirkungsweise: Das Medium enthält Laktose deren Aufspaltung durch den Umschlag des Indikators Phenolrot nach gelb angezeigt wird. Das Wachstum einer gram-positiven mikrobiellen Begleitflora wird durch Brilliantgrün gehemmt. Salmonellen verstoffwechseln weder Laktose noch Saccharose, was eine Unterscheidung zu schwach Laktose-positiven oder Laktose-negativen, Saccharose-positiven Mikroorganismen ermöglicht
- Wachstum: *Salmonella* wächst als pinkfarbene Kolonie umgeben von einer roten Zone
- Bebrütung: 24 h bei 37°C, aerob

10.1.2.22 Xylose-Lysin-Desoxycholat-Agar (XLD-Agar)

- Zur Isolierung von Salmonellen und Shigellen aus klinischem Untersuchungsmaterial und Lebensmitteln
- Zusammensetzung (g/l):
 - Hefeextrakt 3,00
 - Lysin 5,00
 - Xylose 3,75
 - Natriumchlorid 5,00
 - Natriumdesoxycholat 1,00
 - Lactose 7,50
 - Saccharose 7,50
 - Phenolrot 0,08
 - Natriumthiosulfat 0,0125
 - Eisen(III)-ammoniumcitrat 0,80
 - Agar-Agar 12,5
- Zubereitung:
 - 53,0 g XLD-Agar-Basis in 1,0 l demineralisiertem Wasser auf dem Magnetrührer suspendieren
 - unter Rühren bis zum vollständigen Lösen erhitzen
- der gebrauchsfertige Nährboden ist klar und rot, pH 7,4 +/- 0,2
- Validierung: das beschriebene Verfahren entspricht sachlich der Methode gem. L 00.00 – 20 der amtlichen Sammlung nach § 64 LFGB
- Wirkungsweise: Das Prinzip des Nährbodens beruht auf der Xylose-Verwertung, Lysin-Decarboxylierung und Schwefelwasserstoff-Bildung zur Differenzierung von Salmonellen und Shigellen von nichtpathogenen Bakterien. Shigellen können auf diesem Nährboden anhand der fehlenden Xylose-Verwertung (der Indikator Phenolrot schlägt nicht um) identifiziert werden. Salmonellen können von nichtpathogenen Xylose-Verwertern anhand des enthaltenen Lysins differenziert werden. Salmonellen fermentieren Xylose vollständig und decarboxylieren das Lysin. Der pH-Wert verschiebt sich in den alkalischen Bereich (Reaktion wie bei Shigellen). Die Unterscheidung zu den Shigellen erfolgt dann anhand des gebildeten Schwefelwasserstoffs. Als Inhibitor ist dem Nährboden Desoxycholat zugefügt. Die eingesetzte Konzentration erlaubt die Hemmung der coliformen Keime, ohne Shigellen und Salmonellen in ihrem Wachstum zu hindern.

- Wachstum: *Salmonella* und *Edwardsiella* spp. wachsen als rote oder gelborange Kolonien mit schwarzen Zentren auf rotem Nährbodenhintergrund. *S. typhi* (xylose-positive Stämme) wachsen als orangefarbene, leicht opake Kolonien. *Shigella*, *Providencia* spp. und H₂S-negative Salmonellen wachsen als rote, transparente Kolonien.
- Bebrütung: 18-24 h bei 37°C, aerob

Tabelle 13: Bebrütungstemperatur und –dauer der verwendeten Nährböden

Bebrütungs- temperatur	Nährboden	Verwendung	Bebrütungsdauer (h)				
25°C	RO	Hefen u. Schimmelpilze					4d
30°C	GSP	Aero-/Pseudomonaden			48±2		
30°C	LA	aerob wachsende Milchsäurebakterien			48±2		
30°C	LS	Laktobazillen			48±2		
30°C	PC	aerobe GKZ				72±2	
30°C	VG	Enterobakteriazeen			48±2		
30°C	VL	Coliforme			48±2		
37°C	BP	koagulase-positive Staphylokokken			46±2		
37°C	BPLS	Salmonellen		22±2			
37°C	ENDO	<i>E. coli</i>		24±2			
37°C	GLUTA	<i>E. coli</i>	4				
37°C	PAL	<i>L. monocytogenes</i>			48±2		
37°C	PEMBA	<i>B. cereus</i>		22±2			
37°C	TSC	<i>C. perfringens</i> /sulfitred. Anaerobier		22±2			
37°C	TSYEA	<i>L. monocytogenes</i>		22±2			
37°C	XLD	Salmonellen		22±2			
42°C	ZATK	Enterokokken			46±2		
44°C	ECD	<i>E. coli</i>		16- 18			



= Bebrütung anerob

10.1.3 Geräte und Verbrauchsmaterialien für die bakteriologische Untersuchung

• Anaerobiertopf 2,5 l	Oxoid, Wesel
• AnaeroGen™	Oxoid, Wesel
• Anaerobic Indicator™	Oxoid, Wesel
• Brutschrank 25°C	Memmert, Schwabach
• Brutschrank 30°C	Memmert, Schwabach
• Brutschrank 37°C	Memmert, Schwabach
• Brutschrank 42°C	Memmert, Schwabach
• Brutschrank 44°C	Heraeus, Hanau
• Enteroclon® Anti-Salmonella I (A-E)	SIFIN, Berlin
• Enteroclon® Anti-Salmonella II (F-67)	SIFIN, Berlin
• Enterotube™ II ID-Testkit	Becton Dickinson, USA
• Impfösen	Sarstedt, Nümbrecht
• Indolreagenz (Kovacs)	Merck, Darmstadt
• Katalase Bactident®	Merck, Darmstadt
• Koagulase-EDTA-Kaninchenplasma Bactident®	Merck, Darmstadt
• Oxidase Bactident®-Teststreifen	Merck, Daemstadt
• Petrischalen (90 mm Ø)	Greiner bio-one
• Pipetten 1ml, 10 ml	Sarstedt, Nümbrecht
• Probenbeutel Bag Page™ R, 400 ml	Interscience, Frankreich
• Stomacher BagMixer™	Interscience, Frankreich
• Waage LP4200S	Sartorius, Göttingen
• Wasserbad, W19	Haake, Karlsruhe

10.2 Geräte und Materialien für die molekularbiologischen Untersuchungen

10.2.1 Probenaufbereitung

PBS-Pufferlösung (PBS-DULBECCO)

- 47,75 g PBS-DULBECCO (Trockensubstanz, Biochrom, Kat. Nr. L182-05)
- 0,5 g MgCl₂ Merck, Art. Nr. 814733
- 0,5 g CaCl₂ Merck, Art. Nr. 102083
- 5,0 l Demineralisiertes Wasser (hauseigene Anlage)

10.2.2 RNA-Extraktion

- QiAmp Viral RNA Minikit[®] Qiagen, Hilden, Kat. Nr. 52904 u. 52906

10.2.3 RT-PCR

- MON Primer System (nach BEURET et al. (2002) und RICHARDS et al. (2004)),
- TIB MOLBIOL, Berlin

Tabelle 14: Primer für die Norovirus RT-PCR

Name des Oligonukleotid	Sequenz
MON431	5'-TGG ACI AGR GGI CCY AAY CA-3'
MON432	5'-TGG ACI CGY GGI CCY AAY CA-3'
MON433	5'-GAA YCT CAT CCA YCT GAA CAT-3'
MON434	5'-GAA SCG CAT CCA RCG GAA CAT-3'

Der Mastermix wird wie folgt hergestellt:

Tabelle 15: Mastermix für die Norovirus RT-PCR

Reagenz	Konzentration	Volumen/Reaktion
5x Qiagen One Step® RT-Puffer 12,5 mM MgCl ₂	1 x	10 µl
dNTP-Mix (10 mM je dNTP)	400 µM je dNTP	2 µl
Primer Mix MON 431-434, Je 10 pmol/µl	0,25 µM je Primer	5 µl
One Step® RT-PCR Enzymmix		2 µl
Wasser		11 µl

10.2.4 Amplifikationskontrolle

- MS2 RNA, Roche Diagnostics GmbH, Kat. Nr. 10 165 947 001
- Amplifikationskontrolle mit dem Phagen MS2 (nach DREIER et al. (2005)), TIB MOLBIOL, Berlin

Tabelle 16: Primer für die Amplifikationskontrolle

Name des Oligonukleotid	Sequenz
MS2-TM3-F	5'-GGC TGC TCG CGG ATA CCC-3'
MS2-TM3-R	5'-TGA GGG AAT GTG GGA ACC G-3'

- Qiagen OneStep® RT-PCR Kit, Qiagen, Hilden, Kat. Nr. 210210 u. 210212

Der Mastermix wird wie folgt hergestellt:

Tabelle 17: Mastermix für die Amplifikationskontrolle

Reagenz	Konzentration	Volumen/Reaktion
5 x Qiagen One Step [®] RT-Puffer mit 12,5 mM MgCl ₂	1 x	5 µl
dNTP-Mix (10 mM de dNTP)	400 µmol/l je dNTP	1 µl
Primer Mix MS2 (MS2-TM3-F/ MS2-TM3-R, je 20 pmol/µl)	0,2 µmol/l je Primer	0,5 µl
One Step [®] RT-PCR Enzymmix		1 µl
MS2-RNA		0,5 µl
Wasser		7 µl

- Agarose Standard, qbiogene, Kat. Nr. AGAH0500
- Marker pUC19 ready-to-use (pUC19/msp I), Carl Roth GmbH&Co. Kat. Nr. X901.1
- Qiagen OneStep[®] RT-PCR Kit, Qiagen, Hilden, Kat. Nr. 210210 u. 210212

10.2.5 Norovirus Real-Time PCR

- Primer-Sonden-System (nach HÖHNE und SCHREIER (2004)), TIB MOLBIOL, Berlin

Tabelle 18: Primer und Sonden für die Norovirus Real-Time PCR

Name des Oligonukleotid	Sequenz
NV65a NV120 TM6probe	GGI 5'-TGG ACA GGR GAT CGC RAT CT-3' 5'-AYA TCA CCG GGG GTA TTR TT-3' 5'-FAM-GCG TCC TTA GAC GCC ATC ATC ATT TAC-TAMRA-3'
NV107a NV119 TM3probe	GGII 5'-AGC CAA TGT TCA GAT GGA TG-3' 5'-TCG ACG CCA TCT TCA TTC AC-3' 5'-FAM-TGG GAG GGC GAT CGC AAT CTG GC- TAMRA-3'

- QuantiTect® Probe RT-PCR Kit, Qiagen, Hilden, Kat. Nr. 204443

Der Mastermix wird wie folgt hergestellt:

Tabelle 19: Mastermix für die Norovirus Real-Time PCR

Reagenz	Konzentration	Volumen/Reaktion
2 x QuantiTect® Probe RT-PCR Mastermix	1 x	25 µl
Primerlösung Real Time GGI (NV65a/NV120) und Sonde TM6 (je 20 pmol/µl) GGII (NV107a/NV119, je20 pmol/µl) und Sonde TM3 (10 pmol/µl)	Je 400 nM Primer/100 nM Sonde	2,5 µl
Wasser		2 µl
QuantiTect® RT-Mix		0,5 µl

10.2.6 HAV Real-Time PCR

- artusHAV[®] LC RT-PCR Kit, Qiagen, Hilden, Kat. Nr. 4505063 und 4505065

10.2.7 Positivkontrollen

Als Positivkontrollen für die Norovirus RT-PCR und Real Time PCR wurden Norovirusstämme der Genogruppen I und II, welche aus humanen Stuhlproben stammen verwendet. Die Probe der Genogruppe II stellte das ILAT, Berlin, die der Genogruppe I das RKI zur Verfügung. Die externen Positivkontrollen für die Untersuchung auf HAV waren dem verwendeten Kit in vier unterschiedlichen Verdünnungen beigelegt.

10.3 Geräte und Verbrauchsmaterialien für die molekularbiologischen Untersuchungen

- | | |
|-------------------------------------------|----------------------|
| • Alphalmager [®] | Biometra, Göttingen |
| • Austernmesser | Westmark, Elspe |
| • BagMixer W [®] , | Interscience, F. |
| • Bunsenbrenner | Roth, Karlsruhe |
| • Centrifuge 5402 | Eppendorf, Hamburg |
| • Einmalspritzen, 5 ml | Braun, Melsungen |
| • iCycler IQ [®] | Biorad, USA |
| • Kettenhandschuh | C. Mertens, Solingen |
| • Kolbenhubpipetten | |
| • 0,1 µl – 2,5 µl | Eppendorf, Hamburg |
| • 2,0 µl – 20 µl | Eppendorf, Hamburg |
| • 10 µl – 100 µl | Eppendorf, Hamburg |
| • 50 µl – 200 µl | Eppendorf, Hamburg |
| • 100 µl – 1000 µl | Eppendorf, Hamburg |
| • Kühlschrank | Kirsch, Offenburg |
| • LightCycler [®] 2.0 Instrument | Roche, Basel |

-
- Pipettenspitzen
 - 0,5 µl – 20 µl Eppendorf, Hamburg
 - 2 µl – 200 µl Eppendorf, Hamburg
 - 50 µl – 1000 µl Eppendorf, Hamburg
 - Powerpack p 25[®] Elektrophorese Biometra, Göttingen
 - Probenbeutel Bag Page[®] R, 400 ml, Interscience, F.
 - Safe-Lock-Tubes (Eppendorfg Gefäße) Eppendorf, Hamburg
 - Spritzenfilter Minisart[®] Plus, 0,45 µm Sartorius, Göttingen
 - Trio Thermoblock[®] Biometra, Göttingen
 - Vivaspin[®] 4, 50.000 MWCO Vivascience Ltd, UK
 - Waage LP4200S Sartorius, Göttingen
 - Zentrifuge Labofuge A Heraeus, Hanau
 - Zentrifuge Universal 25 Hettich, Tuttlingen
 - Zentrifugenröhrchen Roth, Karlsruhe
 - sowie laborübliche:
 - Einmalhandschuhe, Pinzetten, Pipetten, Scheren

10.4 Ergebnistabellen

160

Tabelle 20: Mikrobiologische Ergebnisse

Probe	GKZ	Milch-säure-bakt. aerob	Lakto-bazillen	Pseu-domo-naden	Aero-mona-den.	koag. pos. Staph.	<i>L. mono-cyto-genes</i>	sul-fitred. Anae-robier	Ente-rokken	Entero-bakt.	Colifor-me	<i>E. coli</i>	<i>B. cereus</i>	Hefen	Schim-mel	Salmo-nellen
	lg Koloniebildende Einheiten pro Gramm Probenmaterial															
1	3,25	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<1,0	<2,0	<2,0	<2,0	<1,0	<2,0	<2,0	<2,0	neg.
2	3,34	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<1,0	<2,0	<2,0	<2,0	<1,0	<2,0	<2,0	3,0	neg.
3	2,77	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<1,0	<2,0	<2,0	<2,0	<1,0	<2,0	<2,0	<2,0	neg.
4	2,77	<2,0	<2,0	2,3	<2,0	<2,0	<2,0	<1,0	<2,0	<2,0	<2,0	<1,0	<2,0	<2,0	<2,0	neg.
5	3,38	<2,0	<2,0	2,30	<2,0	<2,0	<2,0	<1,0	<2,0	<2,0	<2,0	<1,0	<2,0	<2,0	<2,0	neg.
6	3,66	<2,0	<2,0	3,60	<2,0	<2,0	<2,0	<1,0	<2,0	<2,0	<2,0	<1,0	<2,0	<2,0	<2,0	neg.
7	2,30	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<1,0	<2,0	<2,0	<2,0	<1,0	<2,0	<2,0	<2,0	neg.
8	6,20	3,0	3,0	5,41	5,38	<2,0	<2,0	<1,0	<2,0	4,5	<2,0	<1,0	<2,0	<2,0	3,11	neg.
9	6,47	<2,0	<2,0	5,39	5,30	<2,0	<2,0	<1,0	<2,0	3,77	<2,0	<1,0	<2,0	<2,0	2,60	neg.
10	6,20	<2,0	<2,0	5,46	5,50	<2,0	<2,0	<1,0	<2,0	3,73	<2,0	<1,0	<2,0	<2,0	3,0	neg.

10 Anhang

Probe	GKZ	Milch- säure- bakt. aerob	Lakto- bazillen	Pseu- domo- naden	Aero- mona- den	koag. pos. Staph.	<i>L. mo- nocyto- genes</i>	sul- fitred. Anaer- obier	Ente- rokken	Entero- bakt.	Colifor- me	<i>E. coli</i>	<i>B. cereus</i>	Hefen	Schim- mel	Salmo- nellen
	lg Koloniebildende Einheiten pro Gramm Probenmaterial															
11	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<1,0	<2,0	<2,0	<2,0	<1,0	<2,0	<2,0	<2,0	neg.
12	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<1,0	<2,0	<2,0	<2,0	<1,0	<2,0	<2,0	<2,0	neg.
13	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<1,0	<2,0	<2,0	<2,0	<1,0	<2,0	<2,0	<2,0	neg.
14	2,30	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<1,0	<2,0	3,0	<2,0	<1,0	<2,0	<2,0	<2,0	neg.
15	2,30	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<1,0	<2	<2	<2	<1,0	<2,0	<2,0	<2,0	neg.
16	2,30	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<1,0	<2,0	<2,0	<2,0	<1,0	<2,0	<2,0	<2,0	neg.
17	2,30	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<1,0	<2,0	<2,0	<2,0	<1,0	<2,0	<2,0	<2,0	neg.
18	2,60	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<1,0	<2,0	<2,0	<2,0	<1,0	<2,0	<2,0	<2,0	neg.
19	5,0	<2,0	2,60	3,55	<2,0	<2,0	<2,0	<1,0	<2,0	3,20	2,60	<1,0	<2,0	<2,0	2,77	neg.
20	3,46	2,60	2,30	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<1,0	<2,0	<2,0	<2,0	<1,0	<2,0	<2,0	<2,0	neg.
21	3,0	<2,0	2,60	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<1,0	<2,0	<2,0	<2,0	<1,0	<2,0	<2,0	<2,0	neg.
22	3,11	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<1,0	<2,0	<2,0	<2,0	<1,0	<2,0	<2,0	<2,0	neg.
23	5,34	<2,0	<2,0	4,07	<2,0	<2,0	<2,0	<1,0	<2,0	3,45	2,30	<1,0	<2,0	<2,0	2,30	neg.
24	2,90	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<1,0	<2,0	<2,0	<2,0	<1,0	<2,0	<2,0	<2,0	neg.

Probe	GKZ	Milch- säure- bakt. aerob	Lakto- bazillen	Pseu- domo- naden	Aero- mona- den	koag. pos. Staph.	<i>L. mo- nocyto- genes</i>	sul- fitred. Anaer- obier	Ente- rokken	Entero- bakt.	Colifor- me	<i>E. coli</i>	<i>B. cereus</i>	Hefen	Schim- mel	Salmonel- len
	Ig Koloniebildende Einheiten pro Gramm Probenmaterial															
25	2,77	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<1,0	<2,0	<2,0	<2,0	<1,0	<2,0	<2,0	<2,0	neg.
26	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<1,0	<2,0	<2,0	<2,0	<1,0	<2,0	<2,0	<2,0	neg.
27	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<1,0	<2,0	<2,0	<2,0	<1,0	<2,0	<2,0	<2,0	neg.
28	3,43	2,60	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<1,0	<2,0	<2,0	<2,0	<1,0	<2,0	<2,0	2,90	neg.
29	<2,0	<2,0	<2,0	2,3	<2,0	<2,0	<2,0	<1,0	<2,0	<2,0	<2,0	<1,0	<2,0	<2,0	<2,0	neg.
30	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<1,0	<2,0	<2,0	<2,0	<1,0	<2,0	<2,0	<2,0	neg.
31	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<1,0	<2,0	<2,0	<2,0	<1,0	<2,0	<2,0	<2,0	neg.
32	2,30	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<1,0	<2,0	<2,0	<2,0	<1,0	<2,0	<2,0	<2,0	neg.
33	2,6	<2,0	<2,0	2,6	<2,0	<2,0	<2,0	<1,0	<2,0	<2,0	<2,0	<1,0	<2,0	<2,0	<2,0	neg.
34	3,2	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<1,0	<2,0	<2,0	<2,0	<1,0	<2,0	<2,0	<2,0	neg.
35	2,3	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<1,0	<2,0	<2,0	2,3	<1,0	<2,0	<2,0	<2,0	neg.
36	3,04	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<1,0	<2,0	<2,0	<2,0	<1,0	<2,0	<2,0	<2,0	neg.
37	2,6	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<1,0	<2,0	<2,0	<2,0	<1,0	<2,0	<2,0	<2,0	neg.
38	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<1,0	<2,0	<2,0	<2,0	<1,0	<2,0	<2,0	<2,0	neg.

Tabelle 21: Molekularbiologische Ergebnisse

Probennummer	Charge vom	Norovirus MON	Norovirus Real-Time	Hepatitis A- Virus
178/1a	08.03.2005	neg.	neg.	nicht untersucht
178/1b	08.03.2005	neg.	neg.	nicht untersucht
178/1c	08.03.2005	neg.	neg.	nicht untersucht
178/1d	08.03.2005	neg.	neg.	nicht untersucht
178/1e	08.03.2005	neg.	neg.	nicht untersucht
178/2a	08.03.2005	neg.	neg.	neg.
178/2b	08.03.2005	neg.	neg.	neg.
178/2c	08.03.2005	neg.	neg.	neg.
178/2d	08.03.2005	neg.	neg.	neg.
178/2e	08.03.2005	neg.	neg.	neg.
178/2f	08.03.2005	neg.	neg.	neg.
178/2g	08.03.2005	neg.	neg.	neg.
178/2h	08.03.2005	neg.	neg.	neg.
178/2i	08.03.2005	neg.	neg.	neg.
178/2j	08.03.2005	neg.	neg.	neg.
178/2k	08.03.2005	neg.	neg.	neg.
178/2l	08.03.2005	neg.	neg.	neg.
178/2m	08.03.2005	neg.	neg.	nicht untersucht
178/2n	08.03.2005	neg.	neg.	nicht untersucht
178/3a	08.03.2005	neg.	neg.	nicht untersucht
178/3b	08.03.2005	neg.	neg.	nicht untersucht
178/3c	08.03.2005	neg.	neg.	nicht untersucht
178/3d	08.03.2005	neg.	neg.	nicht untersucht
178/3e	08.03.2005	neg.	neg.	nicht untersucht
178/3f	08.03.2005	neg.	neg.	nicht untersucht
178/3g	08.03.2005	neg.	neg.	nicht untersucht
178/3h	08.03.2005	neg.	neg.	nicht untersucht

Probennummer	Charge vom	Norovirus MON	Norovirus Real-Time	Hepatitis A-Virus
178/3i	08.03.2005	neg.	neg.	nicht untersucht
178/3j	08.03.2005	neg.	neg.	nicht untersucht
178/3k	08.03.2005	neg.	neg.	nicht untersucht
178/3l	08.03.2005	neg.	neg.	nicht untersucht
178/3m	08.03.2005	neg.	neg.	nicht untersucht
178/3n	08.03.2005	neg.	neg.	nicht untersucht
281/1a	15.04.2005	neg.	neg.	nicht untersucht
281/1b	15.04.2005	neg.	neg.	nicht untersucht
281/1c	15.04.2005	neg.	neg.	nicht untersucht
281/1d	15.04.2005	neg.	neg.	nicht untersucht
281/1e	15.04.2005	neg.	neg.	nicht untersucht
281/1f	15.04.2005	neg.	neg.	nicht untersucht
281/1g	15.04.2005	neg.	neg.	nicht untersucht
281/1h	15.04.2005	neg.	neg.	nicht untersucht
281/1i	15.04.2005	neg.	neg.	nicht untersucht
281/1j	15.04.2005	neg.	neg.	nicht untersucht
281/1k	15.04.2005	neg.	neg.	nicht untersucht
281/1l	15.04.2005	neg.	neg.	nicht untersucht
281/2a	15.04.2005	neg.	neg.	nicht untersucht
281/2b	15.04.2005	neg.	neg.	nicht untersucht
281/2c	15.04.2005	neg.	neg.	nicht untersucht
281/2d	15.04.2005	neg.	neg.	nicht untersucht
281/2e	15.04.2005	neg.	neg.	nicht untersucht
281/2f	15.04.2005	neg.	neg.	nicht untersucht
281/2g	15.04.2005	neg.	neg.	nicht untersucht
281/2h	15.04.2005	neg.	neg.	nicht untersucht
281/2i	15.04.2005	neg.	neg.	nicht untersucht
281/2j	15.04.2005	neg.	neg.	nicht untersucht
281/2k	15.04.2005	neg.	neg.	nicht untersucht
281/2l	15.04.2005	neg.	neg.	nicht untersucht

Probennummer	Charge vom	Norovirus MON	Norovirus Real-Time	Hepatitis A-Virus
281/3a	15.04.2005	neg.	neg.	nicht untersucht
281/3b	15.04.2005	neg.	neg.	nicht untersucht
281/3c	15.04.2005	neg.	neg.	nicht untersucht
281/3d	15.04.2005	neg.	neg.	nicht untersucht
281/3e	15.04.2005	neg.	neg.	nicht untersucht
281/3f	15.04.2005	neg.	neg.	nicht untersucht
281/3g	15.04.2005	neg.	neg.	nicht untersucht
281/3h	15.04.2005	neg.	neg.	nicht untersucht
281/3i	15.04.2005	neg.	neg.	nicht untersucht
281/3j	15.04.2005	neg.	neg.	nicht untersucht
281/3k	15.04.2005	neg.	neg.	nicht untersucht
281/3l	15.04.2005	neg.	neg.	nicht untersucht
440/1a	24.05.2005	neg.	neg.	neg.
440/1b	24.05.2005	neg.	neg.	neg.
440/1c	24.05.2005	neg.	neg.	neg.
440/1d	24.05.2005	neg.	neg.	neg.
440/1e	24.05.2005	neg.	neg.	neg.
440/1f	24.05.2005	neg.	neg.	neg.
440/1g	24.05.2005	neg.	neg.	neg.
440/1h	24.05.2005	neg.	neg.	neg.
440/1i	24.05.2005	neg.	neg.	neg.
440/1j	24.05.2005	neg.	neg.	neg.
440/1k	24.05.2005	neg.	neg.	neg.
440/1l	24.05.2005	neg.	neg.	neg.
440/2a	24.05.2005	neg.	neg.	neg.
440/2b	24.05.2005	neg.	neg.	neg.
440/2c	24.05.2005	neg.	neg.	neg.
440/2d	24.05.2005	neg.	neg.	neg.
440/2e	24.05.2005	neg.	neg.	neg.
440/2f	24.05.2005	neg.	neg.	neg.
440/2g	24.05.2005	neg.	neg.	neg.

Probennummer	Charge vom	Norovirus MON	Norovirus Real-Time	Hepatitis A-Virus
440/2h	24.05.2005	neg.	neg.	neg.
440/2i	24.05.2005	neg.	neg.	neg.
440/2j	24.05.2005	neg.	neg.	neg.
440/2k	24.05.2005	neg.	neg.	neg.
440/2l	24.05.2005	neg.	neg.	neg.
440/3a	24.05.2005	neg.	neg.	neg.
440/3b	24.05.2005	neg.	neg.	neg.
440/3c	24.05.2005	neg.	neg.	neg.
440/3d	24.05.2005	neg.	neg.	neg.
440/3e	24.05.2005	neg.	neg.	neg.
440/3f	24.05.2005	neg.	neg.	neg.
440/3g	24.05.2005	neg.	neg.	neg.
440/3h	24.05.2005	neg.	neg.	neg.
440/3i	24.05.2005	neg.	neg.	neg.
440/3j	24.05.2005	neg.	neg.	neg.
440/3k	24.05.2005	neg.	neg.	neg.
440/3l	24.05.2005	neg.	neg.	neg.
632/1a	22.07.2005	neg.	neg.	neg.
632/1b	22.07.2005	neg.	neg.	neg.
632/1c	22.07.2005	neg.	neg.	neg.
632/1d	22.07.2005	neg.	neg.	neg.
632/1e	22.07.2005	neg.	neg.	neg.
632/1f	22.07.2005	neg.	neg.	neg.
632/1g	22.07.2005	neg.	neg.	neg.
632/1h	22.07.2005	neg.	neg.	neg.
632/1i	22.07.2005	neg.	neg.	neg.
632/1j	22.07.2005	neg.	neg.	neg.
632/1k	22.07.2005	neg.	neg.	neg.
632/1l	22.07.2005	neg.	neg.	neg.
632/2a	22.07.2005	neg.	neg.	neg.
632/2b	22.07.2005	neg.	neg.	neg.

Probennummer	Charge vom	Norovirus MON	Norovirus Real-Time	Hepatitis A-Virus
632/2c	22.07.2005	neg.	neg.	neg.
632/2d	22.07.2005	neg.	neg.	neg.
632/2e	22.07.2005	neg.	neg.	neg.
632/2f	22.07.2005	neg.	neg.	neg.
632/2g	22.07.2005	neg.	neg.	neg.
632/2h	22.07.2005	neg.	neg.	neg.
632/2i	22.07.2005	neg.	neg.	neg.
632/2j	22.07.2005	neg.	neg.	neg.
632/2k	22.07.2005	neg.	neg.	neg.
632/2l	22.07.2005	neg.	neg.	neg.
632/3a	22.07.2005	neg.	neg.	neg.
632/3b	22.07.2005	neg.	neg.	neg.
632/3c	22.07.2005	neg.	neg.	neg.
632/3d	22.07.2005	neg.	neg.	neg.
632/3e	22.07.2005	neg.	neg.	neg.
632/3f	22.07.2005	neg.	neg.	neg.
632/3g	22.07.2005	neg.	neg.	neg.
632/3h	22.07.2005	neg.	neg.	neg.
632/3i	22.07.2005	neg.	neg.	neg.
632/3j	22.07.2005	neg.	neg.	neg.
632/3k	22.07.2005	neg.	neg.	neg.
632/3l	22.07.2005	neg.	neg.	neg.
778/1a	08.09.2005	neg.	neg.	neg.
778/1b	08.09.2005	neg.	neg.	neg.
778/1c	08.09.2005	neg.	neg.	neg.
778/1d	08.09.2005	neg.	neg.	neg.
778/1e	08.09.2005	neg.	neg.	neg.
778/1f	08.09.2005	neg.	neg.	neg.
778/1g	08.09.2005	neg.	neg.	neg.
778/1h	08.09.2005	neg.	neg.	neg.
778/1i	08.09.2005	neg.	neg.	neg.

Probennummer	Charge vom	Norovirus MON	Norovirus Real-Time	Hepatitis A-Virus
778/1j	08.09.2005	neg.	neg.	neg.
778/1k	08.09.2005	neg.	neg.	neg.
778/1l	08.09.2005	neg.	neg.	neg.
778/2a	08.09.2005	neg.	neg.	neg.
778/2b	08.09.2005	neg.	neg.	neg.
778/2c	08.09.2005	neg.	neg.	neg.
778/2d	08.09.2005	neg.	neg.	neg.
778/2e	08.09.2005	neg.	neg.	neg.
778/2f	08.09.2005	neg.	neg.	neg.
778/2g	08.09.2005	neg.	neg.	neg.
778/2h	08.09.2005	neg.	neg.	neg.
778/2i	08.09.2005	neg.	neg.	neg.
778/2j	08.09.2005	neg.	neg.	neg.
778/2k	08.09.2005	neg.	neg.	neg.
778/2l	08.09.2005	neg.	neg.	neg.
778/3a	08.09.2005	neg.	neg.	neg.
778/3b	08.09.2005	neg.	neg.	neg.
778/3c	08.09.2005	neg.	neg.	neg.
778/3d	08.09.2005	neg.	neg.	neg.
778/3e	08.09.2005	neg.	neg.	neg.
778/3f	08.09.2005	neg.	neg.	neg.
778/3g	08.09.2005	neg.	neg.	neg.
778/3h	08.09.2005	neg.	neg.	neg.
778/3i	08.09.2005	neg.	neg.	neg.
778/3j	08.09.2005	neg.	neg.	neg.
778/3k	08.09.2005	neg.	neg.	neg.
778/3l	08.09.2005	neg.	neg.	neg.
827/1a	19.09.2005	neg.	neg.	nicht untersucht
827/1b	19.09.2005	neg.	neg.	nicht untersucht
827/1c	19.09.2005	neg.	neg.	nicht untersucht
827/1d	19.09.2005	neg.	neg.	nicht untersucht

Probennummer	Charge vom	Norovirus MON	Norovirus Real-Time	Hepatitis A-Virus
827/1e	19.09.2005	neg.	neg.	nicht untersucht
827/1f	19.09.2005	neg.	neg.	nicht untersucht
827/1g	19.09.2005	neg.	neg.	nicht untersucht
827/1h	19.09.2005	neg.	neg.	nicht untersucht
827/1i	19.09.2005	neg.	neg.	nicht untersucht
827/1j	19.09.2005	neg.	neg.	nicht untersucht
827/1k	19.09.2005	neg.	neg.	nicht untersucht
827/1l	19.09.2005	neg.	neg.	nicht untersucht
827/2a	19.09.2005	neg.	neg.	neg.
827/2b	19.09.2005	neg.	neg.	neg.
827/2c	19.09.2005	neg.	neg.	neg.
827/2d	19.09.2005	neg.	neg.	neg.
827/2e	19.09.2005	neg.	neg.	neg.
827/2f	19.09.2005	neg.	neg.	neg.
827/2g	19.09.2005	neg.	neg.	neg.
827/2h	19.09.2005	neg.	neg.	neg.
827/2i	19.09.2005	neg.	neg.	neg.
827/2j	19.09.2005	neg.	neg.	neg.
827/2k	19.09.2005	neg.	neg.	neg.
827/2l	19.09.2005	neg.	neg.	neg.
827/3a	19.09.2005	neg.	neg.	neg.
827/3b	19.09.2005	neg.	neg.	neg.
827/3c	19.09.2005	neg.	neg.	neg.
827/3d	19.09.2005	neg.	neg.	neg.
827/3e	19.09.2005	neg.	neg.	neg.
827/3f	19.09.2005	neg.	neg.	neg.
827/3g	19.09.2005	neg.	neg.	neg.
827/3h	19.09.2005	neg.	neg.	neg.
827/3i	19.09.2005	neg.	neg.	neg.
827/3j	19.09.2005	neg.	neg.	neg.
827/3k	19.09.2005	neg.	neg.	neg.

Probennummer	Charge vom	Norovirus MON	Norovirus Real-Time	Hepatitis A-Virus
827/3l	19.09.2005	neg.	neg.	neg.
1035/1a	01.12.2005	neg.	neg.	neg.
1035/1b	01.12.2005	neg.	neg.	neg.
1035/1c	01.12.2005	neg.	neg.	neg.
1035/1d	01.12.2005	neg.	neg.	neg.
1035/1e	01.12.2005	neg.	neg.	neg.
1035/1f	01.12.2005	neg.	neg.	neg.
1035/1g	01.12.2005	neg.	neg.	neg.
1035/1h	01.12.2005	neg.	neg.	neg.
1035/1i	01.12.2005	neg.	neg.	neg.
1035/1j	01.12.2005	neg.	neg.	neg.
1035/1k	01.12.2005	neg.	neg.	neg.
1035/1l	01.12.2005	neg.	neg.	neg.
1035/2a	01.12.2005	neg.	neg.	neg.
1035/2b	01.12.2005	neg.	neg.	neg.
1035/2c	01.12.2005	neg.	neg.	neg.
1035/2d	01.12.2005	neg.	neg.	neg.
1035/2e	01.12.2005	neg.	neg.	neg.
1035/2f	01.12.2005	neg.	neg.	neg.
1035/2g	01.12.2005	neg.	neg.	neg.
1035/2h	01.12.2005	neg.	neg.	neg.
1035/2i	01.12.2005	neg.	neg.	neg.
1035/2j	01.12.2005	neg.	neg.	neg.
1035/2k	01.12.2005	neg.	neg.	neg.
1035/2l	01.12.2005	neg.	neg.	neg.
1035/3a	01.12.2005	neg.	neg.	nicht untersucht
1035/3b	01.12.2005	neg.	neg.	nicht untersucht
1035/3c	01.12.2005	neg.	neg.	nicht untersucht
1035/3d	01.12.2005	neg.	neg.	nicht untersucht
1035/3e	01.12.2005	neg.	neg.	nicht untersucht
1035/3f	01.12.2005	neg.	neg.	nicht untersucht

Probennummer	Charge vom	Norovirus MON	Norovirus Real-Time	Hepatitis A-Virus
1035/3g	01.12.2005	neg.	neg.	nicht untersucht
1035/3h	01.12.2005	neg.	neg.	nicht untersucht
1035/3i	01.12.2005	neg.	neg.	nicht untersucht
1035/3j	01.12.2005	neg.	neg.	nicht untersucht
1035/3k	01.12.2005	neg.	neg.	nicht untersucht
1035/3l	01.12.2005	neg.	neg.	nicht untersucht
1035/4a	01.12.2005	neg.	neg.	nicht untersucht
1035/4b	01.12.2005	neg.	neg.	nicht untersucht
1035/4c	01.12.2005	neg.	neg.	nicht untersucht
1035/4d	01.12.2005	neg.	neg.	nicht untersucht
1035/4e	01.12.2005	neg.	neg.	nicht untersucht
1035/4f	01.12.2005	neg.	neg.	nicht untersucht
1035/4g	01.12.2005	neg.	neg.	nicht untersucht
1035/4h	01.12.2005	neg.	neg.	nicht untersucht
1035/4i	01.12.2005	neg.	neg.	nicht untersucht
1035/4j	01.12.2005	neg.	neg.	nicht untersucht
1035/4k	01.12.2005	neg.	neg.	nicht untersucht
1035/4l	01.12.2005	neg.	neg.	nicht untersucht
1035/5a	01.12.2005	neg.	neg.	nicht untersucht
1035/5b	01.12.2005	neg.	neg.	nicht untersucht
1035/5c	01.12.2005	neg.	neg.	nicht untersucht
1035/5d	01.12.2005	neg.	neg.	nicht untersucht
1035/5e	01.12.2005	neg.	neg.	nicht untersucht
1035/5f	01.12.2005	neg.	neg.	nicht untersucht
1035/5g	01.12.2005	neg.	neg.	nicht untersucht
1035/5h	01.12.2005	neg.	neg.	nicht untersucht
1035/5i	01.12.2005	neg.	neg.	nicht untersucht
1035/5j	01.12.2005	neg.	neg.	nicht untersucht
1035/5k	01.12.2005	neg.	neg.	nicht untersucht
1035/5l	01.12.2005	neg.	neg.	nicht untersucht
21/1a	05.01.2006	neg.	neg.	neg.

Probennummer	Charge vom	Norovirus MON	Norovirus Real-Time	Hepatitis A-Virus
21/1b	05.01.2006	neg.	neg.	neg.
21/1c	05.01.2006	neg.	neg.	neg.
21/1d	05.01.2006	neg.	neg.	neg.
21/1e	05.01.2006	neg.	neg.	neg.
21/1f	05.01.2006	neg.	neg.	neg.
21/1g	05.01.2006	neg.	neg.	neg.
21/1h	05.01.2006	neg.	neg.	neg.
21/1i	05.01.2006	neg.	neg.	neg.
21/1j	05.01.2006	neg.	neg.	neg.
21/1k	05.01.2006	neg.	neg.	neg.
21/1l	05.01.2006	neg.	neg.	neg.
21/2a	05.01.2006	neg.	neg.	neg.
21/2b	05.01.2006	neg.	neg.	neg.
21/2c	05.01.2006	neg.	neg.	neg.
21/2d	05.01.2006	neg.	neg.	neg.
21/2e	05.01.2006	neg.	neg.	neg.
21/2f	05.01.2006	neg.	neg.	neg.
21/2g	05.01.2006	neg.	neg.	neg.
21/2h	05.01.2006	neg.	neg.	neg.
21/2i	05.01.2006	neg.	neg.	neg.
21/2j	05.01.2006	neg.	neg.	neg.
21/2k	05.01.2006	neg.	neg.	neg.
21/2l	05.01.2006	neg.	neg.	neg.
21/3a	05.01.2006	neg.	neg.	neg.
21/3b	05.01.2006	neg.	neg.	neg.
21/3c	05.01.2006	neg.	neg.	neg.
21/3d	05.01.2006	neg.	neg.	neg.
21/3e	05.01.2006	neg.	neg.	neg.
21/3f	05.01.2006	neg.	neg.	neg.
21/3g	05.01.2006	neg.	neg.	neg.
21/3h	05.01.2006	neg.	neg.	neg.

Probennummer	Charge vom	Norovirus MON	Norovirus Real-Time	Hepatitis A-Virus
21/3i	05.01.2006	neg.	neg.	neg.
21/3j	05.01.2006	neg.	neg.	neg.
21/3k	05.01.2006	neg.	neg.	neg.
21/3l	05.01.2006	neg.	neg.	neg.
94/1a	02.02.2006	neg.	neg.	neg.
94/1b	02.02.2006	neg.	neg.	neg.
94/1c	02.02.2006	neg.	neg.	neg.
94/1d	02.02.2006	neg.	neg.	neg.
94/1e	02.02.2006	neg.	neg.	neg.
94/1f	02.02.2006	neg.	neg.	neg.
94/1g	02.02.2006	neg.	neg.	neg.
94/1h	02.02.2006	neg.	neg.	neg.
94/1i	02.02.2006	neg.	neg.	neg.
94/1j	02.02.2006	neg.	neg.	neg.
94/1k	02.02.2006	neg.	neg.	neg.
94/1l	02.02.2006	neg.	neg.	neg.
94/2a	02.02.2006	neg.	neg.	neg.
94/2b	02.02.2006	neg.	neg.	neg.
94/2c	02.02.2006	neg.	neg.	neg.
94/2d	02.02.2006	neg.	neg.	neg.
94/2e	02.02.2006	neg.	neg.	neg.
94/2f	02.02.2006	neg.	neg.	neg.
94/2g	02.02.2006	neg.	neg.	neg.
94/2h	02.02.2006	neg.	neg.	neg.
94/2i	02.02.2006	neg.	neg.	neg.
94/2j	02.02.2006	neg.	neg.	neg.
94/2k	02.02.2006	neg.	neg.	neg.
94/2l	02.02.2006	neg.	neg.	neg.
94/3a	02.02.2006	neg.	neg.	neg.
94/3b	02.02.2006	neg.	neg.	neg.
94/3c	02.02.2006	neg.	neg.	neg.

Probennummer	Charge vom	Norovirus MON	Norovirus Real-Time	Hepatitis A-Virus
94/3d	02.02.2006	neg.	neg.	neg.
94/3e	02.02.2006	neg.	neg.	neg.
94/3f	02.02.2006	neg.	neg.	neg.
94/3g	02.02.2006	neg.	neg.	neg.
94/3h	02.02.2006	neg.	neg.	neg.
94/3i	02.02.2006	neg.	neg.	neg.
94/3j	02.02.2006	neg.	neg.	neg.
94/3k	02.02.2006	neg.	neg.	neg.
94/3l	02.02.2006	neg.	neg.	neg.
94/4a	02.02.2006	neg.	neg.	neg.
94/4b	02.02.2006	neg.	neg.	neg.
94/4c	02.02.2006	neg.	neg.	neg.
94/4d	02.02.2006	neg.	neg.	neg.
94/4e	02.02.2006	neg.	neg.	neg.
94/4f	02.02.2006	neg.	neg.	neg.
94/4g	02.02.2006	neg.	neg.	neg.
94/4h	02.02.2006	neg.	neg.	neg.
94/4i	02.02.2006	neg.	neg.	neg.
94/4j	02.02.2006	neg.	neg.	neg.
94/4k	02.02.2006	neg.	neg.	neg.
94/4l	02.02.2006	neg.	neg.	neg.
363/1a	24.05.2006	neg.	neg.	neg.
363/1b	24.05.2006	neg.	neg.	neg.
363/1c	24.05.2006	neg.	neg.	neg.
363/1d	24.05.2006	neg.	neg.	neg.
363/1e	24.05.2006	neg.	neg.	neg.
363/1f	24.05.2006	neg.	neg.	neg.
363/1g	24.05.2006	neg.	neg.	neg.
363/1h	24.05.2006	neg.	neg.	neg.
363/1i	24.05.2006	neg.	neg.	neg.
363/1j	24.05.2006	neg.	neg.	neg.

Probennummer	Charge vom	Norovirus MON	Norovirus Real-Time	Hepatitis A-Virus
363/1k	24.05.2006	neg.	neg.	neg.
363/1l	24.05.2006	neg.	neg.	neg.
363/2a	24.05.2006	neg.	neg.	neg.
363/2b	24.05.2006	neg.	neg.	neg.
363/2c	24.05.2006	neg.	neg.	neg.
363/2d	24.05.2006	neg.	neg.	neg.
363/2e	24.05.2006	neg.	neg.	neg.
363/2f	24.05.2006	neg.	neg.	neg.
363/2g	24.05.2006	neg.	neg.	neg.
363/2h	24.05.2006	neg.	neg.	neg.
363/2i	24.05.2006	neg.	neg.	neg.
363/2j	24.05.2006	neg.	neg.	neg.
363/2k	24.05.2006	neg.	neg.	neg.
363/2l	24.05.2006	neg.	neg.	neg.
363/3a	24.05.2006	neg.	neg.	neg.
363/3b	24.05.2006	neg.	neg.	neg.
363/3c	24.05.2006	neg.	neg.	neg.
363/3d	24.05.2006	neg.	neg.	neg.
363/3e	24.05.2006	neg.	neg.	neg.
363/3f	24.05.2006	neg.	neg.	neg.
363/3g	24.05.2006	neg.	neg.	neg.
363/3h	24.05.2006	neg.	neg.	neg.
363/3i	24.05.2006	neg.	neg.	neg.
363/3j	24.05.2006	neg.	neg.	neg.
363/3k	24.05.2006	neg.	neg.	neg.
363/3l	24.05.2006	neg.	neg.	neg.
363/4a	24.05.2006	neg.	neg.	neg.
363/4b	24.05.2006	neg.	neg.	neg.
363/4c	24.05.2006	neg.	neg.	neg.
363/4d	24.05.2006	neg.	neg.	neg.
363/4e	24.05.2006	neg.	neg.	neg.

Probennummer	Charge vom	Norovirus MON	Norovirus Real-Time	Hepatitis A-Virus
363/4f	24.05.2006	neg.	neg.	neg.
363/4g	24.05.2006	neg.	neg.	neg.
363/4h	24.05.2006	neg.	neg.	neg.
363/4i	24.05.2006	neg.	neg.	neg.
363/4j	24.05.2006	neg.	neg.	neg.
363/4k	24.05.2006	neg.	neg.	neg.
363/4l	24.05.2006	neg.	neg.	neg.
425/1a	15.06.2006	neg.	neg.	neg.
425/1b	15.06.2006	neg.	neg.	neg.
425/1c	15.06.2006	neg.	neg.	neg.
425/1d	15.06.2006	neg.	neg.	neg.
425/1e	15.06.2006	neg.	neg.	neg.
425/1f	15.06.2006	neg.	neg.	neg.
425/1g	15.06.2006	neg.	neg.	neg.
425/1h	15.06.2006	neg.	neg.	neg.
425/1i	15.06.2006	neg.	neg.	neg.
425/1j	15.06.2006	neg.	neg.	neg.
425/1k	15.06.2006	neg.	neg.	neg.
425/1l	15.06.2006	neg.	neg.	neg.
425/2a	15.06.2006	neg.	neg.	neg.
425/2b	15.06.2006	neg.	neg.	neg.
425/2c	15.06.2006	neg.	neg.	neg.
425/2d	15.06.2006	neg.	neg.	neg.
425/2e	15.06.2006	neg.	neg.	neg.
425/2f	15.06.2006	neg.	neg.	neg.
425/2g	15.06.2006	neg.	neg.	neg.
425/2h	15.06.2006	neg.	neg.	neg.
425/2i	15.06.2006	neg.	neg.	neg.
425/2j	15.06.2006	neg.	neg.	neg.
425/2k	15.06.2006	neg.	neg.	neg.
425/2l	15.06.2006	neg.	neg.	neg.

10.5 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Noroviren im elektronenmikroskopischen Bild	3
Abbildung 2: Phylogenetisches Dendrogramm der Norovirus Genogruppen I und II	6
Abbildung 3: Gemeldete Norovirus-Fälle in Deutschland (Daten: RKI 2001-2006)	8
Abbildung 4: Prävalenz von Hepatitis A-Erkrankungen im weltweiten Vergleich	12
Abbildung 5: Hepatitis A-Virus 225,000fach vergrößert	12
Abbildung 6: Anordnung des HAV Genoms	14
Abbildung 7: Aufbau eines Picornaviruspartikels	15
Abbildung 8: Geographische Verbreitung von HAV Genotypen	17
Abbildung 9: Übermittelte Hep. A-Infektionen in Deutschland	17
Abbildung 10: Diagnose der Hepatitis A-Infektion	20
Abbildung 11: <i>Crassostrea</i> , Querschnitt	45
Abbildung 12: Verdauungstrakt der Auster	46
Abbildung 13: Das Nervensystem der Auster	47
Abbildung 14: Das arterielle System von <i>Crassostrea</i>	49
Abbildung 15: Lebenszyklus der Auster	51
Abbildung 16: Vorkommen der einheimischen Auster (<i>Ostrea edulis</i>)	53
Abbildung 17: Ausbreitung der Pazifischen Auster nach der Drift-Hypothese	53
Abbildung 18: Hauptproduzenten von <i>Crassostrea gigas</i>	56
Abbildung 19: <i>Crassostrea gigas</i> : weltweite Produktion	56
Abbildung 20: Hauptproduzenten von <i>C. virginica</i>	57
Abbildung 21: <i>C. virginica</i> : weltweite Produktion	57
Abbildung 22: Hauptproduzenten von <i>Ostrea edulis</i>	58
Abbildung 23: <i>Ostrea edulis</i> : weltweite Produktion	58
Abbildung 24: Fließschema zur Probenaufbereitung	67
Abbildung 25: Konventionelle RT-PCR, MON Primersystem	70
Abbildung 26: Real-Time PCR, Primer-Sondensystem nach HÖHNE und SCHREIER	70
Abbildung 27: Pipettierschema HAV	71
Abbildung 28: Aerobe Gesamtkeimzahl der untersuchten Austernproben	82

10.6 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: <i>Salmonella enterica</i> Subspezies	24
Tabelle 2: Französische Austern Exporte Januar-September (in Tonnen)	61
Tabelle 3: Gesamtmenge der Austernimporte in Deutschland (in Tonnen)	61
Tabelle 4: Verteilung der Austernproben nach Herkunft	65
Tabelle 5: Durchführung der Norovirus RT-PCR und Real-Time PCR	68
Tabelle 6: Reaktionsansatz und Durchführung der Amplifikationskontrolle	68
Tabelle 7: Reaktionsbedingungen für die HAV Real-Time PCR	71
Tabelle 8: Identifizierungs-Reaktionen für <i>Listeria</i> spp.	75
Tabelle 9: Auswertungsschema für die Untersuchung auf Salmonellen	81
Tabelle 10: Proben mit aeroben Gesamtkeimzahlen über 10^5 KbE pro Gramm	83
Tabelle 11: Proben, die die Richt- bzw. Warnwerte der DGHM für Enterobakteriazeen überschritten oder knapp unterschritten	84
Tabelle 12: Proben, die die Richt- bzw. Warnwerte der DGHM für Pseudomonaden überschreiten oder knapp unterschreiten	84
Tabelle 13: Bebrütungstemperatur und –dauer der verwendeten Nährböden	152
Tabelle 14: Primer für die Norovirus RT-PCR	154
Tabelle 15: Mastermix für die Norovirus RT-PCR	155
Tabelle 16: Primer für die Amplifikationskontrolle	155
Tabelle 17: Mastermix für die Amplifikationskontrolle	156
Tabelle 18: Primer und Sonden für die Norovirus Real-Time PCR	157
Tabelle 19: Mastermix für die Norovirus Real-Time PCR	157
Tabelle 20: Mikrobiologische Ergebnisse	160
Tabelle 21 Molekularbiologische Ergebnisse	163

11 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Goetz Hildebrandt danke ich nicht nur für die Überlassung des Themas, sondern auch für die ständige Hilfsbereitschaft, die geduldige Unterstützung und die immer wieder motivierenden Worte.

Herr Dr. J. Kleer stand mir immer wieder in fachlichen Fragen hilfsbereit zur Seite und ich möchte mich hierfür recht herzlich bedanken.

Herrn Dr. Broll und seinen Mitarbeitern danke ich für die Möglichkeit, einen Teil der praktischen Arbeiten am Bundesinstitut für Risikobewertung durchzuführen.

Ohne die Bereitstellung der Austernproben durch die „Deutsche See“, Bremerhaven, wäre die Durchführung dieser Arbeit nicht möglich gewesen. Mein besonderer Dank gilt hier im Besonderen Fr. Dr. Maria Koch.

Frau Brigitte Müller und Frau Angelika Dorow danke ich für die tatkräftige Unterstützung bei der mikrobiologischen Untersuchung der Proben.

Bei Fr. Dr. Burkhard, die mir immer wieder mit fachlichem Rat und Tat zur Seite stand, möchte ich mich ebenfalls ganz herzlich bedanken.

Ohne die tatkräftige Unterstützung und unendliche Geduld von Frau Sabine Godglück wären viele Abbildungen bestimmt nicht so schön geworden, wie sie jetzt sind.

Mein besonderer Dank geht an Frau Christel Galla, die nicht nur bei der Durchführung der praktischen Arbeiten eine unschätzbare Hilfe war, sondern auch immer wieder die passenden Worte zur Motivation gefunden hat.

Meinen Freunden und insbesondere Daniel Riehn, danke ich für die moralische Unterstützung und das geduldige Ertragen meiner Launen.

Zuletzt möchte ich mich noch bei meiner Familie, Verwandten und Bekannten und bei meinen Kollegen für ihr jahrelanges Interesse bezüglich des Fortganges meiner Arbeit bedanken.

12 Selbständigkeitserklärung

Ich bestätige, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Thema

*Bakterieller und viraler Kontaminationsstatus von Pazifischen Felsenaustern (*Crassostrea gigas*) - einjähriges Monitoring des „Berliner Angebots“*

selbstständig angefertigt habe, ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Katharina Möhl

Berlin, den 07.05.2008