

## 3 EIGENE UNTERSUCHUNGEN

### 3.1 Zielsetzung

Ziel der eigenen Untersuchungen war es, den Einfluss der Fleischhygiene-Verordnung und der Hackfleisch-Verordnung sowie verschiedener Betriebsformen auf die mikrobiologische Beschaffenheit von Hackfleisch und Zwiebelmettwurst festzustellen. Ein weiterer Schwerpunkt, der im Rahmen dieser Arbeit behandelt werden sollte, war die Frage nach dem Ausmaß der Belastung des Probenmaterials mit vancomycinresistenten Enterokokken.

### 3.2 Material und Methode

#### 3.2.1 Probenmaterial

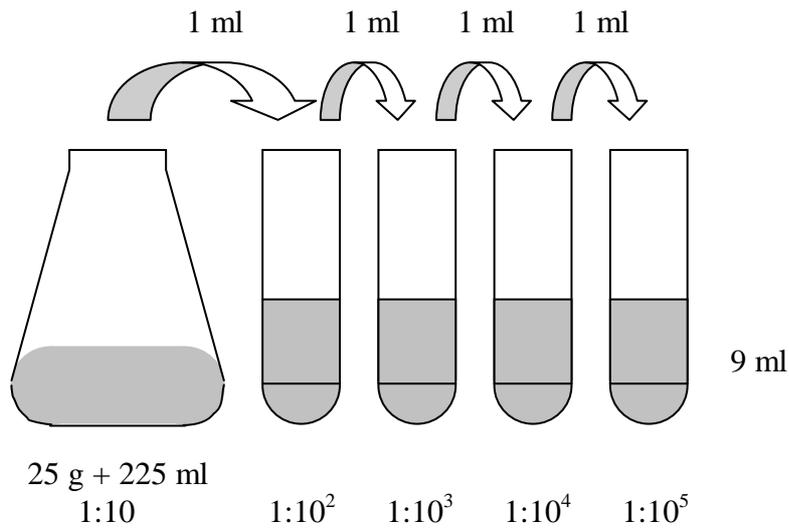
In der Zeit von Mai 1999 bis Februar 2000 wurden insgesamt 207 Proben Schweinehackfleisch und 147 Proben Frische Zwiebelmettwurst aus verschiedenen Berliner Fleischereien und Supermärkten sowie von EU-zugelassenen Betrieben mit einem umfangreichen Plattensatz mikrobiologisch untersucht. Sämtliche Proben wurden zwischen 8<sup>00</sup> und 9<sup>00</sup> Uhr verdeckt gezogen und bis zur Untersuchung, die maximal 3 Stunden später erfolgte, bei 4-7 °C gekühlt. Die Proben wurden in 5 Gruppen eingeteilt:

- Gruppe 1: insgesamt 66 Proben Hackfleisch von 6 EU-zugelassenen Betrieben
- Gruppe 2: insgesamt 69 Proben Hackfleisch aus 23 Fleischereien
- Gruppe 3: insgesamt 72 Proben Hackfleisch aus Fleischabteilungen von 24 Supermärkten
- Gruppe 4: insgesamt 75 Proben Zwiebelmettwurst von 7 EU-zugelassenen Betrieben
- Gruppe 5: insgesamt 69 Proben Zwiebelmettwurst aus 23 Fleischereien

Bei sämtlichen Proben wurden Keimzahlbestimmungen sowie Anreicherungsverfahren zur Untersuchung auf Salmonellen und *Listeria monocytogenes* gemäß den Bestimmungen der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG durchgeführt. Entgegen den mikrobiologischen Anforderungen der Fleischhygiene-Verordnung (Anlage 2a, Kapitel X, Punkt 9.3) wurden zum Nachweis von Salmonellen ausschließlich 25 g schwere Einzelproben untersucht.

### 3.2.2 Probenaufbereitung

Für die **Keimzahlbestimmungen** wurden jeweils 25 g Probenmaterial zusammen mit 225 g gepuffertem Peptonwasser homogenisiert. Dieses Homogenisat diente gleichzeitig auch als Voranreicherung für Salmonellen. Vom Homogenisat wurde eine dezimale Verdünnungsreihe angelegt (Abb. 1).



**Abb. 1:** Herstellung einer Verdünnungsreihe

Sowohl aus dem Homogenisat als auch aus jeder gründlich durchmischten Verdünnungsreihe wurden zweimal 0,05 ml (Doppelansatz) auf vorgetrocknete Nährböden aufgetragen. Die untere Erfassungsgrenze lag bei  $2,0 \times 10^2$  koloniebildende Einheiten (KbE) pro Gramm Untersuchungsmaterial. Zur Bestimmung von *E. coli*, vancomycinresistenten Enterokokken, sulfitreduzierenden Anaerobiern und *Staph. aureus* wurde 1 ml des Homogenisates auf die Selektivnährböden aufgetragen. Die Nachweisgrenze lag bei diesen Keimen bei  $1,0 \times 10^1$  KbE/g Untersuchungsmaterial. Die für die Keimzahlbestimmungen verwendeten Nährmedien sowie die Bebrütungstemperaturen und –dauer zeigt Tab. 2. Die vollständigen Rezepturen sind im Anhang aufgeführt. Die Differenzierung der erfassten Keime erfolgte überwiegend aufgrund ihres Verhaltens auf den jeweiligen selektiven Nährböden. Pseudomonaden und Aeromonaden wurden mittels Katalase- und Oxidase-Test bestätigt, *Staph. aureus* mittels Koagulase-Test und *Bacillus cereus* mittels mikroskopischer Untersuchung. Die Bestätigung von Enterokokken erfolgte zusätzlich zum Katalase-Test durch Nachweis der Hämolyse auf Columbia-Agar, Pyrase-Test (Oxoid) und Wachstum in BHI-

Bouillon mit 6,5 %igem NaCl-Zusatz. Zur Speziesdifferenzierung wurden L-Arabinose-, Mannit-, Rhamnose- und Sorbit-Lösungen (1 %ig) verwendet.

**Tab. 2:** Vorgehensweise zur Keimzahlbestimmung in Hackfleisch und Zwiebelmettwurst

Keimgruppen	Nährmedien	Bebrütung	Bestätigung
aerobe mesophile Gesamtkeimzahl	Plate Count (PC)	30 °C, 72 h	
aerobe Milchsäure- bildner	MRS-Agar	30 °C, 48 h	
säuretolerante Lakto- bazillen	LS-Agar	30 °C, 48 h, anaerob	
Pseudomonaden und Aeromonaden	Glutamat-Stärke-Phenol- rot-Penicillin-Agar (GSP)	30 °C, 48 h	Oxidase- und Katalase-Nachweis
Staph. aureus und Mikrokokken	BAIRD-PARKER-Agar (BP)	37 °C, 48 h	Koagulase-Nachweis
Enterokokken	Zitrat-Acid-Tween- Karbonat-Agar (ZATK)	37 °C, 24 h und Raumtemp. , 24 h	Katalase-Test
Enterobakteriazeen	Violet Red Bile Dextrose-Agar (VRBD)	37 °C, 48 h, anaerob	
coliforme Keime	Violet Red Bile-Agar (VRB)	37 °C, 48 h, anaerob	
E. coli	Fluorocult ECD-Agar	44 °C, 18 h	Fluoreszenz, Indol
sulfitreduzierende Anaerobier	Tryptose-Sulfit- Cycloserin-Agar (TSC)	37 °C, 24 h, anaerob	
Bacillus cereus	PEMBA-Agar	37 °C, 24 h	Sporenfärbung
Hefen und Schimmelpilze	Bengalrot-Chlor- amphenicol-Agar (RO)	25 °C, 4 Tage	

Für den Nachweis von **Salmonellen** wurde die Voranreicherung 18 bis 20 Std. bei 37 °C bebrütet. Anschließend wurden aus der Voranreicherung 0,1 ml zu 10 ml RAPPAPORT-VASSILIADIS-Anreicherungsmedium und 10 ml zu 100 ml Selenit-Cystin-Bouillon gegeben. Die Inkubation der beiden Anreicherungen erfolgte für 20 bis 24 Std. bei 42 °C bzw. bei 37 °C.

Nach der Bebrütung wurde je Anreicherung eine Öse Material auf Brillantgrün-Phenolrot-Lactose-Saccharose-Agar (BPLS) und Xylose-Lysin-Desoxycholat-Agar (XLD) ausgestrichen und für 18 bis 24 Std. bei 37 °C inkubiert. Salmonellenverdächtige Kolonien wurden mittels der üblichen Verfahren auf ihre serologischen und biochemischen Eigenschaften untersucht. Die Typendifferenzierung der isolierten Salmonellen erfolgte im Institut für Lebensmittel, Arzneimittel und Tierseuchen (ILAT), Berlin. Bei positiven Befunden schloss sich eine MPN-Bestimmung an. Da SCHMIDT (1988) bei seinen Versuchen über das Verhalten von Salmonellen festgestellt hatte, dass nach einwöchiger Lagerzeit bei -20 °C durchschnittlich 80 % der initialen Salmonellenzahl überlebten, wurden die Proben bis zum Abschluss der Untersuchung tiefgefroren und für die MPN-Bestimmung, die maximal 7 Tage später erfolgte, über Nacht im Kühlschrank aufgetaut. Die Einwaage für die Voranreicherung in gepuffertem Peptonwasser betrug 3 x 10 g, 3 x 1 g und 3 x 0,1 g. Die weitere Vorgehensweise der Untersuchung erfolgte wie oben beschrieben.

Für den Nachweis von *Listeria monocytogenes* in 1 g Untersuchungsmaterial wurde 10 ml der homogenisierten Probe in 100 ml vollständigem Anreicherungsmedium (Listeria-Anreicherungs-Bouillon mit Listeria-Anreicherungs-Selektiv-Supplement, Oxoid) überführt und für 48 Std. bei 30 °C bebrütet. Anschließend wurde aus dieser Anreicherung ein Verdünnungsausstrich auf PALCAM-Agar angefertigt und für 48 Std. bei 37 °C inkubiert. Charakteristische Kolonien wurden mittels Katalase- und CAMP-Test, sowie Kohlenhydrat-spaltung (Rhamnose und Xylose) bestätigt.

### 3.2.3 Berechnung der Keimzahl

Die Anzahl der "koloniebildenden Einheiten" (KbE) pro Gramm wurde in Form des gewogenen arithmetischen Mittelwertes  $\bar{c}$  errechnet. Dafür wurden auf den Platten die Sektoren ausgewertet, auf denen 1 bis 50 typische Kolonien sichtbar waren. Für den Fall, dass gut voneinander abgetrennte Einzelkolonien vorlagen, wurden auch bis zu 100 Kolonien für die Berechnung herangezogen. Allerdings sollte mindestens eine Verdünnungsstufe Sektoren enthalten, auf denen 5 bis 50 Kolonien vorlagen. Die Berechnung erfolgte nach folgender Gleichung:

$$\bar{c} = \frac{\sum c}{n_1 \cdot 1 + n_2 \cdot 0,1} \cdot d \quad (\text{Farmiloe'sche Formel})$$

$\bar{c}$	gewogener arithmetischer Mittelwert der Koloniezahlen
$\Sigma c$	Summe der Kolonien aller Platten, die zur Berechnung herangezogen werden (niedrigste und nächsthöhere auswertbare Verdünnungsstufe)
$n_1$	Anzahl der Platten der niedrigsten auswertbaren Verdünnungsstufe
$n_2$	Anzahl der Platten der nächsthöheren auswertbaren Verdünnungsstufe
d	Verdünnungsfaktor der niedrigsten ausgewerteten Verdünnungsstufe

Wachsen auf dem mit der größten Probenmenge beimpften Sektor keine Kolonien, lautete das Ergebnis “weniger als  $2,0 \times 10^2$  KbE/g”, mit Ausnahme von *E. coli*, vancomycinresistenten Enterokokken, sulfitreduzierenden Anaerobiern und *Staph. aureus*. Hier lautete das Ergebnis “weniger als  $1,0 \times 10^1$  KbE/g“.

### 3.2.4 Ermittlung des pH-Wertes der Zwiebelmettwurstproben

Der pH-Wert der Rohwurstproben wurde elektrometrisch gemessen. Dabei wurde vor den Messungen das pH-Meter mit Hilfe von zwei Pufferlösungen, eine mit dem pH-Wert 4,00 und die andere mit dem pH-Wert 7,00, stets neu kalibriert.

Nach der Entnahme der Proben wurde an drei verschiedenen Stellen der pH-Wert gemessen, bei abweichenden Resultaten der Mittelwert der drei Ablesungen gebildet und das Ergebnis mit einer Stelle hinter dem Komma angegeben.

### 3.2.5 Bestimmung des D(-)- und L(+)-Milchsäuregehaltes in den Zwiebelmettwurstproben

#### 3.2.5.1 Prinzip des Verfahrens

Die Bestimmung der D(-)- und L(+)-Milchsäure erfolgte mittels UV-Test, gemäß den Bestimmungen der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG (L.07.00-15). Das Prinzip dieses Verfahrens beruht auf der Oxidation von D-Milchsäure zu Pyruvat durch Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NAD) in Gegenwart des Enzyms D-Laktat-Dehydrogenase (D-LDH) und unter Bildung von NADH. L-Milchsäure wird bei Anwesenheit von L-Laktat-Dehydrogenase ebenfalls durch NAD zu Pyruvat oxidiert. Das Gleichgewicht dieser Reaktionen liegt weitestgehend auf der Seite von Laktat. Durch Abfangen des Pyruvats

mittels Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) kann es auf die Seite von Pyruvat und NADH verschoben werden. Das gebildete NADH ist äquivalent zur D-Milchsäure- bzw. L-Milchsäuremenge und wird durch Extinktionsmessung bei 340 nm bestimmt.

### 3.2.5.2 Probenvorbereitung

Die Durchführung und Berechnung zur Bestimmung des Milchsäuregehaltes erfolgte gemäß der Test-Kit-Anweisung „D-Milchsäure, L-Milchsäure“ der Fa. Boehringer Mannheim.

Aus organisatorischen Gründen konnte die Bestimmung des Milchsäuregehaltes nicht am Tage der Probenziehung durchgeführt werden. Um eine Beeinträchtigung durch mikrobielle Stoffwechsellösungen zu vermeiden, wurden die Proben bei  $-20\text{ °C}$  eingefroren. 16 Stunden vor der Untersuchung wurden sie im Kühlraum bei  $5\text{ °C}$  langsam aufgetaut und anschließend sofort analysiert. Da EL ALAMI (1997) berichtete, dass die maximale Abweichung des Milchsäuregehaltes zwischen frischen und eingefrorenen Rohwurstproben nur 0,06 % beträgt, schien das oben beschriebene Vorgehen gerechtfertigt zu sein.

Für die Untersuchung wurden 50 g Probenmaterial in einer Moulinette sehr fein zerkleinert und davon etwa 1 g in einen Homogenisierungsbecher eingewogen, mit 20 ml 1 molarer Perchlorsäure versetzt und 10 min vermischt. Anschließend wurde dem Inhalt ca. 40 ml Aqua bidest. zugegeben und unter Rühren mit 2 molarer Kalilauge auf pH 10-11 eingestellt. Das Ganze wurde dann mit Aqua bidest. in einen 100 ml Meßkolben gespült und bis zur Markierung aufgefüllt, wobei die Fettschicht oberhalb und die wässrige Phase an der Marke standen. Das Gemisch wurde kräftig geschüttelt und zur Abscheidung des Fettes sowie zur Ausfällung des Kaliumperchlorat-Niederschlags 30 min in den Kühlschrank gestellt. Anschließend wurde die Lösung filtriert. Nach Verwerfen der ersten Milliliter wurde die unverdünnte Lösung für die Untersuchung benutzt. In den Fällen, in denen die gemessenen Extinktionsdifferenzen zu klein ausfielen ( $\Delta E \leq 0,100$ ), wurden die Probelösungen erneut hergestellt, allerdings diesmal mit einer Einwaage von 5 g homogenisierter Probe.

### 3.2.5.3 Messung und Berechnung des Milchsäuregehaltes

In die Küvetten des Photometers wurden die verschiedenen Reagenzien pipettiert. Zusätzlich wurde eine Küvette als Standard, zur Überprüfung der Reagenzien, und eine als Leerwert, gegen den die Proben gemessen wurden, bestückt. Eingefüllt wurden:

- 1,0 ml Pufferlösung zur Stabilisierung des pH-Wertes
- 20  $\mu\text{l}$  GPT-Suspension zum Abfangen des Pyruvats

- 0,2 ml NAD-Lyophilisat gemischt mit A. bidest.
- 0,1 ml Probelösung

Nach Durchmischung und 5 Minuten Wartezeit wurden die Extinktionen der Lösungen ( $E_1$ ) gemessen und die Reaktion durch Zugabe von

- 20  $\mu$ l D-Laktat-Dehydrogenase

gestartet. Nach einer Reaktionszeit von 30 Minuten erfolgte die Messung der Extinktionen von Proben, Leerwert und Standard ( $E_2$ ). Anschließend wurde zur Ermittlung des L-Milchsäuregehaltes

- 20  $\mu$ l L-Laktat-Dehydrogenase

zugegeben. Die Messung der Extinktionen ( $E_3$ ) erfolgte auch hier nach einer Reaktionszeit von 30 Minuten.

Zur Berechnung der Milchsäuregehalte wurden die Extinktionsdifferenzen  $E_2 - E_1$  (D-Milchsäure) bzw.  $E_3 - E_2$  (L-Milchsäure) für den Leerwert und für die Proben berechnet sowie die Extinktionsdifferenz des Leerwertes von der Extinktionsdifferenz der Proben abgezogen. Auf diese Weise ergaben sich  $\Delta E_{D\text{-Milchsäure}}$  bzw.  $\Delta E_{L\text{-Milchsäure}}$ .

Die Konzentration der D- und L-Milchsäure in den Proben ( $c$ ) wurde anschließend nach folgender Formel berechnet:

$$c = \frac{V \cdot MG}{\epsilon \cdot d \cdot v \cdot 1000} \cdot \Delta E(\text{g/l})$$

$V$  = Testvolumen (2,240 ml für D-Milchsäure, 2,260 ml für L-Milchsäure)

$v$  = Probevolumen (0,100 ml)

$MG$  = Molekulargewicht der zu bestimmenden Substanz (Milchsäure: 90,1)

$d$  = Schichtdicke (1,00 cm)

$\epsilon$  = Extinktionskoeffizient von NADH bei 340 nm ( $6,3 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ )

Hieraus ergibt sich für die D-Milchsäure:

$$c = \frac{2,018}{\epsilon} \cdot \Delta E \text{ (g D-Milchsäure/l Probelösung)}$$

Für die L-Milchsäure:

$$c = \frac{2,036}{\epsilon} \cdot \Delta E \text{ (g L-Milchsäure/l Probelösung)}$$

Da die Konzentration  $c$  der Menge an Milchsäure in Gramm pro Liter Probelösung entspricht, wurde daraus der Milchsäuregehalt der Probe in g/100g, was der üblichen Angabe entspricht, mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Gehalt}_{\text{D- bzw. L-Milchsäure}} = \frac{c (\text{D- bzw. L-Milchsäure}) \cdot 100}{\text{Einwaage (Probe)}}$$

### 3.2.6 Nachweis vancomycinresistenter Enterokokken

Für den Nachweis vancomycinresistenter Enterokokken (VRE) fanden sowohl das Drop-Plating als auch ein Anreicherungsverfahren Anwendung.

#### 3.2.6.1 Drop-Plating

Von dem unter Punkt 3.2.2. hergestelltem Homogenisat und dessen Verdünnungsreihe wurden anfangs jeweils im Doppelansatz 0,1 ml auf ZATK-Agar mit einem Zusatz von 16 mg Vancomycin aufgetragen. Im Laufe des Versuches wurde die Menge auf 1 ml erhöht, um eine höhere Nachweisrate zu erzielen. Die Bebrütung erfolgte dann für 24 h bei 37 °C und für weitere 24 h bei Zimmertemperatur. Verdächtige Kolonien (maximal 5) wurden anschließend auf "einfachem" ZATK-Agar überimpft, um für die folgenden Untersuchungsgänge genügend Material zu erhalten.

#### 3.2.6.2 Anreicherungsverfahren

Die Anreicherung vancomycinresistenter Enterokokken erfolgte durch Zugabe von 1 g Probenmaterial in 9 ml Chromocult-Enterokokken-Bouillon (Merck, Art.-Nr. 110294). Diese wurde bei 37 °C für 48 Stunden bebrütet, 1 Öse davon anschließend auf oben beschriebenen vancomycin-haltigen ZATK-Agar ausgestrichen und für 24 h bei 38 °C und für weitere 24 h bei Zimmertemperatur bebrütet. Das so herangezüchtete Koloniematerial wurde zur Überprüfung, ob tatsächlich Enterokokken vorlagen, auf ZATK-Agar überimpft.

### 3.2.6.3 Weitere Vorgehensweise beider Ansätze

Die gemäß 3.2.6.1 und 2 erhaltenen Kolonien wurden auf das Vorhandensein des Enzyms Katalase getestet. Bei negativem Ergebnis wurden maximal 5 Kolonien auf Columbia-Blut-Agar übertragen und für 24 h bei 37 °C bebrütet. An die Inkubation schloss sich eine Überprüfung der Hämolyse-Fähigkeit sowie der Pyrase-Test der Fa. Oxoid an. Dieser Test beruht darauf, dass Enterokokken das Enzym Pyrase bilden, welches Pyroglutaminsäure hydrolysiert und dessen Aktivität durch Rotfärbung nach Zugabe eines Farbewicklers angezeigt wird. Hierzu wurde etwas Koloniematerial auf das Testbriefchen (mit L-Pyroglutaminsäure beschichtet) gegeben, mit 3 Tropfen Pufferlösung versetzt und nach 5 min Wartezeit mit dem Farbewickler auf das Vorhandensein des Enzyms Pyrase getestet. Mit den Kolonien, deren Material sich pink anfärbte, wurden sowohl eine einfache BHI-Bouillon als auch eine BHI-Bouillon mit einem Zusatz von 6,5 % NaCl beimpft. Für beide erfolgte die Bebrütung für 48 h bei 37 °C. Kam es zum Wachstum in der BHI-Bouillon mit 6,5 % NaCl, wurden jeweils 2 Tropfen der beimpften einfachen BHI-Bouillon in 4 verschiedene 1 %ige Zuckerlösungen (L-Arabinose, Mannitol, Sorbitol und D-Raffinose), zwecks Speziesdifferenzierung, überführt. Die auf diesem Wege differenzierten Enterokokken wurden zur späteren Überprüfung ihrer Vancomycin-Resistenz bei -70 °C tiefgefroren.

### 3.2.6.4 Überprüfung der Vancomycin-Resistenz

Da bei der Überimpfung des Koloniematerials vom ZATKV-Agar auf den ZATK-Agar nicht-vancomycinresistente Enterokokken, deren Wachstum lediglich unterdrückt wurde, wieder angezüchtet und somit fälschlicherweise als resistent eingestuft werden konnten, schloss sich zum Ausschluss falsch-positiver VRE's bei sämtlichen, tiefgefrorenen Enterokokken eine Überprüfung ihrer Resistenz an. Hierfür erfolgte zunächst eine Anreicherung in BHI-Bouillon für 24 Std. bei 37 °C. Von der beimpften Bouillon wurde jeweils eine Öse auf ZATKV-Agar mit einem Zusatz von 8 mg und von 16 mg Vancomycin ausgestrichen und wie bereits unter Punkt 3.2.7.1. beschrieben bebrütet. Stämme, die auf beiden Nährböden kein Wachstum zeigten, besaßen offenbar keine Vancomycin-Resistenz.

### 3.3 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse wurden sowohl als Stabdiagramme gemäß ihrer Häufigkeitsverteilung, als auch in Form von Box- und Whisker-Plots (LORENZ, 1984) dargestellt, mit den statistischen Kenngrößen Maximum, Minimum und Quartilabstand als Streuungsmaß (Box zwischen 1. und 3. Quartil = zentrale 50 %). Lagen bei den einzelnen Keimgruppen nicht mehr als 25 % der Proben unterhalb der Nachweisgrenze, so wurde zusätzlich zum Median, der durch Ausreisser in der Regel kaum beeinflusst wird, der arithmetische Mittelwert eingetragen. Bei der Ermittlung des arithmetischen Mittels sowie der Standardabweichung wurden Proben, die unterhalb der Nachweisgrenze lagen, zunächst mit der halben Nachweisgrenze veranschlagt und dieser Wert dann logarithmiert.

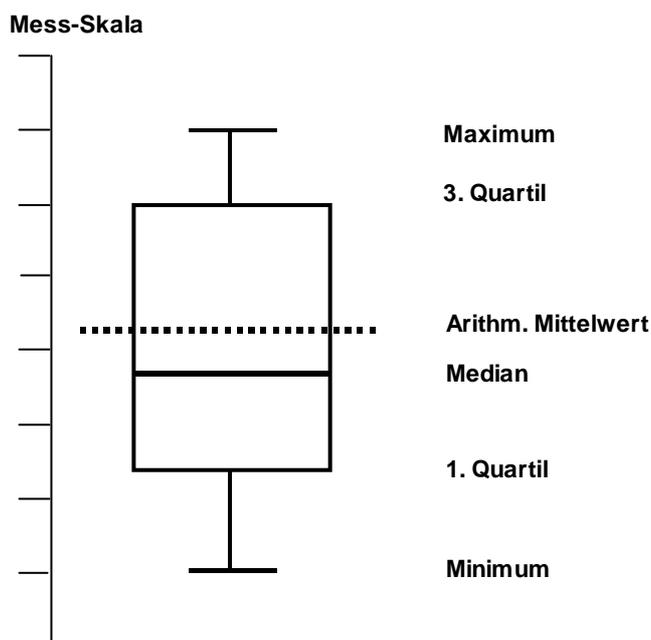


Abb. 2: Box- und Whisker-Plot