

Lothar Beutin¹, Ann-Christin Scherwinski², Silke Ruppel²

Kontaminationswege und Nachweis von humanpathogenen *Escherichia coli* aus pflanzlichen Lebensmitteln

Contamination pathways and detection of human pathogenic *Escherichia coli* from plant foods

Zusammenfassung

Seit dem Ausbruch mit enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC) O104:H4 im Sommer 2011 in Deutschland sind pflanzliche Lebensmittel als mögliche Infektionsquelle für humanpathogene *E. coli* in das Licht der Öffentlichkeit gerückt. Die Suche nach der Infektionsquelle des EHEC O104:H4 Erregers, der für mehr als 4000 Erkrankte, für über 800 Fälle von Nierenversagen und für 53 Todesfälle verantwortlich war, erwies sich als schwierig, obwohl die für Diagnostik relevanten Eigenschaften anhand der Isolate aus den Patienten früh bekannt waren. Epidemiologische Untersuchungen deuteten auf pflanzliche Lebensmittel als mögliche Infektionsquelle und nach den zu Unrecht verdächtigten Gurken konnten schließlich aus Bockshornkleesamen hergestellte Keimsprossen eines bestimmten Herstellers als primäre Infektionsquelle bestimmt werden. Die Diagnostik pathogener *E. coli* aus pflanzlichen Lebensmitteln ist ungleich schwieriger als aus tierischen Quellen, für die letzteren gibt es seit Jahren amtliche Untersuchungsverfahren und eine Vielzahl von publizierten Methoden. Untersuchungsmethoden, die für Milch und Fleischprodukte konzipiert wurden, lassen sich jedoch auf rohe pflanzliche Lebensmittel schlecht übertragen. Die Gründe dafür liegen zum einen an der Menge und der Zusammensetzung der Begleitflora von Mikroorganismen, die bei Pflanzen völlig anders ist, als bei tierischen Produkten. Dazu kommt, dass die natürliche mikrobielle Kontamination bei zum Rohverzehr bestimmten Pflanzen sich je nach Kategorie (Obst, Gemüse, Mischsalat und Sprossen)

hinsichtlich ihrer Menge, Eigenschaften und Zusammensetzung stark unterscheidet. *E. coli* kommen als Kontaminanten bei pflanzlichen Lebensmitteln ebenso vor, häufig jedoch in so geringen Mengen, dass spezifische Anreicherungsverfahren notwendig sind, um mögliche pathogene *E. coli* wie EHEC überhaupt zu erkennen. Die weitere Hürde liegt in der Isolierung verdächtiger *E. coli* aus einer Fülle von natürlichen Begleitorganismen. Verfahren der quantitativen PCR (qPCR, Real-Time PCR) haben sich bewährt, um auch geringe Konzentrationen von *E. coli* in pflanzlichem Untersuchungsmaterial nachzuweisen und gleichzeitig mögliche Pathogenitätseigenschaften bei diesen Keimen zu erkennen. Auch für die Isolierung der nachgewiesenen pathogenen *E. coli* müssen an die Lebensmittelmatrix Pflanze angepasste Methoden gewählt werden, die hier ebenfalls vorgestellt werden.

Stichwörter: *Escherichia coli*, humanpathogen, Kontamination, Pflanzen, Sprossen, Lebensmittel, Phytoflora, EHEC, Diagnostik, Virulenzfaktoren, quantitative real-time PCR, Anreicherung, Selektivmedien

Abstract

With the massive EHEC O104:H4 outbreak in summer 2011, vegetables became interesting to the German public because of their possible role as a source of infections with enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC). The search for the source of infection with EHEC O104:H4,

Institut

FB Biologie, Chemie, Pharmazie, Institut für Biologie – Mikrobiologie, Freie Universität, Berlin¹
Leibniz-Institut für Gemüse- und Zierpflanzenbau Großbeeren/Erfurt e.V., Großbeeren²

Kontaktanschrift

Dr. Silke Ruppel, Leibniz-Institut für Gemüse- und Zierpflanzenbau Großbeeren/Erfurt e.V., Theodor-Echtermeyer-Weg 1, 14979 Großbeeren, E-Mail: ruppel@igzev.de

Zur Veröffentlichung angenommen

4. Januar 2016

which was responsible for more than 4000 diseases, more than 800 cases of renal failure and 53 deaths, proved difficult, although the relevant diagnostic properties based on the isolates from the patients were early known. Epidemiological studies pointed to plant foods as possible source and after the wrongly suspected cucumbers, fenugreek sprouts from a particular manufacturer were identified as the primary source of infection. The diagnosis of pathogenic *E. coli* from plant foods is more difficult than from animal sources, for the latter official control procedures and a variety of methods are published since many years. Investigation methods that were designed for dairy and meat products are not well suitable for testing raw foods of plant origin. The reasons are partly due to the quantity and composition of the accompanying flora of microorganisms, which is completely different in plants than in animal products. Depending on the raw food category (fruits, vegetables, mixed salad and sprouts) the natural microbial contamination of certain plants differs largely in its amount, characteristics and composition. *E. coli* is often present as contaminant in plant foods, but often in such small quantities that specific enrichment methods are needed to identify potential pathogenic *E. coli* types such as EHEC. The other hurdle lies in the isolation of suspected *E. coli* from an abundance of natural accompanying organisms. Quantitative PCR (qPCR, real-time PCR) methods have been proven to detect even low levels of *E. coli* in plant tissue and simultaneously to identify possible human pathogenic bacteria. Finally, for the isolation of pathogenic *E. coli* from plants specific methods adapted to this particular food matrix must be chosen. These are also presented here.

Key words: *Escherichia coli*, human pathogenic, contamination, plants, sprouts, food, plant flora, EHEC, diagnostic, virulence factor, quantitative real-time PCR, accumulation, different media

Pflanzliche Lebensmittel als Infektionsquelle

Infektionen des Menschen mit darmpathogenen Bakterien, wie *E. coli* und Salmonellen, stellen weltweit ein bedeutendes Gesundheitsproblem dar. Der Verzehr bakteriell kontaminierter Lebensmittel ist der bedeutendste Übertragungsweg für die Erreger auf den Menschen (MEAD et al., 1999; MARTIN und BEUTIN, 2011; BAVARO, 2012). Neben Lebensmitteln tierischen Ursprungs spielen auch roh verzehrte pflanzliche Lebensmittel dabei eine wichtige Rolle (OLAIMAT und HOLLEY, 2012). Nach einer Untersuchung aus den USA zur Bedeutung der fünf wichtigsten Lebensmittelproduktgruppen (pflanzliche Erzeugnisse, Rindfleisch, Geflügel, Meeresfrüchte und Eier) als Quelle bakterieller Infektionen, wurden nach Meeresfrüchten pflanzliche Erzeugnisse als am häufigsten belastet erkannt (FRANZ und VAN BRUGGEN, 2008). Als häufigste bakterielle Erreger wurden Salmonellen, pathogene *E. coli*, Listerien, *Bacillus cereus*, *Vibrio cholerae*, Shigellen, *Campylobacter*, Yersinien, Aeromonaden und

Clostridien genannt. Salmonellen und pathogene *E. coli* gehören zur Gruppe der am häufigsten isolierten bakteriellen Erreger (OLAIMAT und HOLLEY, 2012; YARON und ROMLING, 2014).

Lebensmittel pflanzlichen Ursprungs sind schon seit langem als Quelle von Krankheitsausbrüchen durch eine Vielzahl bakterieller Erreger (darunter auch *Salmonella* und *E. coli*) bekannt (KLEPZIG et al., 1999; OLAIMAT und HOLLEY, 2012). Neuere Daten des Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (CDC, 2015) geben einen aktuellen Überblick für die USA zu Krankheitsausbrüchen und damit assoziierte Lebensmittel. Für das Gebiet der EU waren nach Angaben der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA) im Zeitraum 2008–2011 Lebensmittel nicht-tierischen Ursprungs an 10% der Ausbrüche, 18% der Erkrankungen und 5% der Todesfälle durch humanpathogene Mikroorganismen beteiligt. Auf der bakteriellen Erregerseite stehen hier Salmonellen und pathogene *E. coli* in erster Linie. (ANONYMUS, 2002a; EFSA, 2013).

Als verantwortliche Faktoren für die beobachtete Zunahme von Infektionen durch Verzehr pflanzlicher Lebensmittel wird zum einen die zunehmende Globalisierung des Handels mit Lebensmitteln genannt (ANONYMUS, 2002a; BAVARO, 2012; OLAIMAT und HOLLEY, 2012). Zum anderen Produktionsverfahren, wie die Herstellung von verzehrfertigen Fertigprodukten durch mechanisches Zerkleinern (z.B. Schnittsalate, Rohkostsalate, Fertigsalate, Frischkostsalate, Mischsalate). Hierbei kommt es zu Kreuzkontaminationen im Produktionsprozess, und das Wachstum der Erreger wird durch das Austreten von pflanzlichen Säften aus den Schnittstellen begünstigt (ANONYMUS, 2002a; FRANZ und VAN BRUGGEN, 2008).

Diese Produktionsbedingungen und der Trend zu Fertiggerichten begünstigen die Vermehrung von enteropathogenen Bakterien, die sich auf intakten Pflanzen nicht oder schlecht vermehren können (PAN und SCHAFFNER, 2010). Ähnliche, die Bakterienvermehrung begünstigende Bedingungen liegen bei der Herstellung von Keimsporen vor (GANDHI et al., 2001).

Hinzu kommt, dass der Trend Gemüse roh zu verzehren seit Jahren zunimmt (ANONYMUS, 2002a; WALSEMANN, 2005; OLAIMAT und HOLLEY, 2012) und damit die Wahrscheinlichkeit steigt, sich über roh verzehrte pflanzliche Lebensmittel zu infizieren. Verbesserte Nachweismethoden für bakterielle Erreger tragen dazu bei, dass mehr durch Infektionserreger belastete Lebensmittel als solche auch erkannt werden (FRANZ und VAN BRUGGEN, 2008).

Mit Ausnahme der EHEC (enterohämorrhagische *E. coli*) O104:H4 Ausbruchsuntersuchung im Sommer 2011, bei der 1069 Proben von Gurken, Tomaten und Blattsalate auf EHEC getestet wurden (ANONYMUS, 2011a), werden in Deutschland pflanzliche Lebensmittel eher selten untersucht (HARTUNG et al., 2015). Untersuchungen im Nationalen Referenzlabor für *Escherichia coli* (NRL-*E. coli*) am Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) konnten zeigen, dass bisher vorliegende Methoden (§ 64 LFGB) zum Nachweis von EHEC aus Lebensmitteln für pflanzliche Lebensmittel ungeeignet sind, da diese Matrix an die

Diagnostik andere Anforderungen stellt, als tierische Produkte (TZSCHOPPE, 2010). Für tierische Produkte bestehen bereits seit langem derartige Richtlinien (ANONYMUS, 2006).

Die Kontamination pflanzlicher Erzeugnisse mit humanpathogenen Bakterien wird generell unterschätzt, da die bisher entwickelten Routineverfahren besonders für den Nachweis geringer Keimzahlen nur bedingt geeignet sind (YARON und ROMLING, 2014). Amtliche Richtlinien zur Identifizierung und Charakterisierung von EHEC und anderen Shiga-Toxin produzierenden *E. coli* (STEC) nach § 64 LFGB aus pflanzlichen Lebensmitteln werden seit 2012 vom Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) erarbeitet.

Kontaminationswege bei Pflanzen

Im Gegensatz zu tierischen Wirten stellen obligat humanpathogene Bakterien nicht die natürliche Besiedlungsflora bei Pflanzen dar. Jedoch zeigten Untersuchungen, dass humanpathogene Bakterien wie Salmonellen unter bestimmten Umständen auch dauerhaft mit Pflanzen assoziiert sein können (TEPLITSKI et al., 2011). Die Kontamination pflanzlicher Lebensmittel mit humanpathogenen Enterobacteriaceen wie *Salmonella* und darmpathogene *E. coli* kann an verschiedenen Stellen entlang der Produktionskette bis zum Verbraucher erfolgen (FRANZ und VAN BRUGGEN, 2008; BERGER et al., 2010; BEUTIN und FACH, 2014). Organischer Dünger und fäkal kontaminiertes Wasser werden als Hauptkontaminationsquelle beim Anbau der Pflanzen genannt (ANONYMUS, 2002a; OLAIMAT und HOLLEY, 2012). Es wird angenommen, dass die Kontamination in 20% der Fälle beim Anbau bis zur Ernte erfolgt, die verbleibenden 80% werden auf unsachgemäße Behandlung im weiteren Produktionsweg bis zum Verbrauch zurückgeführt (YARON und ROMLING, 2014).

Landwirtschaftliche Nutztiere und Wild, einschließlich Vögel und Insekten sind die wichtigste Quelle für den Eintrag von pathogenen Enterobacteriaceen in die Umwelt, die von ihren natürlichen Trägern mit dem Kot ausgeschieden werden. Hierdurch kommt es zur weitläufigen Kontamination von Ackerböden, Oberflächenwasser, Brunnenwasser und landwirtschaftlichen Gerätschaften. Die Erreger können über lange Zeiträume von mehr als 100 Tagen auf den Pflanzen und in der Umwelt überleben (FREMAUX et al., 2008; YARON und ROMLING, 2014). Eine kontaminierte Umwelt dient wiederum als Infektionsquelle für Personen und Tiere, die ihrerseits die Erreger weiter verbreiten können. Durch Vögel und Insekten werden die Erreger über hunderte von Kilometern auf große geographische Räume verstreut, sodass auch in landwirtschaftlich nicht genutzten Gebieten mit ihrem Vorkommen gerechnet werden muss (BEUTIN und FACH, 2014).

Die Kontamination der Pflanze kann bereits auf dem Acker durch Düngung, Bewässerung, Insekten als Überträger und Kontamination mit Fäzes erfolgen. Die Anheftung und Besiedlung der Pflanze mit Salmonellen und pathogenen *E. coli* wird durch verschiedene bakterielle

Faktoren wie Typ 3 Sekretionssystemeffektoren (T3SS), Flagellen, Fimbrien und Lipopolysacchride (O-Antigen) vermittelt (BERGER et al., 2010; SALDANA et al., 2011; CHITARRA et al., 2014; YARON und ROMLING, 2014). Hierbei bilden sich Biofilme, die das Überleben der Bakterien begünstigen (Schutzfunktion) und von den Pflanzen durch Waschen mit chloriertem Wasser und anderen antimikrobiellen Substanzen nicht effektiv entfernt werden können (ALBRECHT et al., 1994; YARON und ROMLING, 2014). Untersuchungen zeigen, dass die Bakterien weniger über Aufnahme durch die Wurzel von den Pflanzen internalisiert werden, als über die Blätter, beispielsweise durch Berieselung mit bakteriell kontaminiertem Wasser (SHARMA et al., 2009; ZHANG et al., 2009).

Über die Spaltöffnungen der Blätter können die Bakterien internalisiert werden (BERGER et al., 2010). Die Aufnahme von Salmonellen und EHEC O157 in essbare Pflanzenteile wurde bereits für Tomaten, verschiedene Sorten von Keimssprossen, Gerste und Blattsalat nachgewiesen (FRANZ und VAN BRUGGEN, 2008). Die Kolonisation verschiedener Nutzpflanzen mit Salmonellen und *E. coli* O157 erfolgt bei relativ kurzer Expositionszeit, dabei wurden Zeiträume von 30 Sekunden bis vier Stunden genannt (YARON und ROMLING, 2014). Die Erreger können über lange, für den Verzehr relevante Zeiträume (14 – > 200 Tage) auf der Oberfläche und intern auf den Pflanzen lebensfähig bleiben (BERGER et al., 2010; YARON und ROMLING, 2014). Über bakterielle Regulationsmechanismen, die die Kolonisation begünstigen, Resistenz gegen oxidativen Stress erzeugen und chemotaktische Mechanismen findet eine Anpassung der Erreger an den Wirt „Pflanze“ statt (DUBLAN MDE et al., 2014). Es ist noch ungeklärt, inwieweit bei der Kolonisation und Internalisierung der Bakterien zwischen verschiedenen Pflanzenspezies Unterschiede bestehen. Der Lebensraum (Rhizosphäre) und Teile der Pflanze (Phyllosphäre) stellen unterschiedliche Habitate für Mikroorganismen dar. In der nährstoffreichen Rhizosphäre werden $10^6 - 10^9$ Bakterien/g Wurzelmaterial gefunden, in der nährstoffarmen und Umweltflüssen stärker ausgesetzten Phyllosphäre finden sich dagegen nur $10^3 - 10^7$ Bakterien/g Blattmaterial (HALLMANN et al., 2001). Über kultivierungsunabhängige Verfahren wurden für vier Pflanzenarten mittels eines Chloroplasten ausschließenden Primer Paares und quantitativer Real-Time PCR bakterielle 16S rDNA Kopienzahlen (cn) bestimmt (RASTOGI et al., 2010). Für die Blattsalate *Cichorium endivia* und *Lactuca sativa* lag die ermittelte Bakterienzahl bei $6.85 \pm 0.417 \log \text{cn g}^{-1} \text{FM}$ bzw. $6.75 \pm 0.32 \log \text{cn g}^{-1} \text{FM}$. Ähnliche Größenordnungen wurden an den Kräutern *Thymus vulgaris* ($6.31 \pm 0.69 \log \text{cn g}^{-1} \text{FM}$) und *Lepidium sativum* ($7.30 \pm 0.08 \log \text{cn g}^{-1} \text{FM}$) in der Phyllosphäre nachgewiesen (S. RUPPEL, A.C. SCHERWINSKI, unveröffentlicht).

Pseudomonaden und *Enterobacter*, die zur natürlichen Phytoflora zählen, haben nachgewiesen antagonistische Effekte auf Salmonellen und *E. coli* (COOLEY et al., 2003; YAO et al., 2014). Die Mechanismen, die dabei eine Rolle spielen, sind nicht vollständig bekannt (TEPLITSKI et al., 2011). Auf der anderen Seite haben Mikroorganismen

und Pilze, die an Reifungs- und Verfallsprozessen der Pflanzen beteiligt sind, eine begünstigende Wirkung auf die Vermehrung von (pathogenen) Enterobacteriaceen wie Salmonellen und *E. coli* O157 (TEPLITSKI et al., 2011). Für die Matrix vorgeschnittene Mischsalate konnte eine Reduktion der inokulierten EHEC bei den üblichen Lagerungstemperaturen (< 10°C) innerhalb der Mindesthaltbarkeitsgrenze beobachtet werden (TZSCHOPPE et al., 2012). Die Phytoflora nahm in diesem Zeitraum zu, allerdings blieb ungeklärt, welche Mechanismen bei der Reduktion der inokulierten EHEC im Einzelnen eine Rolle spielen (TZSCHOPPE et al., 2012).

Die Einhaltung von Kühltemperaturen hat einen limitierenden Effekt auf Verderb fördernde Bakterien und pathogene Erreger, wohingegen Aufbewahrung unter Schutzgas in dieser Hinsicht keinen Effekt zeigt (NGUYEN-THE und CARLIN, 1994; OLAIMAT und HOLLEY, 2012). Bei Kühltemperaturen vermehrt sich die native bakterielle Flora (Enterobacteriaceen und Pseudomonaden) weiterhin, sodass Keimmengen von 10⁷/g auch innerhalb der Mindesthaltbarkeitsgrenze erreicht werden (BOMAR, 1988; ALBRECHT et al., 1994; LACK et al., 1996; KLEPZIG et al., 1999; TZSCHOPPE, 2010; TZSCHOPPE et al., 2012). Raumtemperaturen um die 22°C begünstigen bereits das Wachstum von darmpathogenen Keimen. Bei diesen Temperaturen wurden für Salmonellen und enteropathogene *E. coli* Titeranstiege um 2 bis 3 Zehnerpotenzen innerhalb von 48 Stunden beobachtet. Damit werden Keimmengen erreicht, die die minimale Infektionsdosis für die Erreger weit übersteigen können (BOMAR, 1988; NGUYEN-THE und CARLIN, 1994). Allerdings wurden diese Untersuchungen mit einzelnen Pflanzenspezies gemacht und sind nicht generell auf alle Pflanzenspezies übertragbar (NGUYEN-THE und CARLIN, 1994).

Auch andere pflanzliche Nahrungsmittel wie verschiedene Fruchtarten, verarbeitete Früchte, Fruchtsäfte und Gemüse sind bereits im Zusammenhang mit Ausbrüchen (*Salmonella*, pathogene *E. coli* und andere Mikroorganismen) in Zusammenhang gebracht worden (ANONYMUS, 2002a; BERGER et al., 2010). Für Früchte ist von besonderer Bedeutung, dass während des Reifeprozesses bis hin zum Verderb ein steigendes Risiko für eine Kontamination mit enteropathogenen Bakterien besteht (TEPLITSKI et al., 2011). Bei Pfirsichen und Pflaumen reichten Expositionszeiten von 30 sec bis zu einer Minute, um mit *E. coli* O157 und Salmonellen erfolgreich kolonisiert zu werden (YARON und ROMLING, 2014). Aus diesen Befunden ergibt sich ein hohes Risiko für eine Kontamination (Eintrag durch Mensch, Umwelt und Verarbeitungsprozesse) von Früchten, deren Verarbeitungsprodukten und anderen roh verzehrten pflanzlichen Lebensmitteln entlang der Stationen von der Ernte über den Handel bis zum Verzehr (OLAIMAT und HOLLEY, 2012).

Kontaminationsgefährdung bei Keimspossen

Eine spezielle Situation liegt bei der Herstellung von Keimspossen vor. Verschiedenste Sorten und Mischun-

gen von Keimspossen (Azukibohnen, Bockshornklee, Luzerne, Broccoli, Buchweizen, Kichererbsen, Kresse, Leinsamen, Senf, Erbsen, Zwiebeln, Mungbohnen, Quinoa, Rettich, Roggen, Sesam, Sonnenblumen und Weizen) finden sich als Rohkostbeilage zu vielen Gerichten. Keimspossen als Nebenbeilage zu Hauptgerichten werden von den Verbrauchern in der Erinnerung häufig nicht wahrgenommen und finden auch zu wenig Beachtung bei epidemiologischen Untersuchungen bei lebensmittelassoziierten Erkrankungsfällen. Beide Faktoren trugen dazu bei, dass die für den EHEC O104:H4 Ausbruch verantwortlichen Nahrungsmittel erst relativ spät identifiziert wurden (EFSA, 2011; ADOLPHS et al., 2012).

Es ist bereits seit langem bekannt, dass Keimspossen mit einem hohen Risiko für die Kontamination mit Salmonellen und pathogenen *E. coli* behaftet sind (ANONYMUS, 1999; ANONYMUS, 2002a). Die technischen Begebenheiten der Sprossenproduktion (Zeitdauer bis zur Auskeimung, Temperatur, Feuchtigkeit und Nährstoffe) begünstigen die Kontamination und die Proliferation von darmpathogenen Keimen, wie Salmonellen und pathogene *E. coli*, wobei Keimzahlen von bis zu 10¹¹KbE/g erreicht werden (TAORMINA et al., 1999; ANONYMUS, 2002a; SIKIN et al., 2013).

Durch die Auskeimung im wässrigen Milieu bricht die Samenschale als natürliche Barriere gegen Bakterien auf. Nährstoffe werden ausgeschieden und abhängig von der Temperatur können sich pathogene Enterobacteriaceen an die Keimlinge anheften und vermehren. In der gewerbsmäßigen Produktion übliche Dekontaminationsverfahren zeigen dagegen keine oder nur mäßige Wirkung auf pathogene Bakterien (TAORMINA und BEUCHAT, 1999; DING et al., 2013; SIKIN et al., 2013).

Keimspossen gelten daher seit langem als Lebensmittel, die mit hohem Risiko belastet sind (ANONYMUS, 2002a). Dementsprechend wurde auch über eine Vielzahl von Ausbrüchen an bakteriellen Infektionen durch Sprossenverzehr berichtet (ANONYMUS, 1999; ANONYMUS, 2002a; BERGER et al., 2010). Für die USA werden 10% der durch pflanzliche Nahrungsmittel verursachten Ausbrüche Keimspossen zugeordnet (SIKIN et al., 2013). Die weltweit bisher größten Ausbrüche mit EHEC (EHEC O157:H7 in Japan 1996, EHEC O104:H4 in Deutschland 2011) konnten auf EHEC-kontaminierte Keimspossen zurückgeführt werden (MICHINO et al., 1999; BEUTIN und MARTIN, 2012).

Nach eigenen Untersuchungen mit Bockshornkleesamen hängt die Vermehrung zugesetzter pathogener *E. coli* während der Auskeimung von Sprossen aus den Samen stark von der Temperatur ab, bei der die Auskeimung der Sprossen erfolgt. Die gewerbsmäßige Sprossenproduktion erfolgt bei Temperaturen zwischen 32 – 35°C für 4 – 12 h (Einweichen) und 25 – 30°C für 4 – 14 Tage (Auskeimung) (FRIEDRICH et al., 2011), wodurch nach eigener Erfahrung die Vermehrung von (pathogenen) *E. coli* extrem begünstigt wird (L. BEUTIN, unveröffentlicht). Hinzu kommt, dass schon eine Kontamination des für das Einweichen der Samen verwendeten Quellwassers mit geringen Mengen an pathogenen *E. coli*

(< 100 Kbe (Koloniebildende Einheiten, colony-forming unit CFU) auf 150 ml Leitungswasser für 6 h Einwirkungszeit) eine Anheftung der Keime an die Samen stattfindet, die nach vier Tagen Keimung auf den Bockshornkleesprossen mit der beschriebenen PCR-Methode (TZSCHOPPE et al., 2012) nachgewiesen werden können (L. BEUTIN, unveröffentlicht). Daraus folgt, dass auch nur eine geringe Kontamination des zur Quellung der Samen verwendeten Wassers mit pathogenen *E. coli* ausreicht, um eine massive Vermehrung dieser Keime auf den aus den Samen gezüchteten Keimsprossen zu gewährleisten. Sinnentsprechend wird von der Deutschen Gesellschaft für Krankenhaushygiene (DGKH) die Verwendung hygienisch einwandfreien Wassers für die Sprossenproduktion empfohlen (DGKH, 2012). Die Bedeutung der Hygiene wurde beim EHEC O104:H4 im Sommer 2011 Ausbruch offensichtlich, da sich unter den in der Sprossenproduktion beschäftigten Mitarbeitern auch asymptomatische Ausscheider von EHEC O104:H4 befanden (ADOLPHS et al., 2012; DGKH, 2012).

Methodenentwicklung zur Diagnostik von pathogenen *E. coli* aus pflanzlichem Untersuchungsmaterial

Bei der Kontamination von pflanzlichen Lebensmitteln spielen sehr unterschiedliche Mikroorganismen (Bakterien, Viren, Pilze, Protozoen) eine Rolle. Die hier beschriebenen diagnostischen Forschungs- und Entwicklungsmöglichkeiten fokussieren sich auf pathogene *E. coli* und treffen im begrenzten Maße auch auf andere Enterobacteriaceen zu.

Die Assoziation von tierischen und pflanzlichen Nahrungsmitteln mit Mikroorganismen ist produktionsbedingt unumgänglich. Bei pflanzlichen Nahrungsmitteln hat die assoziierte Phytoflora zudem eine Schutzfunktion gegen pathogene Enterobacteriaceen wie *E. coli* und Salmonellen (COOLEY et al., 2003; TEPLITSKI et al., 2011; GU et al., 2013; YAO et al., 2014). Pflanzenproduktion in Abwesenheit der natürlichen Phytoflora (beispielsweise auf sterilem Substrat) begünstigt die Besiedlung der Pflanze durch pathogene Enterobacteriaceen wie Salmonellen und *E. coli* O157 (COOLEY et al., 2003; GU et al., 2013). Die Schutzfunktion durch die Phytoflora ist jedoch nicht absolut, sodass auch bei erntefrischen Pflanzen durchaus mit geringen Keimmengen an (pathogenen) *E. coli* und Salmonellen gerechnet werden muss. Dagegen können technisch prozessierte pflanzliche Lebensmittel (Schnittsalate, Sprossen) durchaus höhere Keimmengen an humanpathogenen Enterobacteriaceen enthalten, ebenso wie überreife und im Verderb befindliche Feldfrüchte (TEPLITSKI et al., 2011).

Zur Untersuchung der tatsächlichen Belastung von zum Rohverzehr vorgesehenen pflanzlichen Lebensmitteln mit pathogenen Enterobacteriaceen müssen Methoden eingesetzt werden, welche die Erkennung auch geringer Mengen (< 10 Kbe/25 g) von pathogenen *E. coli* und Salmonellen gewährleisten, da die für eine Infektion nötige Keimzahl für EHEC O157:H7 auf unter 700 KbeE

ermittelt wurde (TUTTLE et al., 1999; ANONYMUS, 2012). Die von der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (ANONYMUS, 2011b) vorgeschriebenen Richt- und Warnwerte für *E. coli* für Mischsalate 1×10^2 /g beziehungsweise 1×10^3 /g (nach Revision 2014 nunmehr 1×10^1 /g beziehungsweise 1×10^2 /g) bieten für die Infektionsprophylaxe nur eingeschränkte Sicherheit, da die potenzielle Anwesenheit pathogener *E. coli* nicht mit der Menge der nachgewiesenen Bakterien korreliert und die Bedingungen für eine mögliche Proliferation der Keime im Lebensmittel nach Verkauf an den Konsumenten (Unterbrechen der Kühlkette, Zeit bis zum Verzehr) sehr unterschiedlich sein können. Im Gegensatz zu anderen Keimen gelten für EHEC auch keine Toleranzgrenzen, sodass die Nachweismethoden geeignet sein müssen, die Abwesenheit des Erregers in der jeweiligen Menge (in der Regel 25 g) des geprüften Untersuchungsmaterials zu gewährleisten, wie es auch für Salmonellen verlangt wird (ANONYMUS, 2011b).

Diagnostik von EHEC aus Mischsalat

Die für die Lebensmittelüberwachung bisher publizierten Methoden zur Erkennung pathogener *E. coli* (in der Regel EHEC) wurden für tierische Lebensmittel konzipiert und erwiesen sich als ungeeignet für die Untersuchung von pflanzlichem Untersuchungsmaterial (TZSCHOPPE, 2010; TZSCHOPPE et al., 2012). Auf der Grundlage dieser Untersuchungen wurde eine auf der quantitativen real-time PCR (qPCR) basierende Methode entwickelt, die die besonderen Voraussetzungen pflanzlicher Lebensmittel mehr berücksichtigt und die auf der Homepage des Bundesinstituts für Risikobewertung veröffentlicht ist (BEUTIN, 2011). Diese Methode wurde für vorgeschchnittene Mischsalate konzipiert und evaluiert (TZSCHOPPE, 2010; TZSCHOPPE et al., 2012). Die besondere Spezifität der Methode liegt in der mikrobiellen Anreicherung, mit der auch geringe Mengen (< 10 Kbe/25 g) pathogener *E. coli* vor dem Hintergrund der in hohen Keimmengen vorkommenden Phytoflora (10^7 /g) detektiert und isoliert werden sollen. Der Nachweis von EHEC O104:H4 im Rahmen der Ausbruchuntersuchungen im Sommer 2011 durch qPCR ist in Abb. 1 dargestellt.

Bei der Wahl der Anreicherungsverfahren muss beachtet werden, dass pathogene Enterobacteriaceen auf Pflanzen, die nicht ihrem natürlichen Habitat entsprechen, einem physikalisch-chemischen Stress durch die Faktoren UV-Strahlung, Austrocknung, pflanzliche Abwehrmechanismen, kompetierende Mikroorganismen und Nährstoffmangel unterliegen. Gestresste Keime sind jedoch nicht immer direkt auf Selektivmedien, die Hemmstoffe enthalten, wie beispielsweise modifizierte Tryptose-Soya-Bouillon (mTSB), (enthält Gallensalze und Novobiocin), und für die Untersuchung tierischer Lebensmittel empfohlen werden, kultivierbar (ANONYMUS, 2002b; ANONYMUS, 2006; JAHN et al., 2008; BEUTIN und FACH, 2014). Ähnliche das Wachstum hemmende Effekte wurden auch auf tellurithaltigen Nährböden, die zur

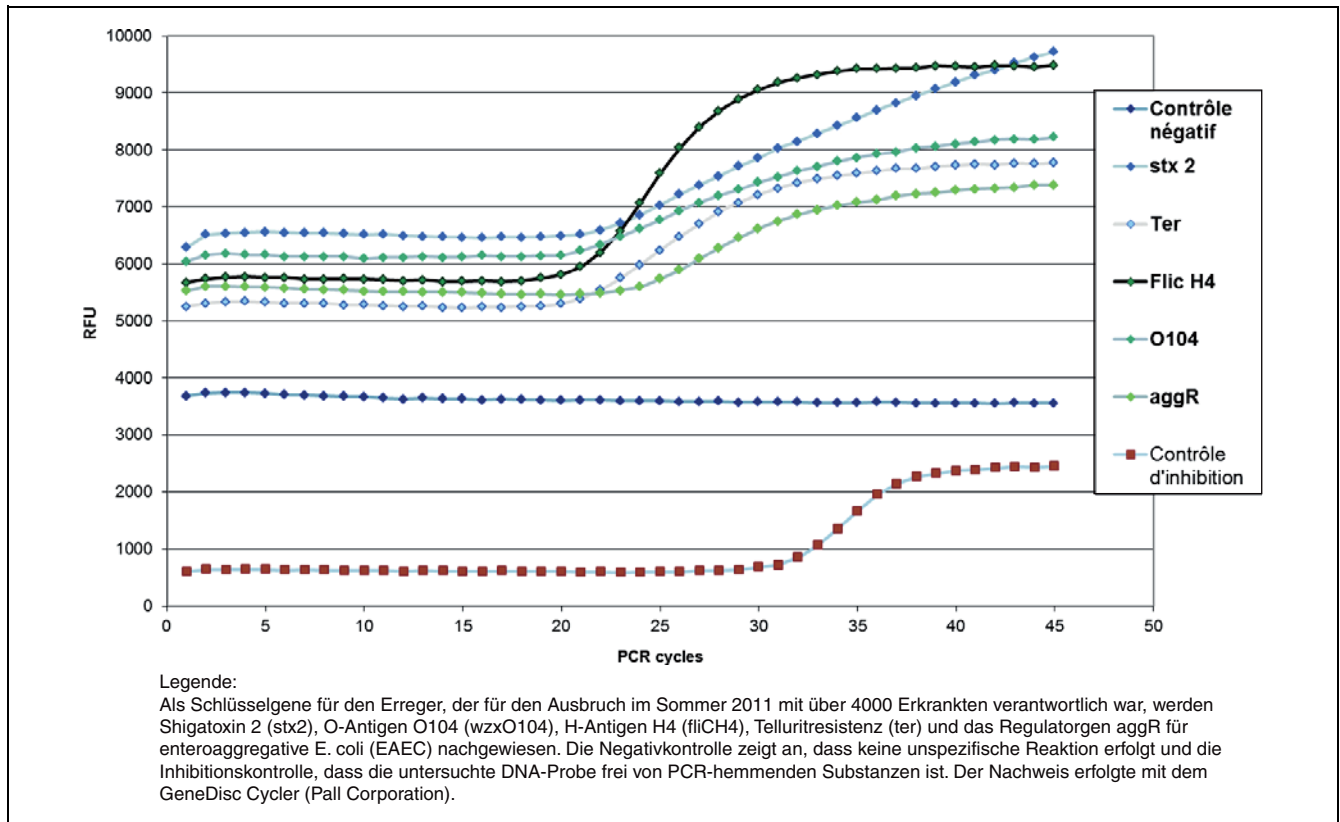


Abb. 1. Nachweis des enteroaggregativen EHEC O104:H4 durch einen multiparametrischen Test in der quantitativen Real-Time PCR.

Anreicherung von EHEC verwendet werden, wie CT-SMAC und CHROMagar-STE^C beobachtet (BEUTIN und TZSCHOPPE, 2012). Das Ausbleiben von Vermehrung bei prinzipiell lebensfähigen Keimen wird auch als VBNC (*viable but non-culturable*) bezeichnet (RAMAMURTHY et al., 2014; AURASS et al., 2011). Diese Bezeichnung trifft jedoch nicht ganz zu, da die Keime nach Stresserholung, beispielsweise durch mindestens 6 h Anreicherung in schwach selektiven oder unselektiven Medien wie Brilliantgrün-Galle-Laktose Bouillon (BRILA) oder gepuffertem Peptonwasser durchaus in der Lage sind, auch auf Selektivnährböden zu wachsen.

Nach der publizierten Methode (TZSCHOPPE et al., 2012) werden für die Untersuchung pflanzlicher Lebensmittel 25 g Untersuchungsmaterial mit 225 ml BRILA oder BPW homogenisiert und mindestens 6 h bei 37°C schüttelnd inkubiert (1. Anreicherungsschritt). Danach werden 0,1 ml Aliquotmengen der Anreicherungen auf *E. coli* Indikatormedien wie TBX Agar und EHEC-Selektivmedien wie z.B. Chromagar-STE^C ausplattiert und die beimpften Platten 20 h bei 44°C bebrütet (2. Anreicherungsschritt). Die hohe Bebrütungstemperatur hat einen Hemmeffekt auf das Wachstum der psychrophilen Phytoflora (TZSCHOPPE et al., 2012). Durch die Wahl der Selektivnährböden und die Bebrütungstemperatur findet eine Doppelselektion zum Vorteil von (pathogenen) *E. coli* statt.

Durch die zweite Anreicherung auf festen Nährböden können auch geringe Mengen Zielkeime erfasst werden. Hierbei konnten zwei K_BE EHEC in einem Hintergrund von 50 000 K_BE anderer Keime nachgewiesen werden (BEUTIN et al., 2009, TZSCHOPPE et al., 2012). Durch die Bildung von Mikrokolonien beim 20 h Wachstum auf TBX-Agar werden die Zielkeime zu einer Menge vermehrt, die ihre gezielte Erkennung in der quantitativen real-time PCR (qPCR) erlaubt (> 10 Kopien der Zielsequenzen). Aus künstlich mit EHEC beimpften Proben vorgeschchnittener Mischsalate konnten mit dieser Methode Keimmengen von < 10 K_BE/25 g Mischsalat nachgewiesen werden (TZSCHOPPE et al., 2012). Als Zielsequenzen zur Identifizierung von EHEC wurden Detektoren für die Gene für Shigatoxin (*stx1*, *stx2*) Intimin (*eae*), Enterohämolysin (*ehlyA*), sowie Gene der O-Antigen bestimmenden Sequenzen (*wzx*, *wzy* u.a.) entwickelt und herangezogen (BUGAREL et al., 2010; TZSCHOPPE et al., 2012).

Für die Isolierung der EHEC aus den Mischsalatproben erwies sich TBX-Agar als sehr gut geeignet, da auf diesem Nährboden Medium β -D-Glucuronidase produzierende *E. coli* blau angefärbt werden und sich somit gut von den weißlichen bis gelben Kolonien der übrigen Flora abheben. Produktion von β -D-Glucuronidase liegt bei 94% der *E. coli* Bakterien vor. Bei der Plattierung entsprechender Verdünnungen des flüssigen Anreicherungsmediums auf TBX-Agar können daher die blau erscheinenden Ein-

zellkolonien der Zielkeime gut identifiziert und isoliert werden (BEUTIN und TZSCHOPPE, 2012; TZSCHOPPE et al., 2012). Eine ähnliche Methode, die einen nicht selektiven 5 h Anreicherungs-schritt, qPCR Detektion von EHEC Markern und Selektivmedien beinhaltet, wurde als erfolgreich zur Kultivierung von EHEC O157 aus Koriander beschrieben (YOSHITOMI et al., 2012).

Allerdings bieten die bisher für die Diagnostik von pathogenen *E. coli* entwickelten Indikator- und Selektivnährböden keine absolute Sicherheit, um alle Keime eines Pathovars wie Shigatoxin-bildende *E. coli* (STEC) zu erfassen (BEUTIN und FACH, 2014). Die phänotypischen Eigenschaften können bei einzelnen Vertretern der *E. coli* Pathovare STEC und EHEC, aber auch bei enterotoxischen (ETEC), enteropathogenen (EPEC), enteroinvasiven (EIEC) und enteroaggregativen (EAEC) *E. coli* sehr unterschiedlich sein und unterscheiden sich häufig nicht von avirulenten *E. coli*. (KAPER et al., 2004). Die Weiterentwicklung spezifischer Nährböden zur Erkennung und Isolierung pathogener Erreger aus Mischkulturen, wie aus Lebensmitteln, muss daher vorangetrieben werden.

Spezielle diagnostische Probleme bei Keim sprossen

Die oben beschriebene Methode wurde für die Lebensmittelmatrix vorgeschnittene Mischsalate entwickelt und evaluiert (TZSCHOPPE et al., 2012). Mit dieser Methode war es möglich, durch den Einsatz spezifischer qPCR Sonden für EHEC O104:H4 und der Verwendung von Chromagar-STEC® mit Zusatz von Cephalosporin und Tellurit, EHEC O104:H4 aus einer kontaminierten Sprossenprobe im Rahmen der Untersuchungen zum EHEC O104:H4 Ausbruch zu isolieren (TZSCHOPPE et al., 2012). EHEC O104 spezifische qPCR-Verfahren wurden ebenfalls in einer prinzipiell ähnlichen Methode zur Isolierung von EHEC O104 aus verschiedenen Sprossenarten beschrieben (JINNEMAN et al., 2012).

Auch bei Sprossen setzt sich die Phytoflora überwiegend aus Pseudomonaden und Enterobacteriaceen zusammen (PIERNAS und GUIRAUD, 1997; ANONYMUS, 1999). In einer Untersuchung an Reissamen zeigte die natürliche mikrobielle Flora eine lange Persistenz, mit einem Rückgang von nur zwei Logstufen nach 277 Tagen Aufbewahrung bei Raumtemperatur (PIERNAS und GUIRAUD, 1997). Für Salmonellen wurden Überlebenszeiten von mehreren Monaten auf Luzernesamen nachgewiesen (ANONYMUS, 1999).

Nach eigenen Untersuchungen, die im Rahmen des EHEC O104 Ausbruchs an Keim sprossen vorgenommen wurden, zeigte sich eine höhere Temperaturresistenz der mit den Sprossen assoziierten Phytoflora, als bei Mischsalaten. Für Sprossen erwies sich die Anreicherung bei 44°C daher als weniger selektiv (L. BEUTIN, M. TZSCHOPPE, unveröffentlicht), als es bei den Mischsalaten der Fall war (TZSCHOPPE et al., 2012). Möglicherweise hängt dies mit den gewerbsmäßigen Produktionsverfahren für die Sprossenkeimung zusammen, die bei höheren Temperaturen erfolgen (25 – 30°C), als die Kultivierung von Salat

(PIERNAS und GUIRAUD, 1997; FRIEDRICH et al., 2011). Somit findet schon bei der Sprossenkeimung eine Selektion auf Keime mit einer höheren Temperaturtoleranz statt.

Während der Keimung der Sprossen aus den Samen vermehrt sich die damit assoziierte Phytoflora zu hohen Mengen ($10^6 - 10^9$ KBE/g) (ANONYMUS, 1999). Auch für thermotolerante Coliforme und Enterococci konnte nach zwei Tagen Sprossung bei 30°C ein Anstieg von bis zu sechs Logstufen beobachtet werden (PIERNAS und GUIRAUD, 1997). Vergleichbare Vermehrungsraten zeigten sich während der Sprossung bei pathogenen Mikroorganismen wie *B. cereus*, Salmonellen und EHEC O157 (ANONYMUS, 1999).

Einsatz von qPCR Verfahren zur allgemeinen Diagnostik pathogener *E. coli* in pflanzlichen Nahrungsmitteln

Prinzipiell hat sich die Methode aus einer Kombination von zwei Anreicherungs-schritten, DNA-Isolierung aus Abschlämungen der Bakterien von TBX-Agar, Real-Time PCR mit spezifischen Detektoren für Virulenzgene und Einsatz von Selektivmedien für die Isolierung als geeignet erwiesen, um Mengen von < 10 KBE/25 g pathogene *E. coli* (EHEC) aus pflanzlichem Untersuchungsmaterial nachzuweisen (TZSCHOPPE et al., 2012). Das spezifische Problem zum Nachweis von pathogenen *E. coli* aus pflanzlichen Lebensmitteln ergibt sich aus der Diskrepanz, die zwischen der Menge an natürlich vorkommenden *E. coli* Bakterien und anderen Enterobacteriaceen und Pseudomonaden liegt (VALENTIN-BON et al., 2008).

Voruntersuchungen im Nationalen Referenzlabor für *E. coli* am Bundesinstitut für Risikobewertung konnten zeigen, dass in mehr als 50% der Proben *E. coli* nur nach mikrobiologischer Anreicherung (s.o.) überhaupt nachweisbar ist und direkt kulturell erfassbare Mengen von ≥ 100 KBE/g nur bei 12% der Proben vorkommen (TZSCHOPPE, 2010). In anderen Untersuchungen zeigten sich bei der Belastung von verschiedenen Pflanzen mit *E. coli* erhebliche Mengenunterschiede. Diese erstreckten sich über einen Bereich von vier Potenzstufen (ARTHUR et al., 2007; BOHAYCHUK et al., 2009). Das Vorhandensein von pathogenen Vertretern der Spezies *E. coli* ist nicht unbedingt abhängig von der Gesamtmenge der vorhandenen *E. coli*, (TUTTLE et al., 1999), sodass auch gering kontaminierte Proben durchaus pathogene *E. coli* enthalten können. Die von der DGHM publizierten Richt- und Warnwerte (ANONYMUS, 2011b) zur Beurteilung von Lebensmitteln bieten daher keine Garantie auf Abwesenheit von pathogenen *E. coli* bei mikrobiologisch unauffälligen Proben.

Aus diesen Erkenntnissen ergibt sich zwingend die Notwendigkeit einer mikrobiologischen Anreicherung um pflanzliche Lebensmittel auf Vorhandensein von (pathogenen) *E. coli* effizient untersuchen zu können. Matrix-spezifische, methodische Verbesserungen sind in erster Linie bei der noch effizienteren Anreicherung der Zielkeime, bzw. der Hemmung der Matrix-typischen

Begleitflora zu sehen. Dies betrifft vor allem Sprossen, da hier produktionsbedingt mit einer thermophilen Begleitflora zu rechnen ist. Die mit angereicherte Begleitflora hat nach eigenen Untersuchungen auf die Detektion der Zielkeime mit Real-Time PCR-Methoden keinen erheblichen Einfluss, die Detektion wird aber durch Verwendung von kommerziell verfügbaren DNA-Extraktions- und Purifikationskits verbessert (BEUTIN et al., 2009; TZSCHOPPE et al., 2012; BEUTIN und FACH, 2014).

Für den Nachweis von EHEC aus verschiedenen Untersuchungsmaterialien wurde bereits eine Reihe von PCR-Methoden beschrieben und eingesetzt (BEUTIN und FACH, 2014). Für die EU ist seit 2012 eine ISO-Norm zur Detektion von EHEC mittels qPCR aus Lebensmitteln etabliert (ANONYMUS, 2012). Im Rahmen der Untersuchungen am NRL-*E.coli* des BfR wurden für die spezifische Erkennung von EHEC und EHEC O104 im NRL-*E.coli* bereits TaqMan® Real-Time PCR-Detektorsysteme (Primer und Sonden) entwickelt, mit welchen die Virulenzmerkmale (*stx1*, *stx2*, *eae*, *ehlyA* und *nleB*) und somatische Antigene (O- und H-Antigen) der wichtigsten EHEC-Gruppen (O26:H11, O91:H21, O103:H2, O104:H4, O111:H8, O113:H21, O121:H19, O145:H25/H28 und O157:H7) erfasst werden können, jedoch wurden noch nicht alle in die ISO-Norm aufgenommen (BEUTIN et al., 2009; BUGAREL et al., 2010; TZSCHOPPE et al., 2012; BEUTIN et al., 2015a; BEUTIN et al., 2015b). Die qPCRs erwiesen sich als geeignet EHEC aus Mischsalatproben nachzuweisen, die mit < 10 Kbe STEC beimpft worden waren (TZSCHOPPE et al., 2012; BEUTIN et al., 2015b).

Eine Weiterentwicklung von qPCR Detektoren, die Virulenzfaktoren und somatische Antigene von humanpathogenen *E. coli* (EHEC, STEC, EPEC, EIEC, EAEC und ETEC) erkennen, ist daher notwendig, um diese Erreger aus Untersuchungsmaterial sicher identifizieren und isolieren zu können. Im Vordergrund steht hier die molekulare Erkennung von pathogenen *E. coli* durch Nachweis der somatischen Antigene (O- und H-Antigen) durch qPCR-Verfahren. Die Kombination der O:H Antigene mit den entsprechenden Virulenzmerkmalen ergibt eine molekulare Signatur (Shiga-Toxine plus Serotyp wie z.B. O157:H7, O26:H11 etc.), durch welche die verschiedenen Erregertypen durch genetischen Nachweis erfasst werden können. Dieses Verfahren ist erheblich schneller als der Nachweis durch Isolierung und phänotypische Charakterisierung der Isolate. Das Verfahren ist von besonderer Bedeutung für verderbliche Lebensmittel, die in kurzer Zeit auf mögliche Kontaminationen untersucht werden müssen.

Mit der notwendigen Anreicherung der Zielkeime aus dem Untersuchungsmaterial „Pflanze“ erhöhen sich auch die Hürden bei der Isolierung von (pathogenen) *E. coli* aus den Proben, da die Menge der Begleitflora bei Anreicherung ebenfalls zunimmt und Enterobacteriaceen der Phytoflora häufig phänotypische Merkmale ausprägen, die für den kulturellen Nachweis von *E. coli* allgemein verwendet werden (ähnliche Morphologie, Laktosespaltung, Resistenz gegen Gallensalze). Daher ist die Entwicklung von qPCR-Verfahren, welche speziesspezifische

Sequenzen der Zielkeime (hier *E. coli*) anzeigen, erforderlich, um geringe Kontaminationen, die unterhalb der mikrobiologischen Nachweismöglichkeiten liegen, anzuzeigen. Dies hat den Vorteil, dass mit *E. coli* belastete Proben schnell erkannt und nur diese mit dem Einsatz spezifischer qPCR-Detektoren sofort auf pathogene *E. coli* geprüft werden können.

Zu diesem Zweck müssen Sequenzen für Gene ermittelt werden, die nach bisheriger Kenntnis allein der Spezies *E. coli* zuzuordnen sind und nicht bei Bakterien, die zur natürlichen Flora von pflanzlichen Lebensmitteln zählen, vorkommen. Idealerweise sollten diese in einer Kopie pro Zelle vorliegen. Entsprechende Sequenzen (beispielsweise von für den Zellhaushalt (*housekeeping*) benötigten Gene) müssen daraufhin untersucht werden, ob sie hinreichend konserviert sind, um als Zielsequenz für qPCR-Assays zu fungieren, mit deren Hilfe ein Nachweis von idealerweise sämtlichen Vertretern von *E. coli* vorgenommen werden kann.

Zur Evaluierung eines solchen generischen *E. coli* Detektionssystems muss nach Entwicklung entsprechender Sonden eine repräsentative Stammsammlung von pathogenen und apathogenen *E. coli* Stämmen untersucht werden. Hierzu müssen Referenzstämme (O- und H-Antigene) sowie eine repräsentative Anzahl Stämme verschiedener *E. coli* Pathovaren hinzugezogen werden. Als Negativkontrollen sind Isolate der Phytoflora einzusetzen. qPCR Detektoren, die in der Lage sind sämtliche *E. coli* Vertreter aus diesen Stammkollektiven spezifisch zu erkennen, können dann in einem zweiten Schritt zum Nachweis von *E. coli* in natürlich und artifiziell kontaminierten pflanzlichen Lebensmitteln verwendet werden. Für obligat humanpathogene Erreger, wie beispielsweise Salmonellen, kann der generische Nachweis über entsprechende qPCR Detektoren, gegebenenfalls schon genügen.

Literatur

- ADOLPHS, J., K. ALT, N. BANDICK, ... J.F. WIGGER, 2012: EHEC Ausbruch 2011: Aufklärung des Ausbruchs entlang der Lebensmittelkette. Herausgegeben von B. APPEL, G. FLEUR-BÖL, M. GREINER, M. LAHRSEN-WIEDERHOLT, A. HENSEL. Berlin, Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR), 1-154. <http://www.bfr.bund.de/cm/350/ehec-ausbruch-2011-aufklaerung-des-ausbruchs-entlang-der-lebensmittelkette.pdf> (Stand: 20.10.2015).
- ALBRECHT, J.A., F.L. HAMOUZ, S.S. SUMNER, V. MELCH, 1994: Microbial Evaluation of Vegetable ingredients in Salad bars. *Journal of Food Protection* **58** (6), 683-685.
- ANONYMUS, 1999: Microbiological safety evaluations and recommendations on sprouted seeds. National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods. *International Journal of Food Microbiology* **52** (3), 123-153.
- ANONYMUS, 2002a: Risk profile on the microbiological Contamination of fruits and vegetables eaten raw. H. a. C. P. Directorate-General, European Commission. SCF/CS/FMH/SURF/Final: 37. http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out125_en.pdf (Stand: 20.10.2015).
- ANONYMUS, 2002b: Untersuchung von Lebensmitteln: Nachweis, Isolierung und Charakterisierung Verotoxin-bildender *Escherichia coli* (VTEC) in Hackfleisch mittels PCR und DNA-Hybridisierungstechnik. BVL L 07.18-1:2002-05, Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMGB, Beuth-Verlag, 1-12.
- ANONYMUS, 2006: Untersuchung von Lebensmitteln: Nachweis von Verotoxin-bildenden *Escherichia coli* Stämmen (VTEC) in Lebens-

- mitteln tierischer Herkunft. DIN 10118:2004-06, Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB, Beuth Verlag, 1-18.
- ANONYMUS, 2011a: An BVL gemeldete Untersuchungen von Lebensmitteln auf EHEC. https://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/01_Lebensmittel/04_Zoonosen_Monitoring/Zoonosen_Monitoring_Bericht_2011.pdf?__blob=publicationFile&v=3 (Stand: 20.10.2015).
- ANONYMUS, 2011b: Veröffentlichte mikrobiologische Richt- und Warnwerte zur Beurteilung von Lebensmitteln. DGHM, Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM). http://www.dghm.org/m_275 (Stand: 20.10.2015).
- ANONYMUS, 2012: ISO/TS 13136:2012, Microbiology of food and animal feed -- Real-time polymerase chain reaction (PCR)-based method for the detection of food-borne pathogens -- Horizontal method for the detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and the determination of O157, O111, O26, O103 and O145 serogroups. Geneva, Switzerland, International Organization for Standardization, ISO Central Secretariat.
- ARTHUR, L., S. JONES, M. FABRI, J. ODUMERU, 2007: Microbial survey of selected Ontario-grown fresh fruits and vegetables. *Journal Food Protection* **70** (12), 2864-2867.
- AURASS, P., R. PRAGER, A. FLIEGER, 2011: EHEC/EAEC O104:H4 strain linked with the 2011 German outbreak of haemolytic uremic syndrome enters into the viable but non-culturable state in response to various stresses and resuscitates upon stress relief. *Environmental Microbiology* **13** (12), 3139-3148.
- BAVARO, M.F., 2012: *E. coli* O157:H7 and other toxigenic strains: the curse of global food distribution. *Curr Gastroenterology Reports* **14** (4), 317-323.
- BERGER, C.N., S.V. SODHA, R.K. SHAW, P.M. GRIFFIN, D. PINK, P. HAND, G. FRANKEL, 2010: Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens. *Environmental Microbiology* **12** (9), 2385-2397.
- BEUTIN, L., 2011: Protokoll zur Anreicherung und Isolierung von STEC/EHEC aus pflanzlichen Lebensmitteln. Berlin, Bundesinstitut für Risikobewertung. http://www.bfr.bund.de/cm/343/protokoll_zur_anreicherung_und_isolierung_von_stec_ehec_aus_pflanzlichen_lebensmitteln.pdf. (Stand: 20.10.2015).
- BEUTIN, L., S. DELANNOY, P. FACH, 2015a: Genetic diversity of the *fliC_{H19}* genes encoding the flagellar antigen H19 of *Escherichia coli* and application to the specific identification of enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) O121:H19. *Applied Environmental Microbiology* **81** (12), 4224-30.
- BEUTIN, L., S. DELANNOY, P. FACH, 2015b: Sequence Variations in the Flagellar Antigen Genes *fliC_{H25}* and *fliC_{H28}* of *Escherichia coli* and Their Use in Identification and Characterization of Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) O145:H25 and O145:H28. *PLoS. One* **10** (5), e0126749.
- BEUTIN, L., P. FACH, 2014: Detection of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* from Nonhuman Sources and Strain Typing. *Microbiology Spectrum*. V. Sperandio and C. J. Hovde. Washington D.C., American Society for Microbiology **2** (3), 1-23.
- BEUTIN, L., S. JAHN, P. FACH, 2009: Evaluation of the 'GeneDisc' real-time PCR system for detection of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) O26, O103, O111, O145 and O157 strains according to their virulence markers and their O- and H-antigen-associated genes. *Journal Applied Microbiology* **106** (4), 1122-1132.
- BEUTIN, L., A. MARTIN, 2012: Outbreak of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STEC) O104:H4 Infection in Germany Causes a Paradigm Shift with Regard to Human Pathogenicity of STEC Strains. *Journal Food Protection* **75** (2), 408-418.
- BEUTIN, L., M. TZSCHOPPE, 2012: Indikatormedien zur Erkennung und Isolierung von STEC. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* **108** (3), 152-156.
- BOHAYCHUK, V.M., R.W. BRADBURY, R. DIMOCK, M. FEHR, G.E. GENSLER, R.K. KING, R. RIEVE, B.P. ROMERO, 2009: A microbiological survey of selected Alberta-grown fresh produce from farmers' markets in Alberta, Canada. *Journal Food Protection* **72** (2), 415-420.
- BOMAR, M.T., 1988: Mikrobiologische Beschaffenheit von Fertigsalaten in den Jahren 1985 und 1987. *Ernährungs-Umschau* **35** (11), 392-395.
- BUGAREL, M., L. BEUTIN, A. MARTIN, A. GILL, P. FACH, 2010: Micro-array for the identification of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) seropathotypes associated with Hemorrhagic Colitis and Hemolytic Uremic Syndrome in humans. *International Journal Food Microbiology* **142** (3), 318-329.
- CDC, 2015: Food borne outbreaks. <http://www.cdc.gov/foodsafety/outbreaks/multistate-outbreaks/outbreaks-list.html> (Stand: 20.10.2015).
- CHITARRA, W., L. DECASTELLI, A. GARIBALDI, M.L. GULLINO, 2014: Potential uptake of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* from growth substrate into leaves of salad plants and basil grown in soil irrigated with contaminated water. *International Journal Food Microbiology* **189**, 139-145.
- COOLEY, M.B., W.G. MILLER, R.E. MANDRELL, 2003: Colonization of *Arabidopsis thaliana* with *Salmonella enterica* and enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and competition by *Enterobacter asburiae*. *Applied Environmental Microbiology* **69** (8), 4915-4926.
- DGKH, 2012: Stellungnahme der DGKH zu offenen Fragen im Rahmen des EHEC Ausbruchsgeschehens und zu zukünftigen Anforderungen an die Hygiene für Sprossen verarbeitende Betriebe. D. G. f. K. (DGKH), Deutsche Gesellschaft für Krankenhaushygiene (DGKH). http://www.krankenhaushygiene.de/pdfdata/2012_02_29_ehec_stellungnahme.pdf (Stand: 20.10.2015).
- DING, H., T.J. FU, M.A. SMITH, 2013: Microbial contamination in sprouts: how effective is seed disinfection treatment? *Journal Food Science* **78** (4), R495-501.
- DUBLAN MDE, L., J.C. ORTIZ-MARQUEZ, L. LETT, L. CURATTI, 2014: Plant-adapted *Escherichia coli* show increased lettuce colonizing ability, resistance to oxidative stress and chemotactic response. *PLoS One* **9** (10), e110416.
- EFSA, 2013: Scientific opinion on the risk posed by pathogens in food of non-animal origin. *EFSA Journal* **11** (1), 3025ff.
- EFSA, 2011: Tracing seeds, in particular fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) seeds, in relation to the Shiga-toxin-producing *E. coli* (STEC) O104:H4 2011 outbreaks in Germany and France. E. F. S. Authority: 1-23. <http://www.efsa.europa.eu/en/supporting/doc/176e.pdf> (Stand: 20.10.2015).
- FRANZ, E., A.H. VAN BRUGGEN, 2008: Ecology of *E. coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* in the primary vegetable production chain. *Critical Reviews in Microbiology* **34** (3-4), 143-161.
- FREMAUX, B., C. PRIGENT-COMBARET, C. VERNOZY-ROZAND, 2008: Long-term survival of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in cattle effluents and environment: an updated review. *Veterinary Microbiology* **132** (1-2), 1-18.
- FRIEDRICH, A., H. LAYER, D. NOACK, L. BÖHMER, 2011: Sprossen, eine Gefahr für die Gesundheit? http://www.ua-bw.de/pub/beitrag.asp?subid=0&Thema_ID=2&ID=1442&Pdf=No. (Stand: 20.10.2015).
- GANDHI, M., S. GOLDING, S. YARON, K.R. MATTHEWS, 2001: Use of green fluorescent protein expressing *Salmonella Stanley* to investigate survival, spatial location, and control on alfalfa sprouts. *Journal Food Protection* **64** (12), 1891-1898.
- GU, G., J.M. CEVALLOS-CEVALLOS, G.E. VALLAD, A.H. VAN BRUGGEN, 2013: Organically managed soils reduce internal colonization of tomato plants by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Phytopathology* **103** (4), 381-388.
- HALLMANN, J., A. QUADT-HALLMANN, W.G. MILLER, R.A. SIKORA, S.E. LINDOW, 2001: Endophytic Colonization of Plants by the Biocontrol Agent *Rhizobium etli* G12 in Relation to *Meloidogyne incognita* Infection. *Phytopathology* **91** (4), 415-422.
- HARTUNG, M., B.-A. TENHAGEN, A. KASBOHRER, 2015: Erreger von Zoonosen in Deutschland im Jahr 2013. Berlin, Bundesinstitut für Risikobewertung. <http://www.bfr.bund.de/cm/350/erreger-von-zoonosen-in-deutschland-im-jahr-2013.pdf> (Stand: 20.10.2015).
- JAHN, S., H. WEBER, L. BEUTIN, 2008: Comparison of enzyme immunoassay and quantitative real time PCR as proof of Shiga toxin producing *Escherichia coli* (STEC) in minced meat. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit* [Journal of Consumer Protection and Food Safety] **3** (4), 385-395.
- JINNEMAN, K.C., J.G. WAITE-CUSIC, K.J. YOSHITOMI, 2012: Evaluation of shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) method for the detection and identification of STEC O104 strains from sprouts. *Food Microbiology* **30** (1), 321-328.
- KAPER, J.B., J.P. NATARO, H.L. MOBLEY, 2004: Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Review Microbiology* **2** (2), 123-140.
- KLEPZIG, I., P. TEUFEL, W. SCHOTT, G. HILDEBRANDT, 1999: Auswirkungen einer Unterbrechung der Kühlkette auf die mikrobiologische Beschaffenheit von vorzerkleinerten Mischsalaten. *Archiv für Lebensmittelhygiene* **50**, 95-104.
- LACK, W.K., B. BECKER, W.H. HOLZAPFEL, 1996: Hygienischer Status frischer vorverpackter Mischsalate im Jahr 1995. *Archiv für Lebensmittelhygiene* **47**, 129-152.
- MARTIN, A., L. BEUTIN, 2011: Characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from meat and milk products of different origins and association with food producing animals as main contamination sources. *International Journal Food Microbiology* **146** (1), 99-104.
- MEAD, P.S., L. SLUTSKER, V. DIETZ, L.F. MCCAIG, J.S. BRESEE, C. SHAPIRO, P.M. GRIFFIN, R.V. TAUXE, 1999: Food-related illness and death in the United States. *Emerging Infectious Diseases* **5** (5), 607-625.
- MICHINO, H., K. ARAKI, S. MINAMI, S. TAKAYA, N. SAKAI, M. MIYAZAKI, A. ONO, H. YANAGAWA, 1999: Massive outbreak of *Escherichia coli*

- O157:H7 infection in schoolchildren in Sakai City, Japan, associated with consumption of white radish sprouts. *American Journal of Epidemiology* **150** (8), 787-796.
- NGUYEN-THE, C., F. CARLIN, 1994: The microbiology of minimally processed fresh fruits and vegetables. *Critical Reviews Food Science and Nutrition* **34** (4), 371-401.
- OLAIMAT, A.N., R.A. HOLLEY, 2012: Factors influencing the microbial safety of fresh produce: a review. *Food Microbiology* **32** (1), 1-19.
- PAN, W., D.W. SCHAFFNER, 2010: Modeling the growth of *Salmonella* in cut red round tomatoes as a function of temperature. *Journal of Food Protection* **73** (8), 1502-1505.
- PIERNAS, V., J.P. GUIRAUD, 1997: Microbial Hazards related to rice sprouting. *International Journal of Food Science and Technology* **32** (7), 33-39.
- RAMAMURTHY, T., A. GHOSH, G.P. PAZHANI, S. SHINODA, 2014: Current Perspectives on Viable but Non-Culturable (VBNC) Pathogenic Bacteria. *Frontiers Public Health* **2**, 103.
- RASTOGI, G., J.J. TECH, G.L. COAKER, J.H. LEVEAU, 2010: A PCR-based toolbox for the culture-independent quantification of total bacterial abundances in plant environments. *Journal of Microbiological Methods* **83** (2), 127-132.
- SALDANA, Z., E. SANCHEZ, J. XICOHTENCATL-CORTES, J.L. PUENTE, J.A. GIRON, 2011: Surface structures involved in plant stomata and leaf colonization by shiga-toxicogenic *Escherichia coli* O157:h7. *Frontiers in Microbiology* **2**, 119.
- SHARMA, M., D.T. INGRAM, J.R. PATEL, P.D. MILLNER, X. WANG, A.E. HULL, M.S. DONNENBERG, 2009: A novel approach to investigate the uptake and internalization of *Escherichia coli* O157:H7 in spinach cultivated in soil and hydroponic medium. *Journal of Food Protection* **72** (7), 1513-1520.
- SIKIN, A.M., C. ZOELLNER, S.S. RIZVI, 2013: Current intervention strategies for the microbial safety of sprouts. *Journal of Food Protection* **76** (12), 2099-2123.
- TAORMINA, P.J., L.R. BEUCHAT, 1999: Behavior of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 on alfalfa sprouts during the sprouting process as influenced by treatments with various chemicals. *Journal of Food Protection* **62** (8), 850-856.
- TAORMINA, P.J., L.R. BEUCHAT, L. SLUTSKER, 1999: Infections associated with eating seed sprouts: an international concern. *Emerging Infectious Diseases* **5** (5), 626-634.
- TEPLITSKI, M., K. WARRINER, J. BARTZ, K.R. SCHNEIDER, 2011: Untangling metabolic and communication networks: interactions of enterics with phyto-bacteria and their implications in produce safety. *Trends Microbiology* **19** (3), 121-127.
- TUTTLE, J., T. GOMEZ, M.P. DOYLE, J.G. WELLS, T. ZHAO, R.V. TAUXE, P.M. GRIFFIN, 1999: Lessons from a large outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections: insights into the infectious dose and method of widespread contamination of hamburger patties. *Epidemiology and Infection* **122** (2), 185-192.
- TZSCHOPPE, M., 2010: Untersuchungen zur Kontamination von pflanzlichen, für den Rohverzehr vorgesehenen, Lebensmitteln mit pathogenen, insbesondere Shiga-Toxin-bildenden *Escherichia coli*. Diplomarbeit zur Erlangung des akademischen Grades: Diplom-Ingenieur (FH) an der Beuth Hochschule für Technik, Studiengang Lebensmitteltechnologie.
- TZSCHOPPE, M., A. MARTIN, L. BEUTIN, 2012: A rapid procedure for the detection and isolation of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) serogroup O26, O103, O111, O118, O121, O145 and O157 strains and the aggregative EHEC O104:H4 strain from ready-to-eat vegetables. *International Journal of Food Microbiology* **152** (1-2), 19-30.
- VALENTIN-BON, I., A. JACOBSON, S.R. MONDAY, P.C. FENG, 2008: Microbiological quality of bagged cut spinach and lettuce mixes. *Applied Environmental Microbiology* **74** (4), 1240-1242.
- WALSEMANN, U., 2005: Gemüseanbau in Deutschland von 2000 bis 2004. Statistisches Bundesamt. Wirtschaft und Statistik. Wiesbaden **5**, 507-519. https://www.destatis.de/DE/Publikationen/WirtschaftStatistik/LandForstwirtschaft/GemueseAnbau20002004.pdf?__blob=publicationFile (Stand: 20.10.2015).
- YAO, Z., H. WANG, L. WU, J. WU, P.C. BROOKES, J. XU, 2014: Interaction between the microbial community and invading *Escherichia coli* O157:H7 in soils from vegetable fields. *Applied Environmental Microbiology* **80** (1), 70-76.
- YARON, S., U. ROMLING, 2014: Biofilm formation by enteric pathogens and its role in plant colonization and persistence. *Microbial Biotechnology* **7** (6), 496-516.
- YOSHITOMI, K.J., K.C. JINNEMAN, R. ZAPATA, S.D. WEAGANT, W.M. FEDIO, 2012: Detection and isolation of low levels of *E. coli* O157:H7 in cilantro by real-time PCR, immunomagnetic separation, and cultural methods with and without an acid treatment. *Journal of Food Science* **77** (8), M481-489.
- ZHANG, G., L. MA, L.R. BEUCHAT, M.C. ERICKSON, V.H. PHELAN, M.P. DOYLE, 2009: Lack of internalization of *Escherichia coli* O157:H7 in lettuce (*Lactuca sativa* L.) after leaf surface and soil inoculation. *Journal of Food Protection* **72** (10), 2028-2037.