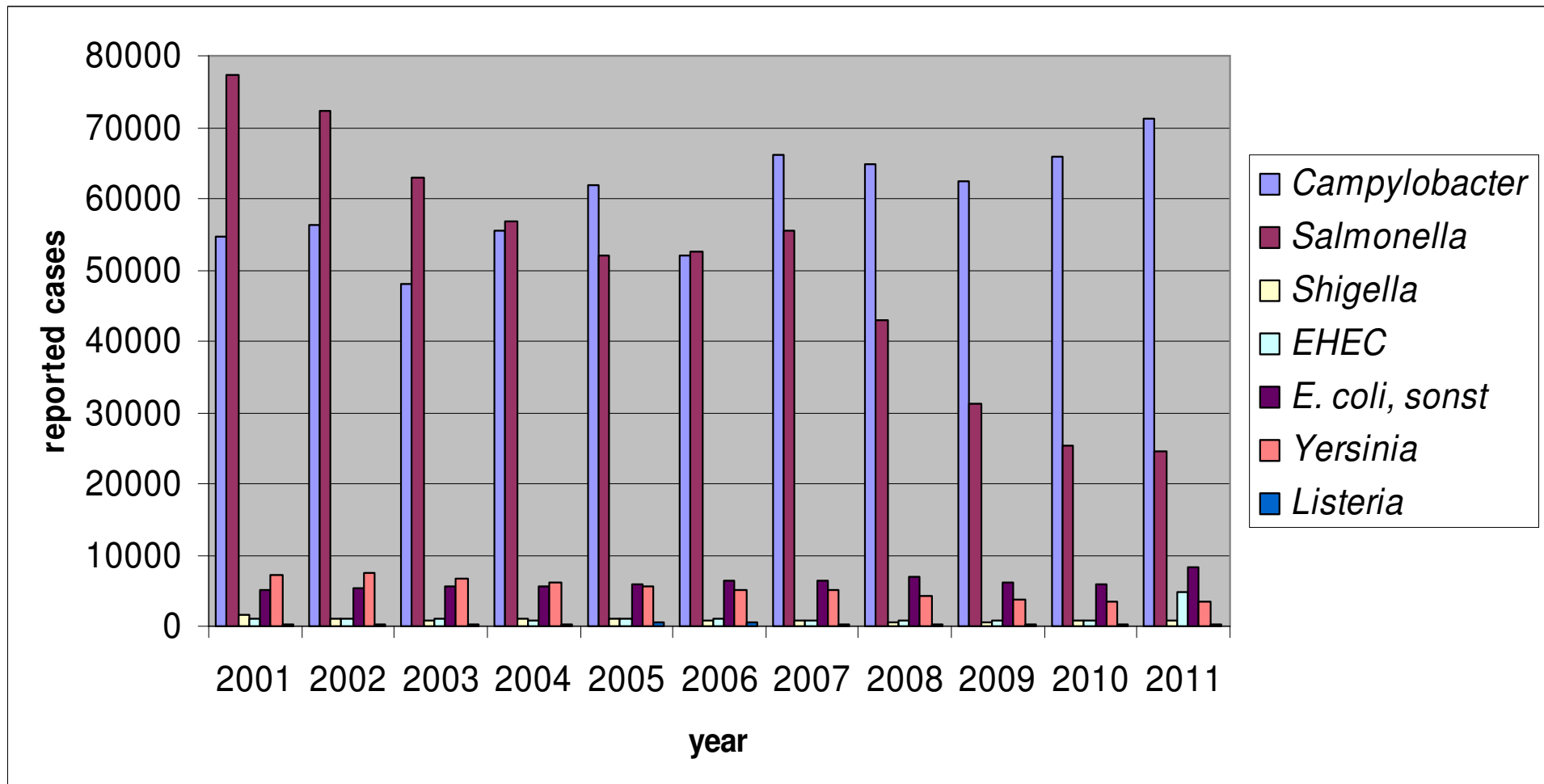


***Campylobacter* ...**
Grenzen der Detektion =
Grenzen der Dekontamination?

Kerstin Stingl

Nationales Referenzlabor for *Campylobacter*
Lebensmittelhygiene und Sicherheitskonzepte

Zoonotische Humaninfektionen in Deutschland (2001-2011)



Robert Koch Institut, Epidemiologisches Bulletin

~ 91 % *C. jejuni*

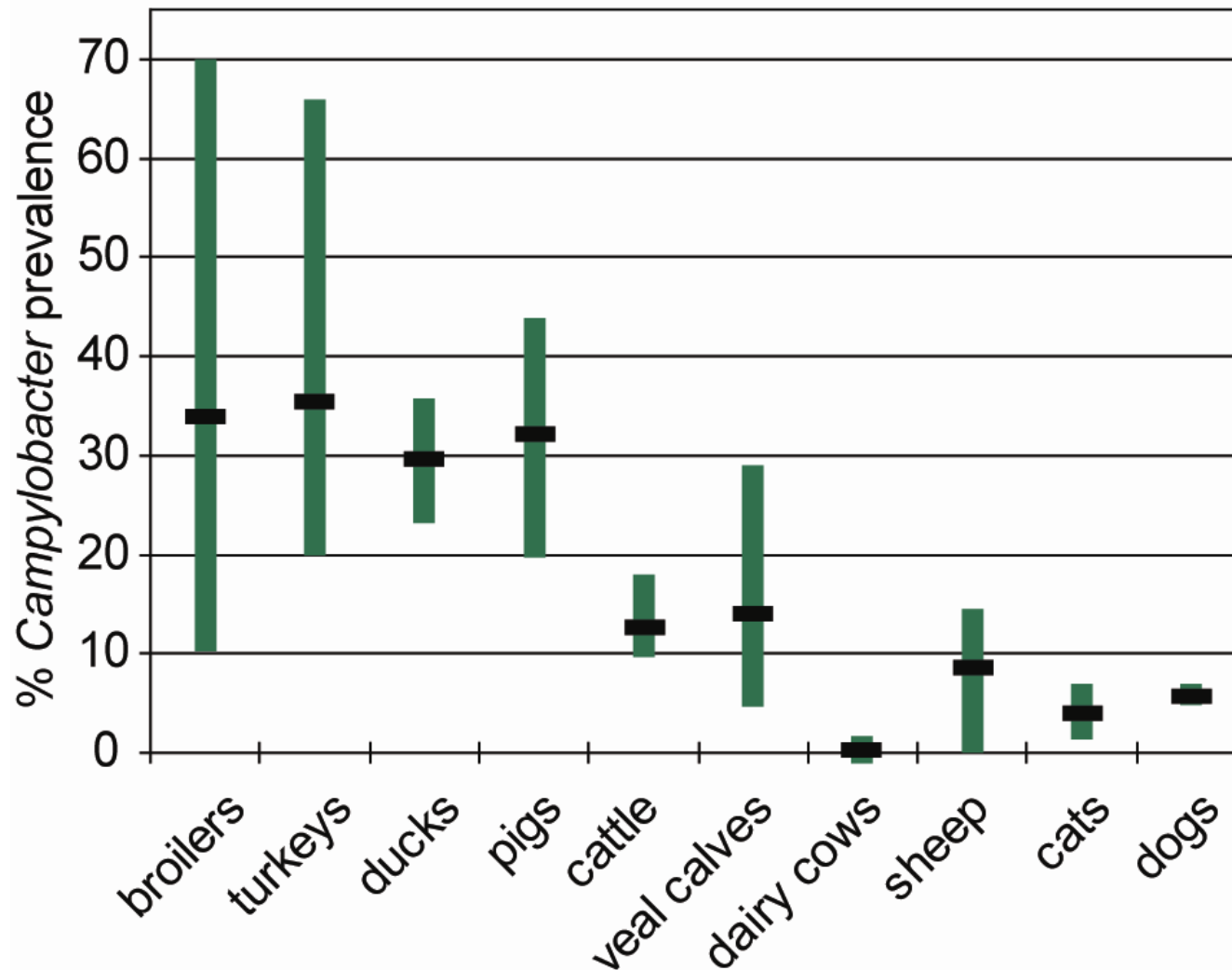
~ 8 % *C. coli*

~ 1 % *C. lari* (2010)

Campylobacteriose beim Menschen

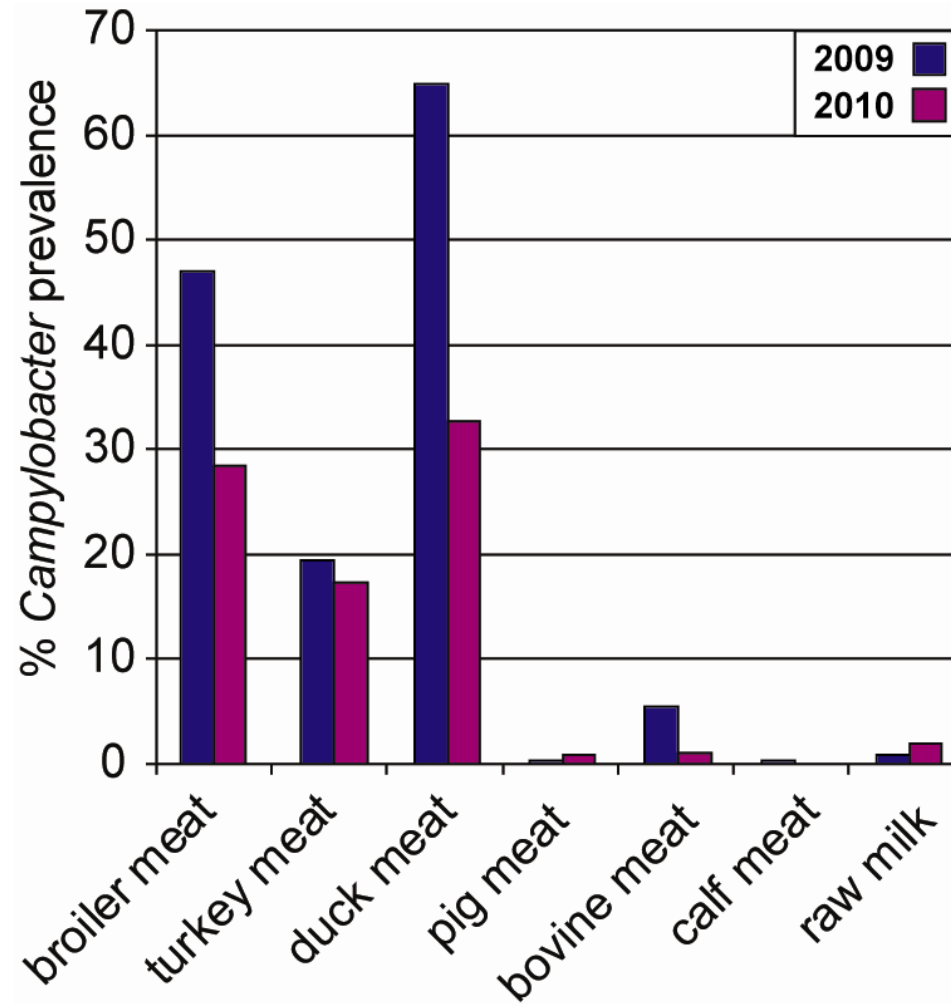
- Durchfall, Fieber, Krämpfe, gelegentlich Erbrechen
- Inkubationszeit 1-7 Tage, Dauer ca. 1 Woche, Ausscheidung üblicherweise 3-4 Wochen, meist selbstlimitierend
- Antibiotikagabe bei schweren Krankheitsverläufen (immunsupprimierte Patienten), Schwangerschaft oder Rückfällen
- reaktive Arthritis, Guillain-Barré-Syndrom

Vorkommen von *Campylobacter* bei Tieren in Deutschland (Daten aus Käsbohrer & Hartung, BfR-Wissenschaft, 2004-2010)



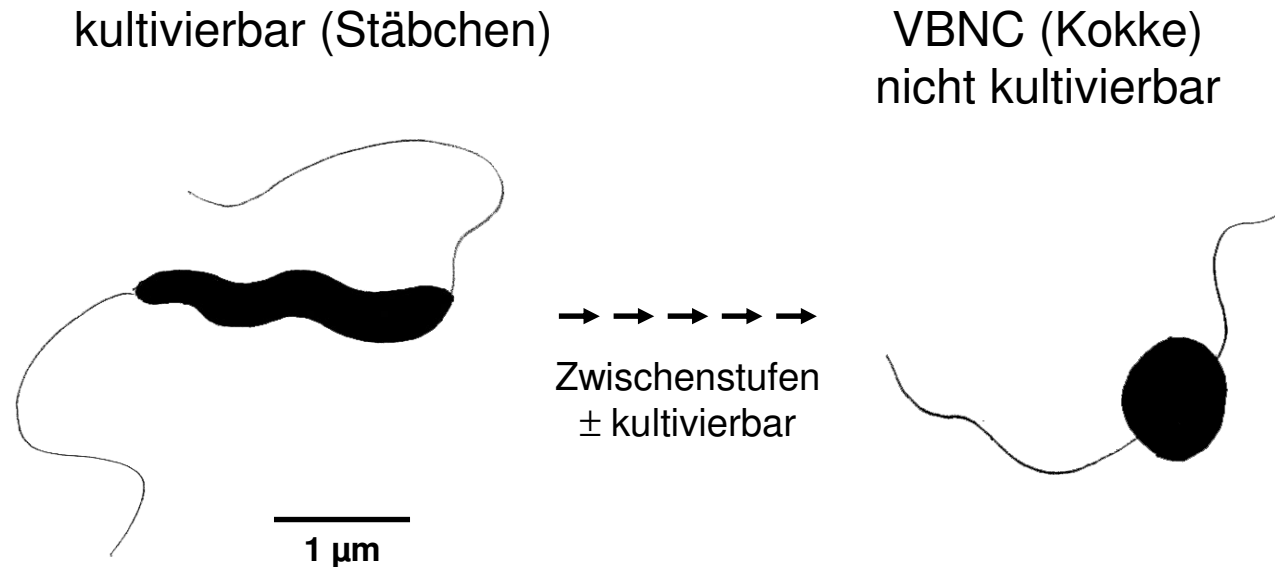
Stingl et al., Eur. J. Microbiol. Immunol., 2012, Vol.2:88-96

Vorkommen von *Campylobacter* in Lebensmitteln (Daten aus Käsbohrer & Hartung, BfR-Wissenschaft, 2010 u. im Druck)



Stingl et al., Eur. J. Microbiol. Immunol., 2012, Vol.2:88-96

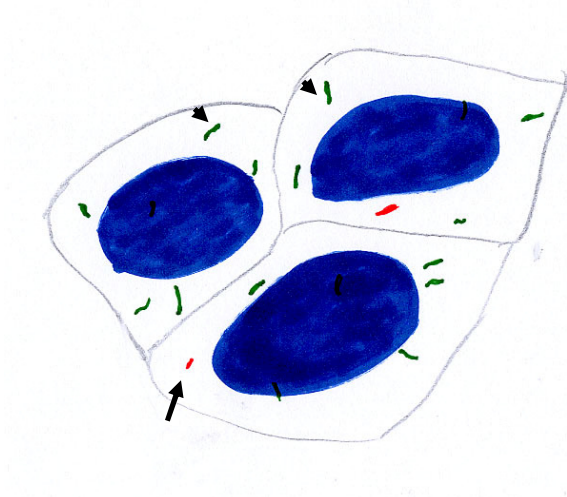
„Viable but non-culturable“ (VBNC) *Campylobacter*



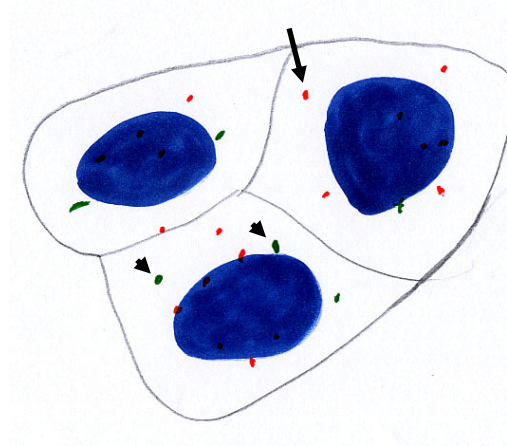
- limitierte Tenazität außerhalb des intestinalen Traktes
- vermehrt sich nicht auf Lebensmitteln
- komplexe nutritive Ansprüche, mikroaerophil (O₂-Stress)

Nicht-kultivierbare *Campylobacter* besitzen infektiöses Potential

Kultivierbar



VBNC



Infektion humaner Zellen (Caco-2 Zellen). Pfeilspitzen, invasiv;
Pfeile, extrazellulär (modifiziert nach Chaisowwong et al., 2012, J.
Vet. Med. Sci. 74: 43–50)

Kolonisierung durch VBNC gezeigt im:

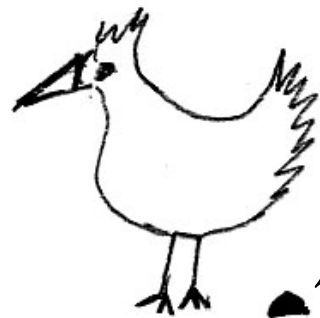
Huhn (Stern et al., 1994, Lett. Appl. Microbiol. 18:333-336)

Mausmodell (Baffone et al., 2006, Int. J. Food Microbiol. 107:83-91)

bebrütetes Hühnerei (Cappelier et al., 1999, Appl. Environ. Microbiol. 65:5154-7)

Kulturelle Detektion von *Campylobacter* entlang der Lebensmittelkette

Primärproduktion



Stress

Kultivierbarkeit von *Campylobacter* hängt von der Qualität/Frische der Probe ab



Schlachthof

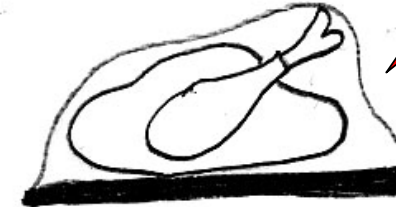


vitale *Campylobacter* hohe Nachweisrate



Zaekum = Primärproduktion
Karkasse = Schlachthof

Einzelhandel



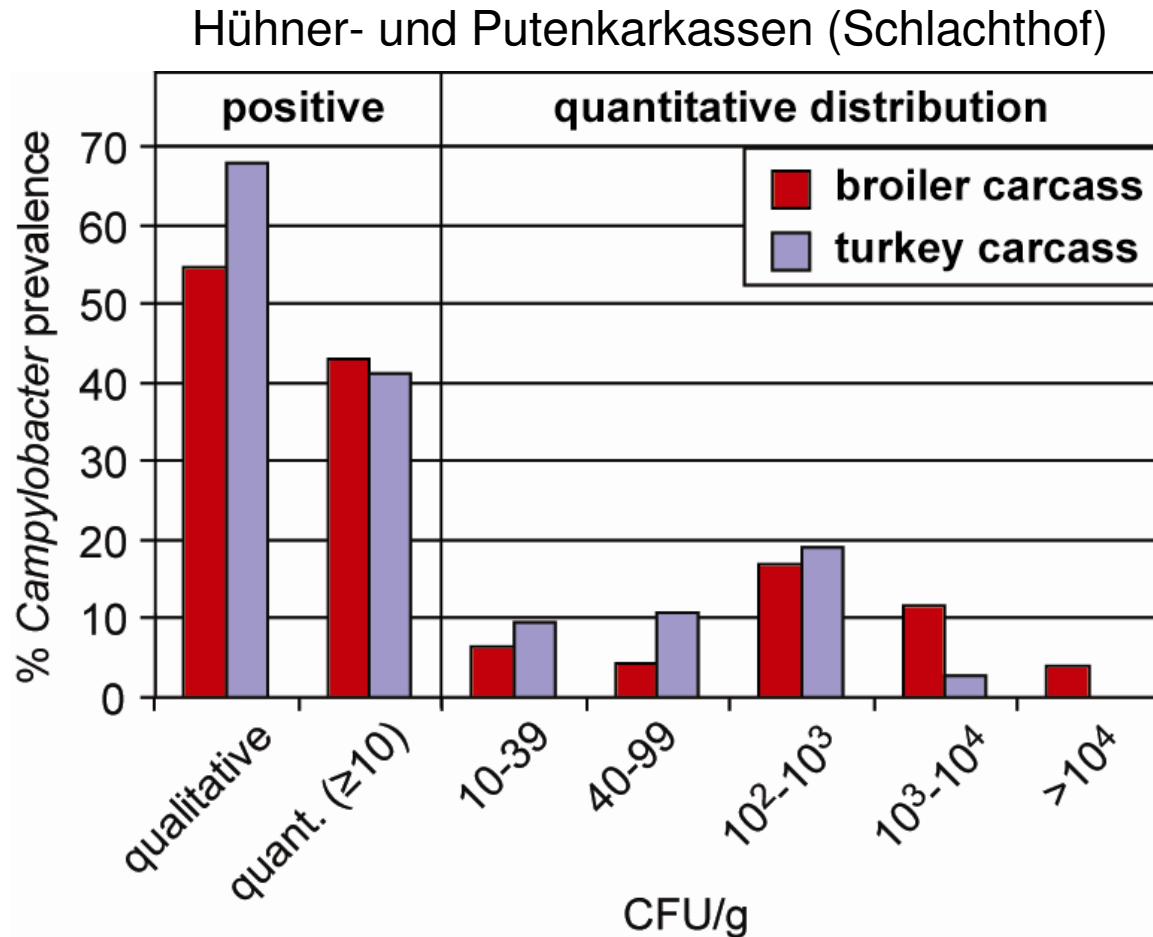
Stress

Fleisch = Einzelhandel



Transport kritisch

Quantitative *Campylobacter* Prävalenzdaten (BfR und Länder)



Vergleich ISO 10272-1 und -2

pos. Hühnerkarkassen:
 58 % detektiert mit beiden Methoden (qual. und quant.)
 30 % nur qualitativ
 12 % nur quantitativ

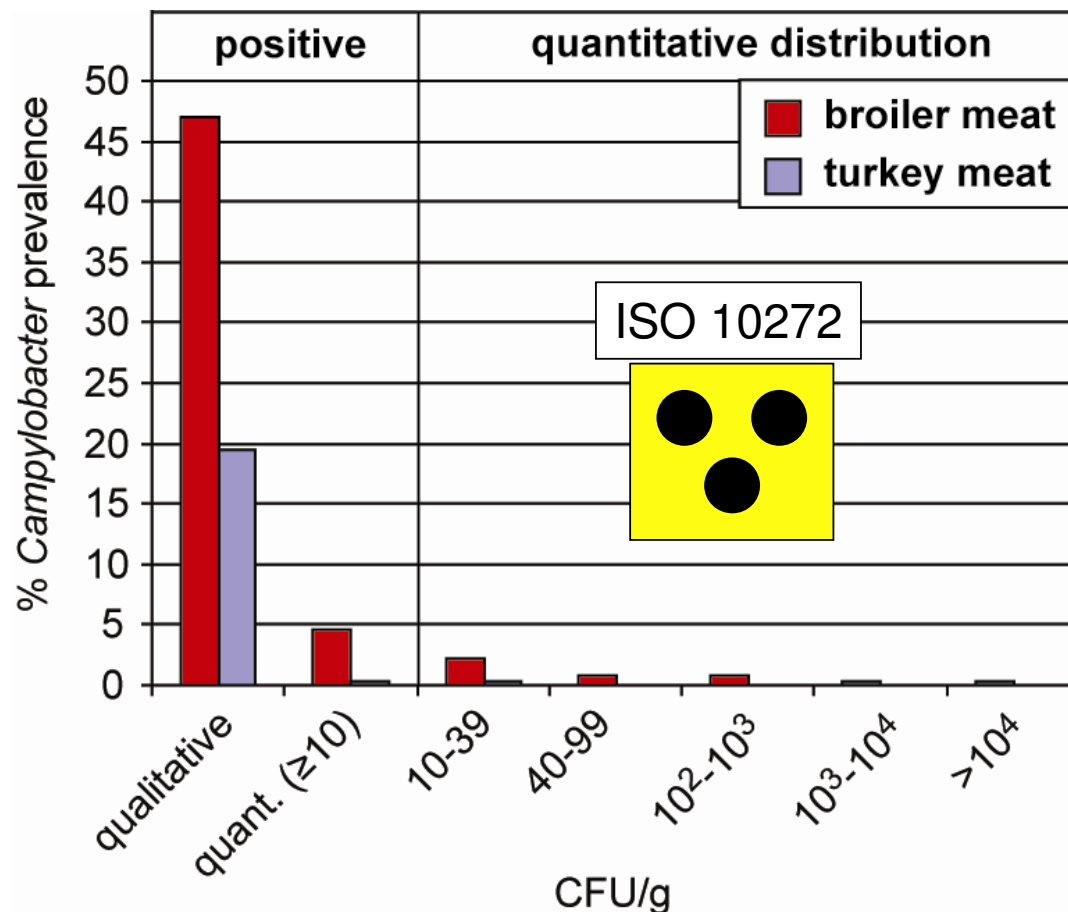
Wann ist die quantitative Methode überlegen?

⇒ räumliches Trennen von Einzelzellen beim Ausplattieren verhindert mögliches Überwachsen durch resistente Hintergrundflora

Stingl et al., Eur. J. Microbiol. Immunol., 2012, Vol.2:88-96

Quantitative *Campylobacter* Prävalenzdaten (BfR und Länder)

Hühner- und Putenfleisch (Einzelhandel)



Stingl et al., Eur. J. Microbiol. Immunol., 2012, Vol.2:88-96

Quantitative Reduktion:

→ teilweise durch Verlust der Haut und/oder durch Einfrieren erklärbar

→ 2 log Reduktion kultivierbarer *Campylobacter* nach 2-5 Tagen bei Kühltemperaturen (El-Shibiny et al., Int. J. Food Microbiol., 2009; 131:197-202)

ABER:

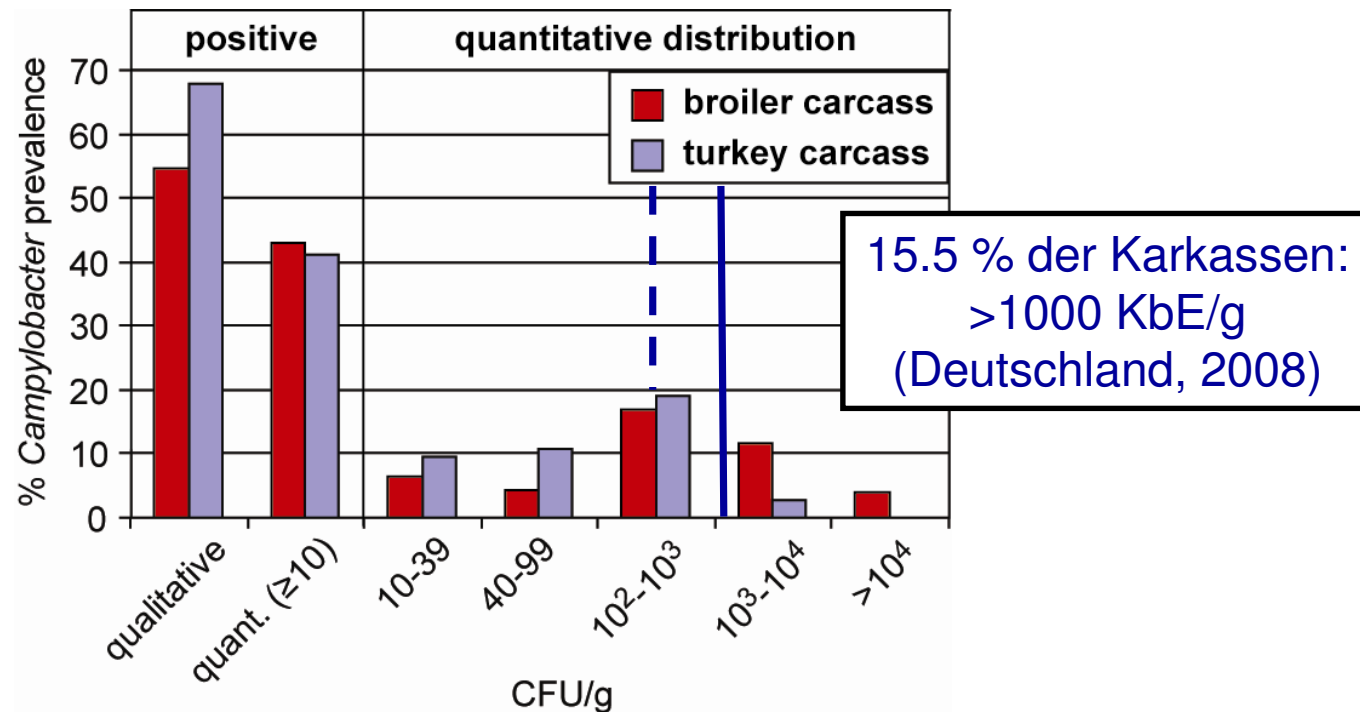
20-30 % der *Campylobacteriosen* werden durch Konsum oder Verarbeitung von Hühnerfleisch ausgelöst (EFSA J. 2011;9:2105); 50-80 % durch das gesamte „Reservoir Huhn“

Reduktion der Campylobacteriosen (EFSA J., 2011;9:2105)

Ziel: Reduktion der Campylobacteriosen um > 50% oder > 90%

Ansatzpunkt: mikrobiologisches Kriterium von 1000 oder 500 KbE/g
Hautprobe (Karkasse vom Schlachthof)

aktuelle Situation: 15% oder 45% aller getesteten Chargen (in Europa)
entsprechen nicht den Kriterien

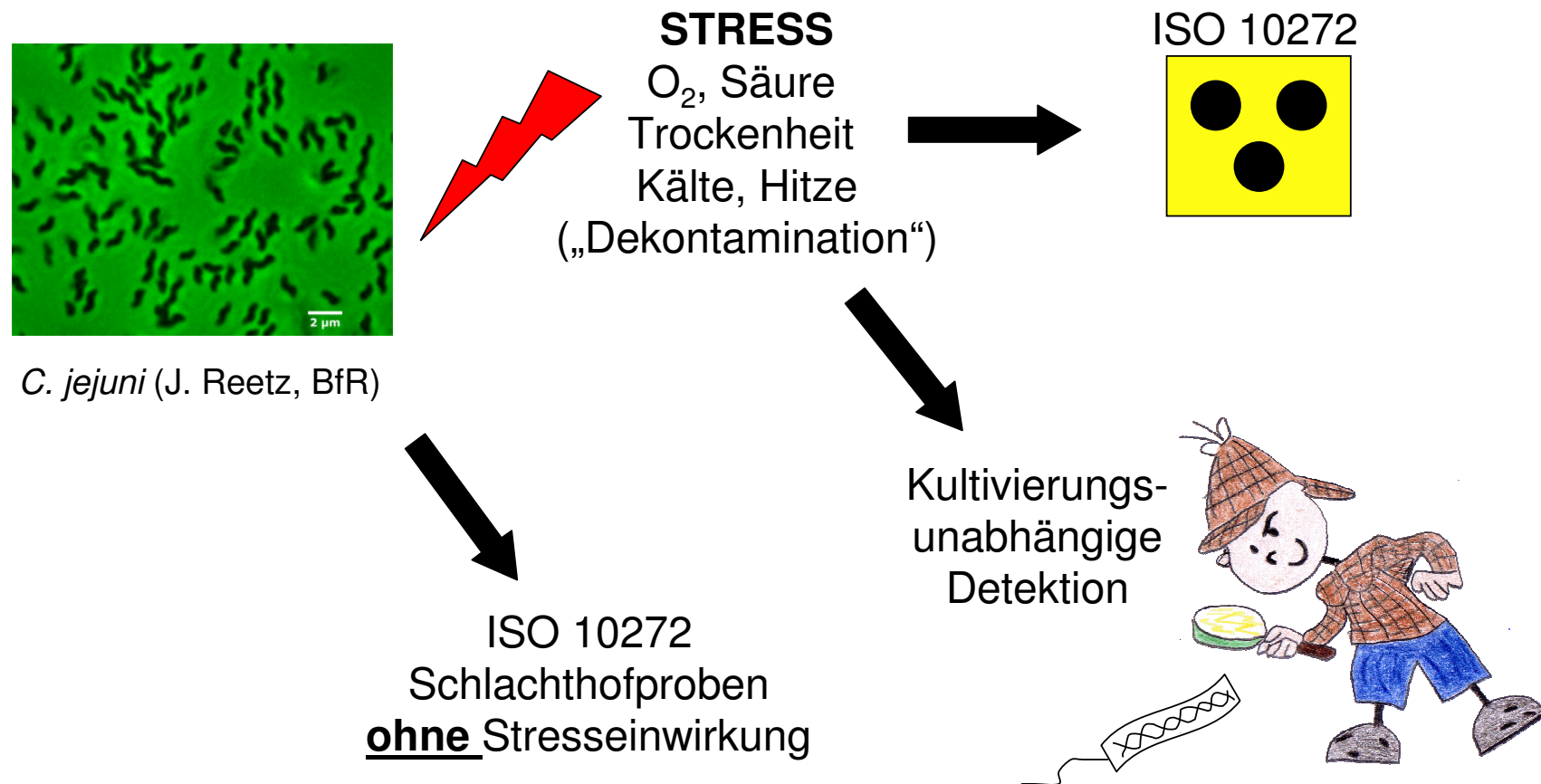


Strategien zur Reduktion von *Campylobacter* auf Geflügelprodukten – Dekontamination

Chemical decontamination of carcasses	Efficacy for <i>Campylobacter</i> reduction at the point of application	Modelled	References
Lactic acid (2%)	Milchsäure, NaCl/Citronensäure, Chlordioxid, Trinatriumphosphat, Peroxysäuren log 0,5 – log 1,75 maximale Reduktion		
Acidified sodium chlorite (1200 mg/l)			
	0.5 -1 log ₁₀ when sprayed at 1000 ppm		Corry <i>et al.</i> , 2008
Chlorine dioxide (50-100 mg/l)	0.49 log ₁₀ reduction (4.25 ppm in IOBW) 0.99 -1.21 log ₁₀ reduction (50 or 100 ppm, dip – inoculated)	No	Bolder, 2007 Hong <i>et al.</i> , 2008
Trisodium phosphate (10-12%, pH 12)	1.03 log ₁₀ reduction (spray) 1.2 log ₁₀ reduction (dipping at 50°C) No effect of dipping at 20°C 0.5 log ₁₀ when sprayed at 12%	Yes	Bashor <i>et al.</i> , 2004 Slavik <i>et al.</i> , 1994 Whyte <i>et al.</i> , 2001b Corry <i>et al.</i> , 2008
Acidified electrolysed oxidising water (immersion)	1.07 log ₁₀ reduction	No	Kim <i>et al.</i> , 2005
Peracetic (peroxyacetic) acid	43% reduction of positive carcasses	No	Bauermeister <i>et al.</i> , 2008a
Physical decontamination of carcasses	Tiefgefrieren (Tage bis 3 Wochen), Kochen, Bestrahlung log 1 – log 6 Reduktion		
Freezing for few days			
Freezing for 3 weeks			Georgsson <i>et al.</i> , 2006a
Hot water immersion	1.25 log ₁₀ reduction	Yes	Corry <i>et al.</i> , 2006
Irradiation	6 log ₁₀ reduction	Yes	Farkas, 1998 or expert opinion
Cooking	6 log ₁₀ reduction	Yes	Whyte <i>et al.</i> , 2006
Crust-freezing	0.42 log ₁₀ reduction	No	Boysen and Rosenquist, 2009
Steam	0.46 log ₁₀ reduction	No	Whyte <i>et al.</i> , 2003
Steam ultrasound	1.3-2.51 log ₁₀ reduction	No	Boysen and Rosenquist, 2009

Reale oder apparente Dekontamination von *Campylobacter* ?

- Detektionsproblem = Verlust der Kultivierbarkeit bei *Campylobacter* nach Stresseinwirkung bedingt eine Überschätzung eines putativen Dekontaminationserfolges



Detektion lebender *Campylobacter* mittels real-time PCR

QUALITATIVER REAL-TIME PCR NACHWEIS:

- qualitativer real-time Nachweis von thermophilen *Campylobacter* spp. nach Anreicherung gemäß ISO 10272 bereits im Ringversuch validiert, Publikation zeitnah im Rahmen der §64 Methodensammlung des LFGB erwartet

QUANTITATIVER REAL-TIME PCR NACHWEIS:

- bislang noch Studienstatus
- Prinzip: Membranpermeabilität von toten Zellen ermöglicht das Eindringen DNA-spezifischer Farbstoffe, die durch Lichtaktivierung mit der DNA reagieren und diese für eine anschließende real-time PCR-Detektion inaktivieren

Reduktion von *Campylobacter* – alternative Strategien

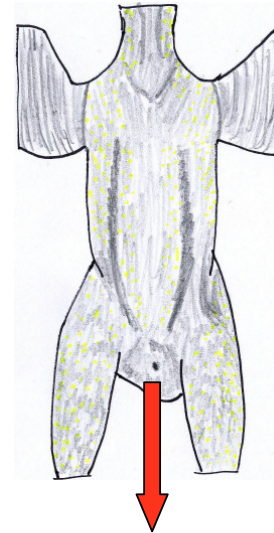
- Es existieren Fleischsorten, deren Herkunftstier häufig mit *Campylobacter* kolonisiert ist (z. B. Schwein), die aber nur sehr selten mit *Campylobacter* kontaminiert sind
- ⇒ Reduktion der Fäkalkontamination während des Schlachtprozesses !!!

Verhinderung/Reduktion der Fäkalkontamination

Fäkalaustritt folgt der Gravitation



Schlachtung der Hühner „upside-up“



Berrang et al., J. Appl. Poult. Res. 2011; 20:197-202

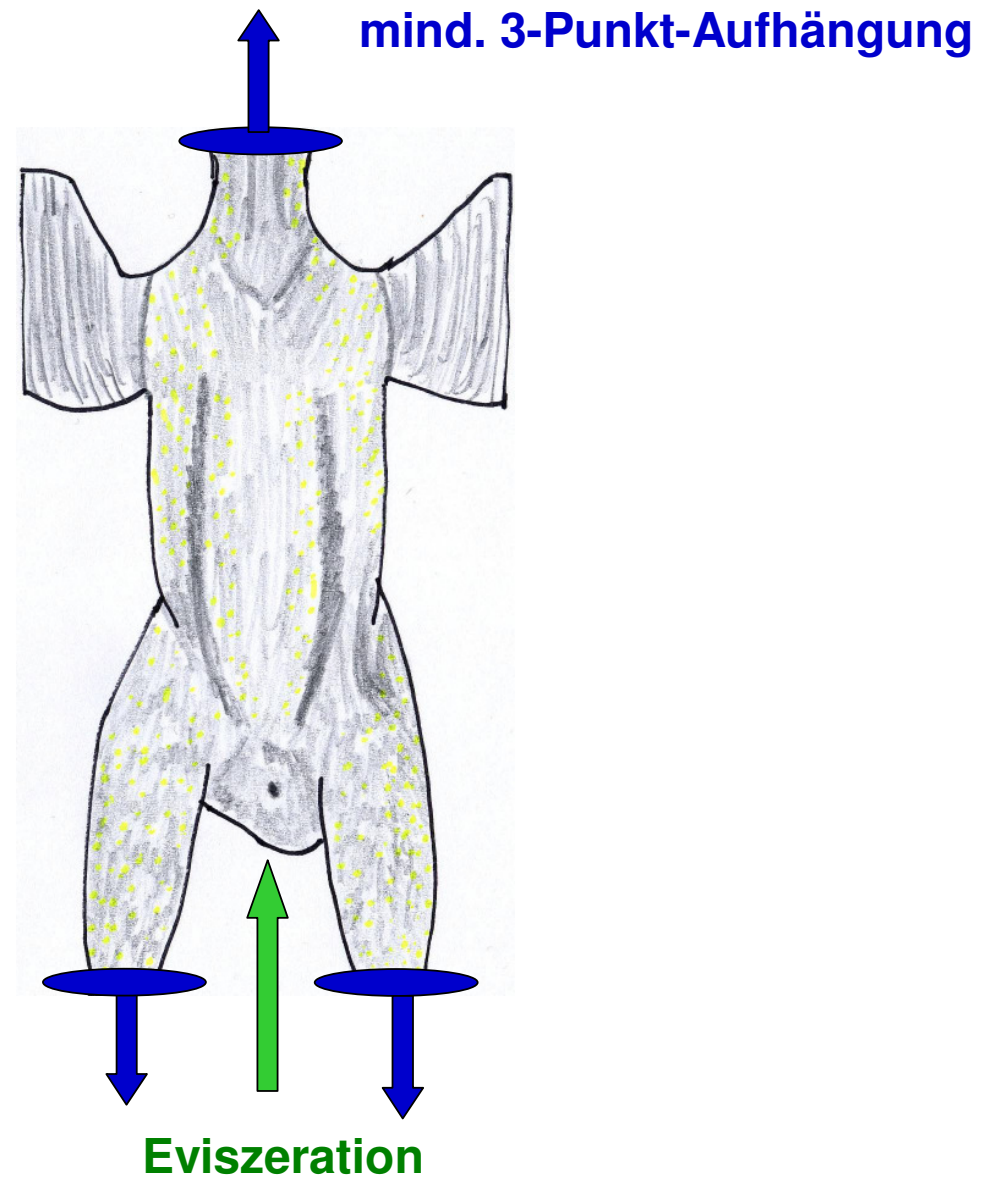
⇒ kein Effekt auf *Campylobacter*-Belastung der Karkassen

ABER:

- Einhängen der Hühner in normaler Schlachthanlage (von oben (Hals und Flügel), unten frei rotierend)
- 3D-Rotation während des Rupfprozesses und keine Gewährleistung, dass Fäkalien das System durch Gravitation verlassen!

Sicherstellen, dass Fäkalien
nicht auf dem
Schlachtkörper gelangen!

- ⇒ **parallele Eviszeration** während des Rupfprozesses
- ⇒ **mindestens 3-Punkt-Aufhängung**
- ⇒ **verbessertes Sprüh-/Spritzenverfahren**



DANKE...

...insbesondere an die
Untersuchungsämter der Länder

FGGr. 43 (A. Käsbohrer)

FGGr. 42 (L. Ellerbroek, N. Bandick)

NRL *Campylobacter* Team

Christiane Buhler

Marie-Theres Knüver

Nora-Johanna Krüger

Petra Vogt

Vielen Dank für Ihre Aufmerksamkeit

Kerstin Stingl

Nationales Referenzlabor für *Campylobacter*
Lebensmittelhygiene und Sicherheitskonzepte