

Nachweis von *Campylobacter spp.* in Lebensmitteln – Entwicklung einer Norm



K. Pietsch, A. Anderson und I. Huber*

CARO 2017

Campylobacter, Arcobacter & Related Organisms

19.-20. Oktober 2017

Freie Universität Berlin, Campus Döppel

* Bayrisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL)

Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Freiburg

- Technische Fachbehörde in Baden-Württemberg
- Ca. 200 Beschäftigte
 - Lebensmittelchemiker
 - Veterinärmediziner
 - Biologen
 - Ingenieure
 - Technische Angestellten (CTA, (V)MTA)
 - Verwaltungsangestellte, Haustechnik etc.



Lebensmittelinfektionen - Meldungen an das RKI gemäß IfSG

**Jahr 2015: 337 lebensmittelbedingte Ausbrüche
19 durch Noroviren**

318 durch andere Erreger

**davon wurden die häufigsten durch Campylobacter
spp. verursacht (179 (56%) von 318)**

**Campylobacter und Rohmilch am häufigsten genannte
Kombination (z.B. Rohmilchabgabestellen mit
Direktverzehr)**

Quelle: Food & Hygiene-Praxis 02/2017

§ 35 LMBG / § 64 LFGB - Arbeitsgruppe

Seit März 1997: Standardisierung molekularbiologischer Methoden in der Lebensmittelanalytik im Rahmen der

- § 64 LFGB (§ 35 LMBG) - Arbeitsgruppe „Molekularbiologische Methoden – Mikrobiologie“
- DIN / NAL* (CEN ISO) - Arbeitskreis "Polymerase-Kettenreaktion zum Nachweis von Mikroorganismen,,

*NAL = Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte im DIN

Forschungsprojekt (2003 – 2005) / Promotion am CVUA Freiburg (2009)

Forschungsprogramm „Ernährung / Nahrungsmittelsicherheit“
der Landesstiftung Baden-Württemberg gGmbH

Nachweis von humanpathogenen Mikroorganismen in Lebensmitteln mittels moderner molekularbiologischer Untersuchungsverfahren

Abschlussbericht

Projekt: P-LS-E / MOP A7-7
Zeitraum: 15.01.2003 - 15.01.2005

Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Freiburg
Bissierstrasse 5
79114 Freiburg

Projektleiter: Dr. Klaus Pietsch
Durchführende: Annette Wieland

Aus dem Institut für Mikrobiologie und Hygiene
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Entwicklung und Evaluierung neuer molekularbiologischer Verfahren für den Nachweis von bakteriellen Krankheitserregern in Lebensmitteln

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum medicarum (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Annette Anderson

aus Ellwangen (Jagst)

Primer mod. nach Oyoyo (1992), Sonde neu entwickelt; flaA-Gen – Nachweis

[26] Nachweis von *Campylobacter jejuni* und *Campylobacter coli* in Lebensmitteln durch Amplifizierung spezifischer Gensequenzen mit der Polymerase-Kettenreaktion. Bundesgesundheitsblatt (2000) 43:816-824.

Forschungsprojekt (2003 – 2005) / Promotion am CVUA Freiburg (2009)

Nachweis von *Campylobacter jejuni* und *Campylobacter coli* mittels Real-Time PCR

Grundlage: § 35 LMBG-Verfahren L 00.00-96 (V): Qualitativer Nachweis von *Campylobacter jejuni* und *C. coli* in Lebensmitteln (Bestätigung erfolgt mittels Southern-Blot / Sonden-Hybridisierung)

Specific detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by using polymerase chain reaction.

Oyofa BA1, Thornton SA, Burr DH, Trust TJ, Pavlovskis OR, Guerry P

J Clin Microbiol (1992); 30(10): 2613–2619. PMID: PMC2704 87

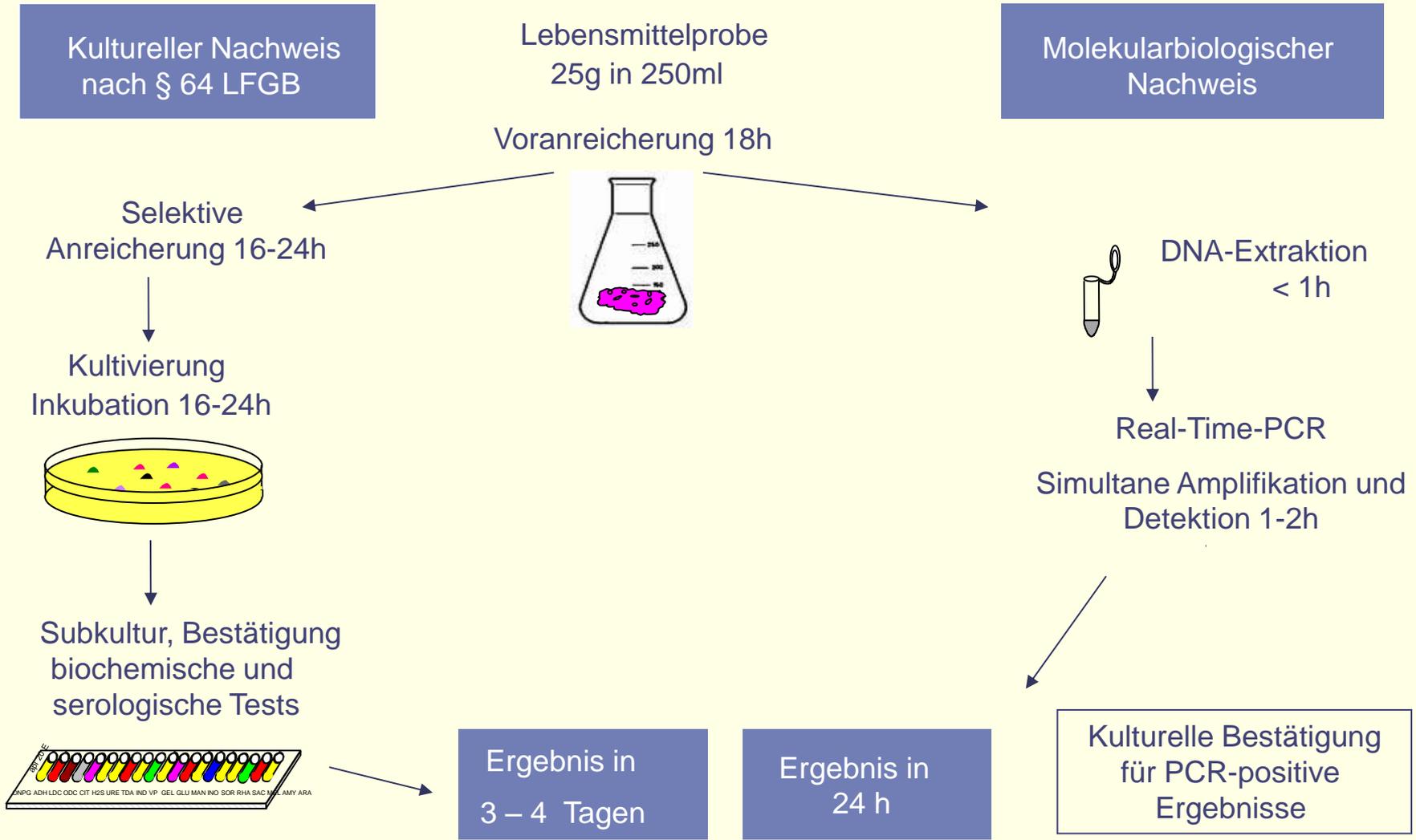
An oligonucleotide primer pair (pg50 – pg3) from a conserved 5' region of the flaA gene of C. coli VC167 was used to amplify a 450-bp region by PCR. The primer pair specifically detected 4 strains of C. coli and 47 strains of C. jejuni.

Ziel:

1.) Entwicklung einer Sonde für die Real-Time PCR: Sonde flaA AW

2.) Entwicklung eines Verfahrens für die Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren (ASU) = Norm

Kulturelle Verfahren vs. molekularbiologische Verfahren



Standardisierung / Normierung

Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren (ASU)

Für eine **harmonisierte Überwachung** und Kontrolle der Futtermittel und für die **Gerichtsfestigkeit** von Analyseergebnissen sind harmonisierte Untersuchungsverfahren eine unabdingbare Voraussetzung.

Dafür hat die Europäische Kommission in der **Kontrollverordnung (Verordnung (EG) Nr. 882/2004)** eine sogenannte „**Kaskadenregelung**“ vorgeschrieben: Durch die nationale Rechtssetzung (Futtermittelverordnung) erfolgt eine weitere Abstufung der wissenschaftlich anerkannten Methoden. Danach sind in der amtlichen Futtermittelkontrolle Untersuchungsverfahren in absteigender Reihenfolge zu verwenden:

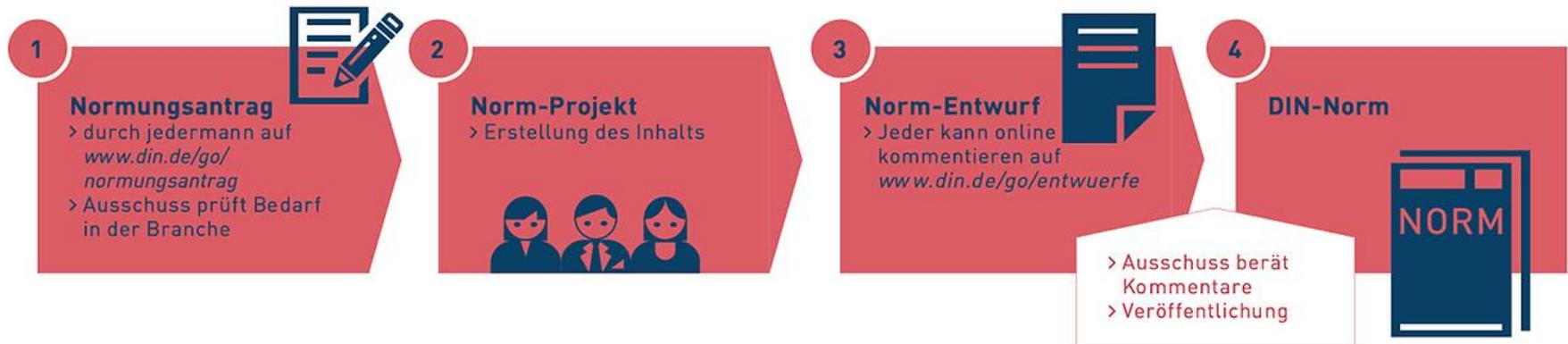
- **Untersuchungsverfahren aus gemeinschaftlichen Rechtsvorschriften,**
- **Untersuchungsverfahren, die international anerkannten Regeln genügen (z. B. CEN/ISO),**
- **Untersuchungsverfahren, die gemäß § 64 Abs. 2 LFVG vom BVL veröffentlicht worden sind,**
- **Untersuchungsverfahren, die vom Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (VDLUFA) veröffentlicht worden sind (Methodenbuch Band III: „Die chemische Untersuchung von Futtermitteln“ und Band VII: „Umweltanalytik“),**
- **andere wissenschaftlich anerkannte Untersuchungsverfahren.**

Damit kann ein einheitlicher Vollzug der futtermittelrechtlichen Regelungen sichergestellt werden.

Standardisierung von Nachweisverfahren in der Lebensmittelmikrobiologie

Was ist eine Norm?

Eine Norm ist ein Dokument, das (...) Verfahren festlegt. Sie unterstützt die **Rationalisierung** und **Qualitätssicherung** in Wirtschaft, Technik, Wissenschaft und Verwaltung. Sie dient der Sicherheit von Menschen und Sachen sowie der Qualitätsverbesserung in allen Lebensbereichen. Normen müssen im Konsens erstellt werden.



Standardisierung von Nachweisverfahren in der Lebensmittelmikrobiologie

Sind Normen Pflicht?

Die Anwendung von DIN-Normen ist grundsätzlich freiwillig. Erst wenn Normen zum Inhalt von Verträgen werden oder wenn der Gesetzgeber ihre Einhaltung zwingend vorschreibt, werden Normen bindend. Zwar stellen sie im Fall einer möglichen Haftung keinen Freibrief dar.

Aber wer DIN-Normen – als anerkannte Regeln der Technik – anwendet, kann ein korrektes Verhalten einfacher nachweisen.

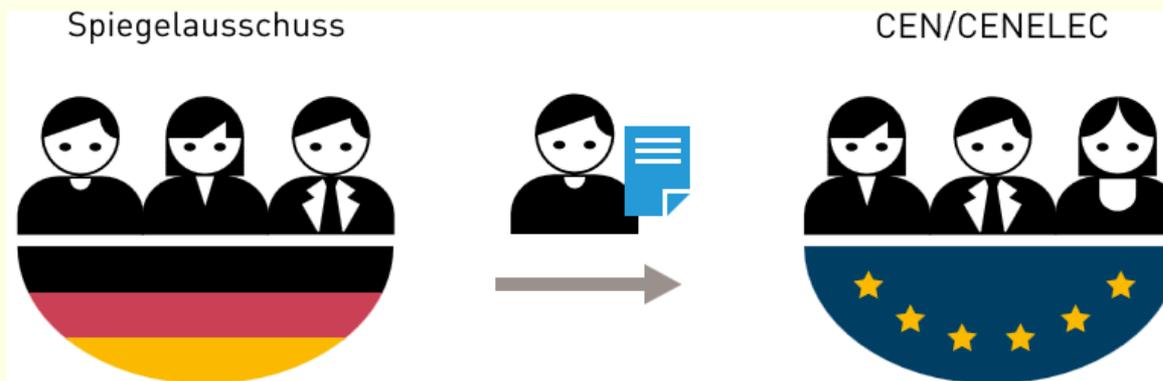
Siehe auch: **Gerichtsfestigkeit**

Standardisierung von Nachweisverfahren in der Lebensmittelmikrobiologie

Übernahme als nationale Norm in CEN Comité Européen de Normalisation

Nach einem positiven Abstimmungsergebnis wird eine Europäische Norm formal ratifiziert. Sie muss danach von den nationalen Normungsorganisationen unverändert als nationale Norm übernommen werden. Abweichende nationale Normen sind zurückzuziehen.

Jede angenommene Europäische Norm wird in Deutschland mit einem nationalen Vorwort als DIN-EN-Norm veröffentlicht.



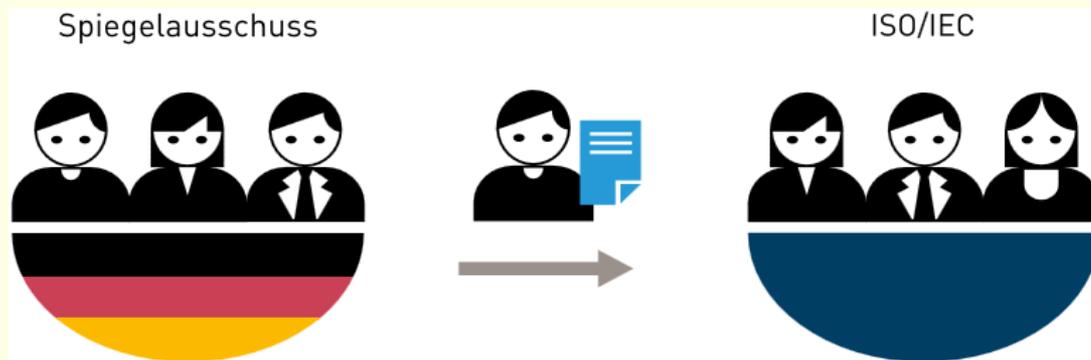
Quelle: din.de

Standardisierung von Nachweisverfahren in der Lebensmittelmikrobiologie

Die Erarbeitung Internationaler Normen findet auf internationaler Ebene unter dem Dach der Normungsorganisationen **ISO** und **IEC** statt (...). Sogenannte Spiegelgremien erarbeiten in jedem Mitgliedsland die nationale Stellungnahme, in Deutschland bei DIN.

Eine Verpflichtung der ISO- bzw. IEC-Mitglieder zur Übernahme der Internationalen Norm in das nationale Normenwerk besteht dabei nicht.

Auf internationaler Ebene erarbeitete Normen können durch parallele Erarbeitungs- und Abstimmverfahren gleichzeitig auch als Europäische Norm eingeführt werden und werden damit automatisch von den nationalen Normungsorganisationen übernommen.



Quelle: din.de

Standardisierung von Nachweisverfahren in der Lebensmittelmikrobiologie

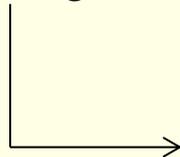
Deutsches Institut für
Normung (DIN)



NA -057-01-06
AA „Mikrobiologie in der
Lebensmittelkette“



NA -057-01-06-01
AK „PCR zum Nachweis von
Mikroorganismen“



CEN/TC 275/WG 6
Microbiology of the food chain

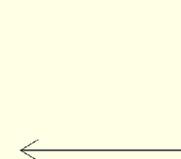
Amtliche Sammlung
nach § 64 LFGB



§ 64 LFGB Arbeitsgruppe
„Molekularbiologische
Methoden Mikrobiologie“



Deutsches Institut für
Normung (DIN)
Übernahme in DIN



§ 64 LFGB-Verfahren

L 00.00-96 (V): Qualitativer Nachweis von *Campylobacter jejuni* und *C. coli* in Lebensmitteln

Specific detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by using polymerase chain reaction

Oyofu BA1, Thornton SA, Burr DH, Trust TJ, Pavlovskis OR, Guerry P
J Clin Microbiol (1992); 30(10): 2613–2619. PMID: PMC270487

An oligonucleotide primer pair (pg50 – pg3) from a conserved 5' region of the *flaA* gene of *C. coli* VC167 was used to amplify a 450-bp region by PCR. The primer pair specifically detected 4 strains of *C. coli* and 47 strains of *C. jejuni*.

Bestätigung erfolgt mittels Southern-Blot / Sonden-Hybridisierung

Standardisierung von real-time-PCR-Verfahren für thermophile *Campylobacter* spp.

§ 64 LFGB-Methode L 06.32-1 2013-08: Nachweis von
Campylobacter spp. in Hackfleisch; real-time PCR-
Verfahren

NEU: DIN EN ISO 10272-2:2017-09: Mikrobiologie der
Lebensmittelkette - Horizontales Verfahren zum
Nachweis und zur Zählung von *Campylobacter* spp. -
Teil 2: Koloniezählverfahren (ISO 10272-2:2017);
Deutsche Fassung EN ISO 10272-2:2017

§ 64 LFGB-Verfahren

L 06.32-1 2013-08: Nachweis von *Campylobacter* spp. in Hackfleisch; Real-time-PCR-Verfahren

Anhang A:

Nachweis des 16S rRNA Gens thermophiler *Campylobacter* spp.

Josefsen, M. H., N. R. Jacobsen, J. Hoorfar (2004). Enrichment followed by quantitative PCR both for rapid detection and as a tool for quantitative risk assessment of food-borne thermotolerant *Campylobacter* spp. Appl. Environ. Microbiol. 70:3588-3592.

Anhang B:

Spezies-spezifischer Nachweis von *C. jejuni*, *C. coli* und *C. lari* mittels einer Quadruplex Real-time PCR

Mayr, A.M., Lick, S., Bauer, J., Thärigen, D., Busch, U., Huber, I. (2010): Rapid detection and differentiation of *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, and *Campylobacter lari* in food, using multiplex real-time PCR. J Food Prot. 73(2):241-50.

§ 64 LFGB-Verfahren

L 06.32-1 2013-08: Nachweis von *Campylobacter* spp. in Hackfleisch; real-time-PCR-Verfahren

Anhang A:

Nachweis des 16S rRNA Gens thermophiler *Campylobacter* spp.

Primer- und Sondensequenzen zum Nachweis von *Campylobacter*-DNA mittels real-time-PCR

System	Bezeichnung	Sequenz (5'-3')	Länge
16S rRNA <i>Gen</i>	16SrRNA-fw	CTGCTTAACACAAGTTGAGTAGG	287 bp
	16SrRNA-re	TTCCTTAGGTACCGTCAGAA	
	Sonde 16SrRNA	FAM-TGTCATCCTCCACGCGGCGTTGCTGC-NFQ	
IPC-ntb2	IPC-ntb2-fw	ACCACAATGCCAGAGTGACAAC	125 bp
	IPC-ntb2-re	TACCTGGTCTCCAGCTTTCAGTT	
	Sonde IPC- ntb2-probe	HEX-CACGCGCATGAAGTTAGGGGACCA-NFQ	

§ 64 LFGB-Verfahren

L 06.32-1 2013-08: Nachweis von *Campylobacter* spp. in Hackfleisch; real-time-PCR-Verfahren

Anhang B:

Spezies-spezifischer Nachweis von *C. jejuni*, *C. coli* und *C. lari* mittels einer Quadruplex Real-time PCR

Primer- und Sondensequenzen zum Nachweis von <i>Campylobacter</i> DNA mittels real-time-PCR			
System	Bezeichnung	Sequenz (5'-3')	Länge
<i>mapA</i> (<i>C.jejuni</i>)	mapA-fw	CTGGTGGTTTTGAAGCAAAGATT	95 bp
	mapA-re	CAATACCAGTGTCTAAAGTGCGTTTAT	
	Sonde mapA	FAM- TTGAATTCCAACATCGCTAATGTATAAAAGCCCTTT- NFQ	
IPC-ntb2	IPC-ntb2-fw	ACCACAATGCCAGAGTGACAAC	125 bp
	IPC-ntb2-re	TACCTGGTCTCCAGCTTTCAGTT	
	IPC-ntb2-probe	HEX-CACGCGCATGAAGTTAGGGGACCA-NFQ	
<i>gyrA</i> (<i>C.lari</i>)	gyrA1-fw1	GATAAAGATACGGTTGATTTTGTACC	112 bp
	gyrA1-re1	CAGCTATAACCACTTGATCCATTAAG	
	gyrA1-fw2	GATAAAGATACAGTTGATTTTATACC	111 bp
	gyrA1-re2	TGCAATACCACTTGAACCATTA	
	Sonde gyrA1	ROX-TTATGATGATTCTATGAGTGAGCCTGATG-NFQ	
<i>ceuE</i> (<i>C.coli</i>)	ceuE-fw	AAGCTCTTATTGTTCTAACCAATTCTAACA	102 bp
	ceuE-re	TCATCCACAGCATTGATTCCTAA	
	Sonde ceuE	Cy5-TTGGACCTCAATCTCGCTTTGGAATCATT-NFQ	

§ 64 LFGB-Verfahren

L 06.32-1 2013-08: Nachweis von *Campylobacter* spp. in Hackfleisch; real-time-PCR-Verfahren

Ringversuch zur Methodvalidierung:

- durchgeführt mit 9 Labors
- Untersuchung von jeweils 16 Schweinehackfleischproben (a´ 25 g)
- Kontaminationsraten:
 - 8 Proben mit 10^2 KbE/ Probe *C. jejuni*
 - 8 Proben mit 10^3 KbE/ Probe *E. coli*
- Selektivanreicherung nach ISO 10272-1 mit anschließender thermischer Lyse

§ 64 LFGB-Verfahren

L 06.32-1 2013-08: Nachweis von *Campylobacter* spp. in Hackfleisch; real-time-PCR-Verfahren

Ringversuch zur Methodvalidierung:

Anhang A: Nachweis des 16S rRNA Gens thermophiler *Campylobacter* spp.

- 98,6 % Sensitivität
- 100 % Spezifität

Anhang B: Spezies-spezifischer Nachweis von *C. jejuni*, *C. coli* und *C. lari* mittels einer Quadruplex Real-time PCR

- 100 % Sensitivität
- 100 % Spezifität

cp-Werte der positiven Ergebnisse zeigten **starke Unterschiede innerhalb eines Labors** und **zwischen den Laboren**

Problemstellungen beim Einsatz von real-time-PCR-Verfahren in der Routinediagnostik

- große Diskrepanz zwischen real-time-PCR-Ergebnissen und Isolierungsraten
 - hohe Sensitivität der real-time-PCR-Verfahren
 - Erfassung von VBNC-Stadien
 - Nachweis „toter DNA“?
- molekularbiologischen Ergebnisse können von den kulturell erzielten Nachweisen abweichen
- im Bereich der Lebensmittelmikrobiologie gilt eine Probe nur mit Erregernachweis als positiv, Nachweis thermophiler *Campylobacter* spp. mittels kultureller Verfahren werden möglicherweise nur einen Teil der reell kontaminierten Proben erfasst

**Vielen Dank für die
Aufmerksamkeit!**

