

**Tierärztliche Hochschule Hannover**

**Vorkommen, phänotypische Charakterisierung und Bedeutung von  
*Escherichia coli* aus Wildfleisch**

INAUGURAL – DISSERTATION  
zur Erlangung des Grades  
eines Doktors der Veterinärmedizin  
- Doctor medicinae veterinariae -  
( Dr. med. vet. )

vorgelegt von

**Rafael Hernán Mateus Vargas**

Bogotá, Kolumbien

Hannover 2014

Wissenschaftliche Betreuung: Prof. Dr. V. Atanassova  
Univ.-Prof. Dr. G. Klein  
Institut für Lebensmittelqualität und –sicherheit

1. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. G. Klein  
Prof. Dr. V. Atanassova
2. Gutachter: Prof. Dr. D. Steinhagen

Tag der mündlichen Prüfung: 10.11.2014

Der Autor dieser Dissertation erhielt während der Forschungsarbeit ein Stipendium von dem *Deutschen Akademischen Austausch Dienst* (DAAD; Bonn, Deutschland).

*para mi familia*

Vorläufige Ergebnisse dieser Dissertation sind in der Zeitschrift Fleischwirtschaft sowie als Posterbeitrag auf der „53. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der DVG, - Dreiländertagung –vom 25. September bis zum 28. September 2012, Garmisch-Partenkirchen“ bereits veröffentlicht worden.

Mateus-Vargas, R.H., Stüber, K., Klein, G., Atanassova, V. (POSTER). **Vorkommen, biochemische Charakterisierung und Antibiotikaresistenz von *Escherichia coli* aus Wildfleisch.** In: DVG, Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene. 25. Sept. bis 28. Sept. 2012, Garmisch-Partenkirchen, Deutschland.

Mateus Vargas, R.H., F. Reich, G. Klein, V. Atanassova (2013): **Bakterielle Kontamination und Antibiotikaresistenzen bei Isolaten aus verpacktem Wildfleisch.** Fleischwirtsch. 93, 179-182.

# INHALTSVERZEICHNIS

## INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG.....	1
2. LITERATURÜBERSICHT .....	3
2.1. Wildfleisch als Nahrungsmittel .....	3
2.2. Rechtliche Grundlage .....	4
2.3. Bakterielle Mikroflora von Wildfleisch .....	5
2.3.1 Einflussfaktoren für die Entstehung und Entwicklung der Mikroflora .....	5
2.3.2 Bakterielle Krankheitserreger in Wildfleisch .....	9
2.3.2.1 <i>Escherichia coli</i> .....	10
2.3.2.2 <i>Campylobacter</i> spp.....	13
2.3.2.3 <i>Salmonella</i> spp. ....	14
2.3.2.4 <i>Yersinia</i> spp.....	15
2.3.2.5 <i>Listeria</i> spp.....	16
2.4. Resistenz gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen .....	17
2.4.1 Grundlage und Bedeutung der Entwicklung von Antibiotikaresistenzen bei Bakterien .....	17
2.4.2 Resistente Bakterien als Zoonoseerreger .....	20
2.4.3 Vorkommen resistenter Bakterien bei frei lebenden Wildtieren .....	21
3. MATERIAL UND METHODEN .....	23
3.1. Mikrobiologische Untersuchung .....	23
3.1.1 Quantitative Untersuchung auf Hygieneparameter.....	23
3.1.2 Untersuchung auf Zoonoseerreger .....	25
3.2. Untersuchung der Antibiotikaempfindlichkeit .....	26
3.3. Charakterisierung von <i>E. coli</i> .....	28
3.3.1 Zuordnung der <i>E. coli</i> -Isolate anhand der API 20E-Profile .....	28

3.3.2 Molekularbiologische Charakterisierung unempfindlicher <i>E. coli</i> -Stämme .....	29
3.4. Statistische Auswertung .....	30
4. ERGEBNISSE .....	32
4.1. Mikrobiologische Untersuchungen.....	32
4.2. Empfindlichkeitstestung von <i>E. coli</i> -Isolaten.....	37
4.3. Phänotypische Charakterisierung von <i>Escherichia coli</i> aus Wildfleisch .....	41
5. DISKUSSION.....	46
5.1. Mikrobiologische Qualität von verpacktem Wildfleisch.....	46
5.1.1 Hygienische Qualität des verpackten Wildfleisches .....	47
5.1.1.1 Aerobe mesophile Gesamtkeimzahl.....	47
5.1.1.2 <i>Enterobacteriaceae</i> und <i>Escherichia coli</i> .....	48
5.1.1.3 Beurteilung der Hygiene anhand der mikrobiologischen Kriterien für Lebensmittel nach VO (EG) 2073/2005.....	52
5.1.2 Mikrobiologische Sicherheit des verpackten Wildfleisches .....	53
5.1.2.1 Koagulase-positive Staphylokokken und <i>Listeria monocytogenes</i> .....	53
5.1.2.2 <i>Salmonella</i> spp. ....	55
5.2. Antibiotikaempfindlichkeit der <i>E. coli</i> -Isolate aus Wildfleisch .....	57
5.3. Charakterisierung von <i>E. coli</i> -Isolaten aus verpacktem Wildfleisch .....	63
5.3.1 Biochemische Charakterisierung von bei Wildfleisch vorkommenden <i>E. coli</i> - Populationen anhand der API 20E- Profile.....	63
5.3.2 Charakterisierung von <i>E. coli</i> -Isolaten mit unterschiedlichen Unempfindlichkeitsmustern .....	64
6. SCHLUSSFOLGERUNGEN .....	69
7. ZUSAMMENFASSUNG .....	71
8. SUMMARY .....	74
9. ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	77

10.	TABELLENVERZEICHNIS .....	78
11.	LITERATURVERZEICHNIS .....	79
12.	ANHANG.....	101
13.	DANKSAGUNG.....	105

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

AGMRC	Agricultural Marketing Resource Center
BMELV	Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz
BVDF	Bundesverband der Deutschen Fleischwarenindustrie E.V.
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
DJV	Deutscher Jagdverband
DNA	Desoxyribonucleic Acid
DVG	Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft
ECDC	Zentrum für die Prävention und die Kontrolle von Krankheiten
ECOFF	Epidemiological cut-off
ECOR	phylogenetische Hauptgruppen
EFSA	Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility
ExPEC	Extraintestinal Pathogenic <i>Escherichia coli</i>
KbE	Kolonie-bildende Einheit(en)
LFGB	Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch
Log <sub>10</sub>	dekadischer Logarithmus
MHK	Minimale Hemmkonzentration
p	p-Wert (statistischer Signifikanzwert)
PCR	Polymerase Chain Reaction
rpm	revolutions per minute
VO	Verordnung
VTEC	Verotoxinbildende <i>E. coli</i>
WHO	World Health Organization



# ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

## Antibiotikaabkürzungen

ALC	Azlocillin
AMP	Ampicillin
AMS	Ampicillin/Sulbactam
AZT	Aztreonam
CAZ	Ceftazidim
CEC	Cefaclor
CEP	Cefepim
CEZ	Cefazolin
CFI	Cefixim
CMP	Chloramphenicol
COX	Cefoxitin
CTM	Cefotiam
CTX	Cefotaxim
DOX	Doxycyclin
FOP	Cefoperazone
MZL	Mezlocillin
PIP	Piperacillin
TIC	Ticarcillin
TOB	Tobramycin



## 1. EINLEITUNG

Lebensmittel tierischen Ursprungs bleiben, nach Angaben der Weltgesundheitsorganisation, weltweit einer der wichtigsten Wege zur Übertragung pathogener Erreger von Tieren auf Menschen. Ein bedeutender Faktor bei der Epidemiologie vieler lebensmittelbedingter Erkrankungen ist das hohe Kontaminierungsrisiko des Muskelgewebes, das entlang des Gewinnungsprozesses besteht. Aufgrund dessen sind die Vorbeugung dieser Kontamination, sowie die durchgeführten Maßnahmen zur Kontrolle der bakteriellen Vermehrung von besonderer Bedeutung. Des Weiteren zählt das Produkt „Fleisch“ zu den leicht verderblichen Lebensmitteln und muss infolgedessen gemäß hygienischer Vorschriften auf allen Herstellungsstufen so behandelt werden, dass dem Endverbraucher nicht nur ein sicheres, sondern auch ein qualitativ hochwertiges Produkt zur Verfügung steht.

Im Gegensatz zur traditionellen Fleischproduktion, sind mehrere Faktoren, die die mikrobiologische Qualität eines Wildfleischproduktes aufgrund der Gewinnungsart gefährden, nur schwer oder nicht kontrollierbar. Sowohl die Erlegungsumstände, als auch die anschließende Weiterbehandlung, stellen bei der Aufrechterhaltung der hygienischen Qualität von Wildbret eine Herausforderung dar. Zudem sind freilebende Wildtiere als asymptomatische Reservoirre wichtiger Zoonoseerreger in Betrachtung zu ziehen.

Von Seiten des Endverbrauchers erfreut sich Wildfleisch zunehmender Nachfrage. Aufgrund seines höheren Gehalts an qualitativ hochwertigen Nährstoffen gibt es ein gesteigertes Interesse daran, Wildfleisch und Wildfleischerzeugnisse im Einzelhandel zu vermarkten. Obwohl verschiedene Studien sich mit dem Hygienestatus von frischen oder bereits gekühlten Wildfleischkörpern befasst haben, ist die Information über die mikrobiologische Qualität verpackter Wildfleischendprodukte unzureichend.

Das Ziel dieser Arbeit war es, das Wissen über den mikrobiologischen Status des verpackten Wildfleisches von Reh-, Rotwild und Wildschwein, durch die Untersuchung auf verschiedene Hygieneparameter sowie Zoonoseerreger, zu erweitern. In Bezug auf VO (EG) 2073/2005 wurde der Hygieneparameter *Escherichia coli* besonders berücksichtigt. Des Weiteren wurde die antimikrobielle Empfindlichkeitssituation ausgewählter *E. coli*-Isolate untersucht.

Unempfindliche *E. coli*-Isolate wurden mittels PCR zur Weitercharakterisierung den phylogenetischen Hauptgruppen (ECOR) zugeordnet.

## 2. LITERATURÜBERSICHT

### 2.1. Wildfleisch als Nahrungsmittel

Aufgrund des hohen Gehalts an qualitativ hochwertigen Nährstoffen wird das Lebensmittel Wildfleisch für einen wertvollen Bestandteil der Ernährung gehalten (BANDICK u. RING 1996). Dieses Produkt tierischen Ursprungs wird nicht mehr nur als ein exotisches, eiweißhaltiges Lebensmittel betrachtet, welches in kleinerem Umfang von Jägern in bestimmten Regionen direkt vermarktet bzw. konsumiert wird, sondern als Produkt mit zunehmendem Vermarktungspotential angesehen (HOFFMAN u. WIKLUND 2006). Aufgrund der gesteigerten Bereitschaft zum Kauf von Wildfleisch und Wildfleischerzeugnissen im Lebensmitteleinzelhandel wird die Veränderung der traditionellen Absatzwege sowie die Anpassung der Angebotsformen des Wildbrets gefordert (HURLIN u. SCHULZE 2007).

Im Zeitraum 2011–2012 betrug der jährliche Pro-Kopf-Konsum in Deutschland von Wildfleisch lediglich 1 kg und nahm im deutschen Gesamtfleischverbrauch (61,6 kg) nur einen geringen Anteil ein. Trotz des vergleichsweise niedrigen Pro-Kopf-Verbrauches, im Vergleich zu traditionellen Fleischsorten von Nutztieren, hat der Konsum von Wildfleisch eine stabile Anstiegstendenz, die nicht nur in Deutschland sondern auch in anderen Ländern wie z.B. den USA nachweisbar ist (DJV 2012; AGMRC 2012; BVDF 2013). Nach Schätzungen für das Jahr 2011 wird der deutsche Wildfleischmarkt zu etwa 61% durch das Angebot von frischen sowie tiefgefrorenen Produkten aus heimischer Jagd und nationaler landwirtschaftlicher Erzeugung gedeckt (BMELV 2012). Der restliche Anteil des Marktes wird mit Wildfleischerzeugnissen aus dem Import in Form von tiefgefrorenen Waren versorgt (HURLIN u. SCHULZE 2007). Obwohl der Verzehr im Restaurant immer noch als der wichtigste Absatzweg des Wildbrets gilt, steigen die Zahlen der Verbraucher, die Wildfleischprodukte für den privaten Konsum zubereiten (DJV 2012). Die Vermarktung von tiefgefrorenen Wildfleischprodukten in Einzelhandelsbetrieben spielt dabei eine wichtige Rolle, da diese Angebotsform den Zugang für viele Konsumenten vereinfacht (HURLIN u. SCHULZE 2007).

## 2.2. Rechtliche Grundlage

Zur Gewährleistung der Qualität und Sicherheit des Lebensmittelproduktes tierischen Ursprungs gelten für Wildfleisch die gleichen EU-Lebensmittelhygienerichtlinien wie bei der Erzeugung und Vermarktung von traditionellen Fleischprodukten. Somit gelten die VO (EG) 852/2004, VO (EG) 853/2004 und VO (EG) 854/2004, sowie die „Basisverordnung“ [VO (EG) 178/2002] als rechtliche Grundlage für die Erzeugung und Vermarktung von Wildfleisch.

In der VO (EG) 178/2002 sowie VO (EG) 852/2004 werden allgemeine Grundlagen für die hygienische Herstellung von Lebensmitteln tierischen Ursprungs erläutert. Dabei wird der Grundsatz, dem Verbraucher die Sicherheit des tierischen Produktes zu garantieren, in den Vordergrund gestellt. Um dieses Ziel zu erreichen, soll die Herstellung nach dem Prinzip der Risiko-Analyse Kritischer Kontroll-Punkte (HACCP) erfolgen. Des Weiteren ist die Gewährleistung der Rückverfolgbarkeit des Fleischproduktes entlang der gesamten Herstellungskette von besonderer Bedeutung. Durch diese beiden Verordnungen obliegt sowohl dem Jäger als auch dem Wildgatterbesitzer die Verantwortung für die Durchführung adäquater Hygienemaßnahmen in der Primärproduktion und Weiterverarbeitung, da sie als Lebensmittelunternehmer betrachtet werden und somit verpflichtet sind, die rechtlichen Anforderungen und Hygienevorschriften zu erfüllen.

Die VO (EG) 853/2004 und VO (EG) 854/2004 ergänzen die o.g. Vorschriften. In diesen Verordnungen werden zum Schutz der öffentlichen Gesundheit einerseits spezifische Hygienevorschriften für den gesamten Produktionsprozess sowie das Inverkehrbringen, und andererseits die Verfahrensvorschriften zur Überprüfung und amtlichen Überwachung der Einhaltung der Hygieneanforderungen festgesetzt.

Ausgeschlossen von diesen Vorschriften bleibt dennoch die Herstellung, einschließlich der Primärproduktion, sowie die Lagerung von Lebensmittelprodukten, die für den privaten Verbrauch bestimmt sind. Die direkte Abgabe von Primärerzeugnissen vom Erzeuger an den Endverbraucher bzw. an lokale Verbrauchermärkte, die diese Erzeugnisse dem Endverbraucher anbieten, ist von diesen Vorschriften ebenfalls nicht betroffen [VO (EG) 178/2002; VO (EG) 852/2004; VO (EG) 853/2004; VO (EG) 854/2004].

Zur Erfüllung der Anforderungen und Ziele, die in den o.g. Verordnungen angegeben sind, werden in VO (EG) 2073/2005 mikrobiologische Kriterien sowie Richt- und Grenzwerte vorgeschrieben. Diese dienen für die sachliche Beurteilung der Sicherheit sowie der hygienischen Qualität von Lebensmitteln tierischen Ursprungs. Nach dieser Verordnung ist die quantitative Untersuchung auf aerob wachsende Keime, *Enterobacteriaceae* und *Escherichia coli* als Parameter für die Überprüfung der Hygienehandhabung während des Herstellungsprozesses durchzuführen. Des Weiteren soll das Vorhandensein von *Salmonella* spp. zur Überprüfung der Annehmbarkeit der dem Verbraucher angebotenen Fleischerzeugnisse untersucht werden, die zum Verzehr in durcherhitztem Zustand bestimmt sind. Die in dieser Verordnung angegebenen mikrobiologischen Richt- und Grenzwerte gelten ausdrücklich für Schlachtkörper bzw. Erzeugnisse von traditionellen Fleischarten (Rinder, Schafe, Ziegen, Pferde und Schweine), können aber aufgrund fehlender spezifischen Angaben für Großwildtierkörper bzw. Wildfleischprodukte, die von Wildbearbeitungsbetrieben oder Dritten verarbeitet bzw. vermarktet werden, zur Orientierung angewendet werden (PAULSEN 2011).

### **2.3. Bakterielle Mikroflora von Wildfleisch**

#### ***2.3.1 Einflussfaktoren für die Entstehung und Entwicklung der Mikroflora***

Die mikrobiologische Besiedlung von Fleischprodukten während der Gewinnung und Weiterbearbeitung ist unvermeidbar (REUTER 2008). Mikroorganismen verschiedenen Ursprungs erreichen vor oder nach der Schlachtung bzw. Erlegung des Tieres unterschiedliche Ebenen des muskulären Gewebes oder der inneren Organe. In Abhängigkeit von der Lokalisation und Ursprungsbereich wird die bakterielle Fleischmikroflora zwischen der Tiefenflora und der Oberflächenflora unterschieden. Die Tiefenmikroflora entsteht durch die Verbreitung von körpereigenen Mikroorganismen durch das Kreislaufsystem noch vor dem Tod des Tieres. Die Folge ist das Eindringen der Mikroorganismen in tiefe Bereiche der Muskulatur (REUTER 1984). Zum Zeitpunkt des Todes ist davon auszugehen, dass die Muskulatur gesunder Tiere keimfrei ist (FEHLHABER u. ALTER 1999). Laut SCHÜPPEL et al. (1994) ist prämortaler Stress bei regulärer Schlachtung gesunder Tiere, also unter Beachtung der tierschutz- und hygienerelevanten Vorschriften, ein weiterer Grund für das Vorkommen dieser Art bakterieller Kontamination. Die Oberflächenmikroflora entsteht

hingegen durch postmortale Kontamination, die von der Umgebung, den Menschen aber auch den Tieren während des Fleischgewinnungsprozesses verursacht wird (REUTER 1984). Durch diese Art von Kontamination erreichen die Keime zunächst die Oberfläche des Gewebes, können aber mit der Zeit in tiefere Schichten des Fleisches eindringen (GILL u. PENNEY 1977). Durch den endogenen sowie exogenen Weg erreichen unterschiedliche Keimgruppen das Fleischprodukt. Diese leiten nicht nur den bakteriellen Fleischverderb ein, sondern können auch ein potentiell Gesundheitsrisiko für die Konsumenten darstellen (BORCH et al. 1996). Da das Risiko einer bakteriellen exogenen Kontamination des Fleisches und nachfolgender Entstehung einer Oberflächenmikroflora entlang der ganzen Herstellungskette besteht, ist die Einhaltung einer guten Hygienepraxis bei Umgang mit dem Fleischprodukt auf dem gesamten Weg bis zum Endverbraucher von besonderer Bedeutung (REUTER 2008). Für die Aufrechterhaltung der mikrobiologischen Qualität sowie der Haltbarkeit des Fleischproduktes spielt eine ständige Kühlung bei der Lagerung und auch bei der Verarbeitung eine Schlüsselrolle, um die Vermehrung der auf der Fleischoberfläche bereits vorhandenen bakteriellen Mikroflora gering zu halten (KLEIN u. LOUWERS 1994).

Im Vergleich zum Gewinnungsprozess von Fleischprodukten wirtschaftlicher Nutztiere wird der mikrobiologische Status des Wildbrets, vom Erlegen bis zur Endverarbeitung, von mehreren Faktoren bestimmt. Nach GILL (2007) hängt die mikrobiologische Beschaffenheit der Wildtier-Karkassen und der aus ihnen hergestellten Wildfleischerzeugnisse nicht nur von der Art der Mikroorganismen ab, die sich auf dem Fell oder im Gastro-Intestinaltrakt befinden, sondern auch von den Umständen, unter denen die Erlegung bzw. die Versorgung der Tierkörper stattfindet.

In verschiedenen Arbeiten wurden mehrere Faktoren betrachtet, welche die mikrobiologische Qualität von Wildfleisch beeinflussen. In Bezug auf die erste Phase der Wildfleischgewinnung (Erlegung und Versorgung der Tierkörper) wurde ermittelt, dass eine schlechte Trefferlage des Schusses (ATANASSOVA et al. 2008; AVAGNINA et al. 2012), eine große Zeitspanne zwischen Schuss und Tod (HOFFMAN u. LAUBSCHER 2010), sowie eine verzögerte Versorgung des Tierkörpers (DEUTZ et al. 2000; PAULSEN u. WINKELMAYER 2004; APELT 2007), den bakteriologischen Zustand des Wildbrets negativ beeinflussen. Darüber hinaus konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass sowohl



der gesundheitliche Zustand des beschossenen Tieres als auch die Jagd- und Aufbrechmethode sowie die Umweltbedingungen, unter denen die Erlegung bzw. die Versorgung durchgeführt wird, von Bedeutung sind (VAARALA u. KORKEALA 1999; DEUTZ et al. 2000, 2006; AVAGNINA et al. 2012; ZWEIFEL et al. 2012; VAN der MERWE et al. 2013). Außerdem konnten einige Autoren zeigen, dass die Größe des Tieres die Aufrechterhaltung der Hygiene des Fleisches der im Feld erlegten und versorgten Wildtiere, beeinflussen kann (ZIEGENFUSS 2003; PAULSEN u. WINKELMAYER 2004). Studien mit traditionellen Nutztierarten oder gezüchteten Wildtierarten hingegen zeigten, dass dieser Faktor bei der Schlachtung die mikrobiologische Qualität des Fleischproduktes nicht signifikant beeinflusst (JERICHO et al. 1994; VAN der MERWE et al. 2013). Die fehlerhafte Beherrschung der Einflussfaktoren während der Gewinnung spiegelte sich in den oben genannten Studien in hohen Prävalenzen von aerob wachsenden Bakterien sowie Darmkeimen auf der Fleischoberfläche wieder. Ferner ist ein guter Hygienestatus bei frischen Wildtierkörpern erreichbar, wenn die Tiere waidgerecht erlegt und versorgt werden (APELT 2007).

Die Entwicklung der Mikroflora, die während des Gewinnungsprozesses auf der Fleischoberfläche entsteht, ist in allen nachfolgenden Bearbeitungsschritten von der Lagertemperatur abhängig (GILL 2007). Gemäß VO (EG) 853/2004, sind die Tierkörper, nach der Erlegung und Versorgung, innerhalb einer angemessenen Zeitspanne unter Kühlbedingungen zu lagern, die eine Körperinnentemperatur von höchstens +7 °C ermöglichen [VO (EG) 583/2004 Anh. III Abschn. IV Kap. II Nr. 5]. Die schnelle Einsetzung der Kühlung sowie eine kontinuierliche Kühllagerung sind, neben einem niedrigen Anfangskeimgehalt, notwendig, um die Haltbarkeit sowie die Sicherheit des Produktes gewährleisten zu können (KRÖCKEL u. HECHELMANN 1999).

Entsprechend verschiedenen Literaturangaben erfolgt nach der Erlegung von frei lebendem Großwild der Anfang des Kühlregimes meist innerhalb der ersten 6 Stunden nach dem Erlegen, kann sich in Ausnahmefällen aber bis zu 78 Stunden verzögern (BRODOWSKI u. BEUTLING 1998; DEUTZ et al. 2006). Die Studien von MAAHS (2010) und STÜBER (2012) bestätigten einerseits die wichtige Rolle des Ausgangskeimgehaltes in der mikrobiellen Qualität des gelagerten Wildfleisches von Reh-, Rot- und Schwarzwild, und

zeigten andererseits, welchen Einfluss die Dauer bis zum Kühlbeginn auf die quantitative Entwicklung der Mikroflora des Wildstückes ausübt. Die Ergebnisse dieser Arbeiten zeigten, dass deutlich höhere Oberflächenkeimgehalte zu erwarten sind, wenn die aktive Kühlung in dem Wildbearbeitungsbetrieb ( $-1^{\circ}\text{C}$  bis  $+4^{\circ}\text{C}$ ) erst nach 48 Stunden beginnt, als wenn die Tierkörper unmittelbar nach dem Erlegungszeitpunkt unter den gleichen Temperaturbedingungen gekühlt werden. Erfolgt der Gewinnungsprozess unter hohen Umgebungstemperaturen (Sommer im Vergleich zu Winter), kann es zum schnelleren Keimzahlanstieg an den Wildtierkörpern kommen (PAULSEN u. WINKELMAYER 2004).

Während der anschließenden Lagerung des Tierkörpers bzw. der Fleischprodukte werden quantitative sowie qualitative Veränderungen der Fleischmikroflora erwartet, dieses in Abhängigkeit von der Höhe der Lagerungstemperatur sowie der Verpackungsart (DE FILLIPIS et al. 2013). Auf Handelsebene wurde der Einfluss der Lagerungskonditionen auf die mikrobiologische Qualität der im Einzelhandel angebotenen Wildfleischstücke ermittelt. Dabei tendierten kühlgelagerte Wildfleischerzeugnisse dazu, höhere Keimzahlen aufzuweisen, als die tiefgefrorenen Wildfleischprodukte (MEMBRÉ et al. 2011). Reihenuntersuchungen zur Fleischreifung von Reh-, Rot- und Wildschweinfleisch ermittelten Unterschiede beim Keimzahlanstieg zwischen den Lagerungstemperaturen von  $-1^{\circ}\text{C}$ ,  $+4^{\circ}\text{C}$  und  $+7^{\circ}\text{C}$ . Bis zu 15 Tagen bei allen überprüften Kühltemperaturen wiesen die untersuchten Wildtierkörper einen befriedigenden Hygienezustand auf, in Anlehnung an die Richtwerte der VO (EG) 2073/2005 (MAHHS 2010; STÜBER 2012). Nach Angaben von DEUTZ et al. (2000), kann eine Lagerdauer von 15 Tagen bei max.  $1^{\circ}\text{C}$  bzw. 7 Tagen bei max.  $7^{\circ}\text{C}$  aus hygienischer Sicht problematisch sein, insbesondere wenn die Wildtierkörper zum Zeitpunkt der Abgabe an Wildsammelstellen hohe Oberflächenkeimgehalte zeigen. PAULSEN et al. (2005) sehen ein Kühlungsregime nahe  $0^{\circ}\text{C}$  zur Gewährleistung der mikrobiologischen Qualität des vakuumverpackten Wildfleisches als geeignet an.

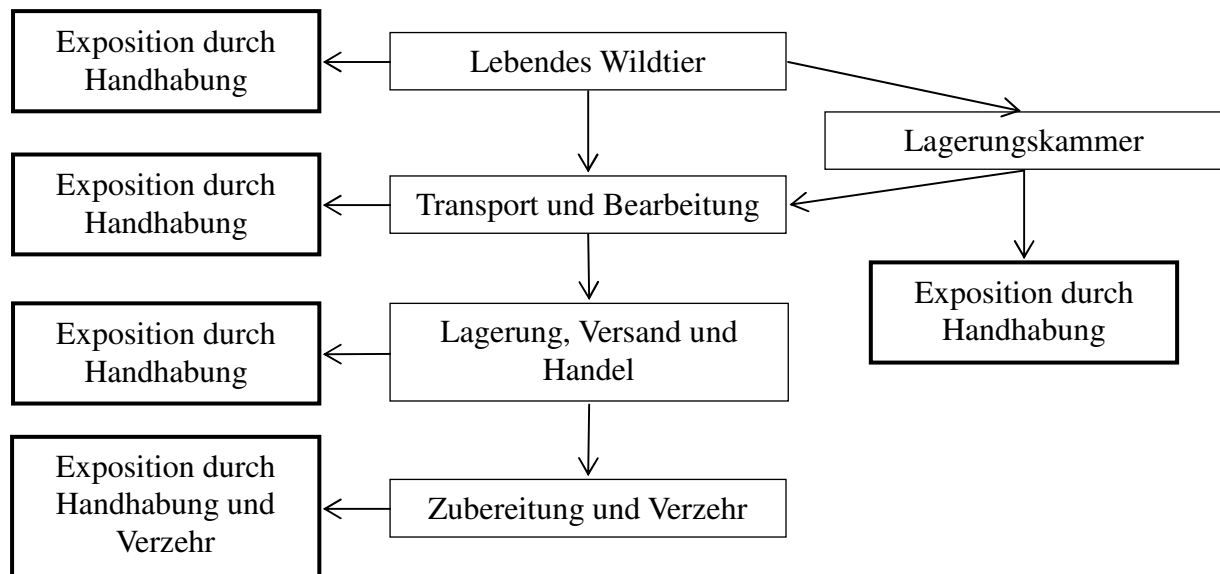
Die Studien von KOBE u. RING (1992), KANAI et al. (1997), TÜRCK (2008), WACHEK (2008) und MEMBRÉ et al. (2011) konnten zeigen, dass Wildfleisch auf Handelsebene die mikrobiologischen Standards erfüllen kann, die für traditionelle Fleischprodukte als Voraussetzung für die Vermarktung vorgegeben werden. Trotzdem sollte davon ausgegangen

werden, dass vermarktetes Fleisch frei lebender Tiere höhere Keimgehalte aufweist, als das Fleisch von landwirtschaftlichen Nutztieren (PAULSEN 2005).

### ***2.3.2 Bakterielle Krankheitserreger in Wildfleisch***

Eine Vielzahl von humanpathogenen parasitären, viralen bzw. bakteriellen Mikroorganismen befindet sich im Organismus nicht nur von kranken, sondern auch von gesunden Tieren (KRUSE et al. 2004). Die sämtlichen Infektionen, die durch den direkten Kontakt von Menschen mit infizierten Tieren oder indirekten Kontakt mit kontaminierten Erzeugnissen verursacht werden, werden als Zoonosen bezeichnet [EU Zoonoserichtlinie (92/117 EWG)]. In Bezug auf die öffentliche Gesundheit ist die Übertragung von Zoonoseerregern durch den Konsum von Lebensmittelprodukten tierischen Ursprungs von großer Bedeutung (EFSA 2013).

Bei der Verbreitung von endemischen bzw. neuen infektiösen Nutztier- sowie Humankrankheiten werden Wildtiere als wichtiger Faktor betrachtet (KRUSE et al. 2004; TRAVIS et al. 2011). Da aufgrund der heutigen Lebensweise der Verbraucher die Übertragung von Zoonosen durch direkten Kontakt des Menschen mit frei lebenden Wildtieren nur eingeschränkt vorhanden ist, kann der Konsum von Wildtierprodukten eine größere Rolle in der Epidemiologie verschiedener Zoonoseerreger spielen (CHOMEL et al. 2007). Insbesondere wenn der Verbrauch der Wildfleischerzeugnisse nicht mehr auf den häuslichen Konsum oder die unmittelbare Abgabe an Endverbraucher beschränkt ist, sondern stattdessen im Einzel- sowie Großhandel vermarktet wird, besteht die Gefahr der Ausbreitung von Zoonoseerregern. Laut der Studie von DÍAZ-SÁNCHEZ et al. (2013) eröffnet die Industrialisierung der Wildfleischherstellung den Weg für pathogene, bakterielle Mikroorganismen, die natürlich bei frei lebenden Wildtierpopulationen vorkommen, zu den Fleischkonsumenten. Dieser Prozess wurde bereits bei den Produkten von landwirtschaftlichen Nutztieren beschrieben (EFSA 2013). Nach COBURN et al. (2005) gibt es entlang der Wildfleischgewinnung verschiedene Stufen, auf denen das Risiko eine menschliche Exposition zu potentiellen Krankheitserregern besteht (Abb. 1).



**Abb. 1:** Expositionspfade für potentielle mikrobiologische Gefahren aus Wildtieren und ihren Produkten für den Menschen (COBURN et al. 2005)

Nach Angaben der europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA) und des europäischen Zentrums für die Prävention und die Kontrolle von Krankheiten (ECDC) zählen *Campylobacter* spp., Salmonellen, Listerien, verotoxinbildende *Escherichia coli* (VTEC) sowie Yersinien zu den wichtigsten Zoonoseerregern in Europa, die durch den Konsum von Lebensmitteln tierischen Ursprungs übertragen werden können und somit Krankheiten beim Verbraucher hervorrufen können (EFSA 2013).

### 2.3.2.1 *Escherichia coli*

*Escherichia coli* sind gramnegative, fakultativ anaerobe, sporenlose, stäbchenförmige Bakterien, die zur Familie der *Enterobacteriaceae* gehören. Abhängig von den klinischen und genetischen Eigenschaften werden *E. coli* als kommensale oder pathogene Erreger bezeichnet (NATARO u. KAPER 1998). Die Mehrheit der *E. coli*-Stämme kommen als Bestandteil der normalen Darmflora bei Tieren und Menschen vor. *E. coli* ist einer der ersten Besiedler des Darmes von Neugeborenen (KAPER et al. 2004). Im Darm erfüllen diese kommensalen *E. coli*-Stämme nicht nur physiologische Funktionen, sondern dienen auch als Schutz gegen enteropathogene Erreger (HUDAULT et al. 2001). Sie können jedoch bei immunsupprimierten Wirten eine Krankheit verursachen, oder wenn die natürlichen Magen-Darm-Barrieren beschädigt sind (NATARO u. KAPER 1998).

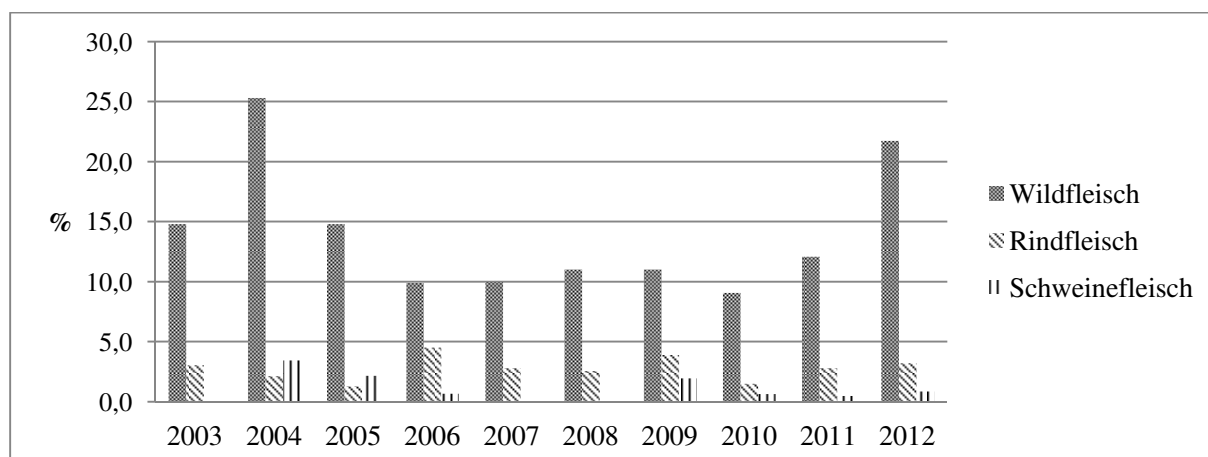
Die pathogenen *E. coli*-Stämme werden in darmpathogene und den extraintestinale Krankheitserreger unterteilt. In Bezug auf spezifische Virulenzeigenschaften werden die darmpathogenen Stämme nach NATARO u. KAPER (1998) in 6 Gruppen eingeteilt: Enterotoxische *E. coli* (ETEC), enteropathogene *E. coli* (EPEC), enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC) bzw. verotoxinbildende *E. coli* (VTEC), enteroaggregative *E. coli* (EAEC), enteroinvasive *E. coli* (EIEC) und diffus adhärente *E. coli* (DAEC). Mit Ausnahme der EHEC-Infektion, stehen bei allen anderen enteropathogenen *E. coli* symptomatisch Darmerkrankungen mit wässriger Diarrhö ohne Eiter oder Blut Beimengungen im Vordergrund (ROBINS-BROWNE u. HARTLAND 2002). Zusätzlich kann es zu Schleimbildung (EAEC), leichtem Fieber oder persistierenden Enteritiden kommen (EAEC und EPEC). Im Falle einer Infektion mit EIES oder ETEC geht mit einer schnellen Verbesserung der Symptomatik einher (NATARO u. KAPER 1998). Aufgrund der Produktion von zellzerstörenden Toxinen, so genannten Verotoxine oder Shiga-Like-Toxine, kann es nach Infektion mit EHEC zur Enteritis oder hämorrhagischen Kolitis kommen. Die Aktivität dieser Toxine kann in manchen Fällen zu generalisierten Erkrankungen, wie dem hämolytisch-urämischen Syndrom (HUS) oder der thrombotisch-thrombozytopenischen Purpura, führen (KARMALI 1989).

Im Gegensatz zu den darmpathogenen *E. coli*-Stämmen sind die extraintestinalen Krankheitserreger in der Mikroflora gesunder Wirte nachweisbar (RUSSO u. JOHNSON 2000). Trotz ihrer Virulenz können die sogenannten ExPEC (Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*) nur dann eine Krankheit hervorrufen, wenn sie das Lumen des Darmes verlassen und sterile Bereiche des Körpers erreichen (JOHNSON u. RUSSO 2002). Harnwegsinfektionen zählen zu den häufigeren Erkrankungen, die durch ExPEC-Stämme verursacht werden (RUSSO u. JOHNSON 2000).

Von der Gruppe der obligat pathogene *Escherichia coli*-Stämmen zählen **verotoxinbildende *E. coli*** (VTEC) zu den wichtigen Krankheitserregern weltweit (HUSSEIN 2007). Die Inzidenz von VTEC aus den Meldungen der europäischen Mitgliedstaaten betrug für 2011 1,9 Erkrankungen je 100000 Einwohner und eine Letalitätsszahl von 0,75% (EFSA 2013). Im Jahr 2011 erfolgte der Nachweis dieser Erreger mit einer Prävalenz von 1,4% zwar am häufigsten bei Rindfleisch, konnte aber in verschiedenen Lebensmitteln tierischen sowie pflanzlichen

Ursprungs isoliert werden (EFSA 2013). Aufgrund verschiedener Ausbrüche und sporadischer Meldungen bezüglich der Handhabung oder des Konsums von Wildfleischerzeugnissen wird dieses Lebensmittel als potentieller Übertragungsweg von VTEC-Stämmen betrachtet (KEENE et al. 1997; RABATSKY-EHR et al. 2002; ROUNDS et al. 2012). Die üblicherweise für den menschlichen Verzehr erlegten Schalenwildtierarten werden als Reservoir verschiedener VTEC-Serotypen bezeichnet, wobei die Nachweishäufigkeit zwischen den Tierarten variiert. Beispielsweise haben Untersuchungen an Kotproben gezeigt, dass VTEC-Stämme in Fäzes von Wildwiederkäuern mit Nachweisraten von bis zu 35% tendenziell häufiger Vorhanden sind als bei Wildschweinen (8,4%-9,2%) (SÁNCHEZ et al. 2009, 2010; BARDIAU et al. 2010; WACHEK 2010; MORA et al. 2012; OBWEGESER et al. 2012; DÍAZ-SÁNCHEZ et al. 2013). In Fleischproben von Wildtierkörpern wurden von DÍAZ-SÁNCHEZ et al. (2013) ähnliche Tendenzen ermittelt. Die letztgenannten Autoren konnten in 7% der Proben vom Rotwild VTEC-Stämme nachweisen, während 4% der Wildschweinkörper positiv auf diesen Erreger getestet wurden. In einer Studie wurden in 20% und 16% der Tupferproben aus Reh- bzw. Rotwildtierkörpern verschiedene VTEC-Stämme isoliert (PIÉRARD et al. 1997).

Gemäß den Angaben der Zoonosenerhebung des Bundesinstituts für Risikobewertung konnten in der letzten 10 Jahren VTEC-Stämme bei Wildfleischprodukten aus deutschen Handels- und Herstellerbetrieben deutlich häufiger nachgewiesen werden als bei Rind- und Schweinefleisch (Abb. 2). Während die Prävalenz von VTEC in Wildfleisch in dem ganzen Zeitraum zwischen 25,3% (2003) und 9,1% (2010) variierte, blieb die Nachweisrate bei Rind- und Schweinefleisch in der ganzen Periode unter 5% (Abb. 2).



**Abb. 2: Vorkommen von verotoxinbildenden *E. coli* in Rind-, Schweine- und Wildfleisch im Zeitraum 2003 bis 2012 nach den Angaben der Zoonosenerhebung bei Lebensmitteln in Deutschland (HARTUNG 2005, 2006 a, b, 2007, 2009 a, b; HARTUNG u. KÄSBOHRER 2010, 2011, 2012, 2013)**

### 2.3.2.2 *Campylobacter* spp.

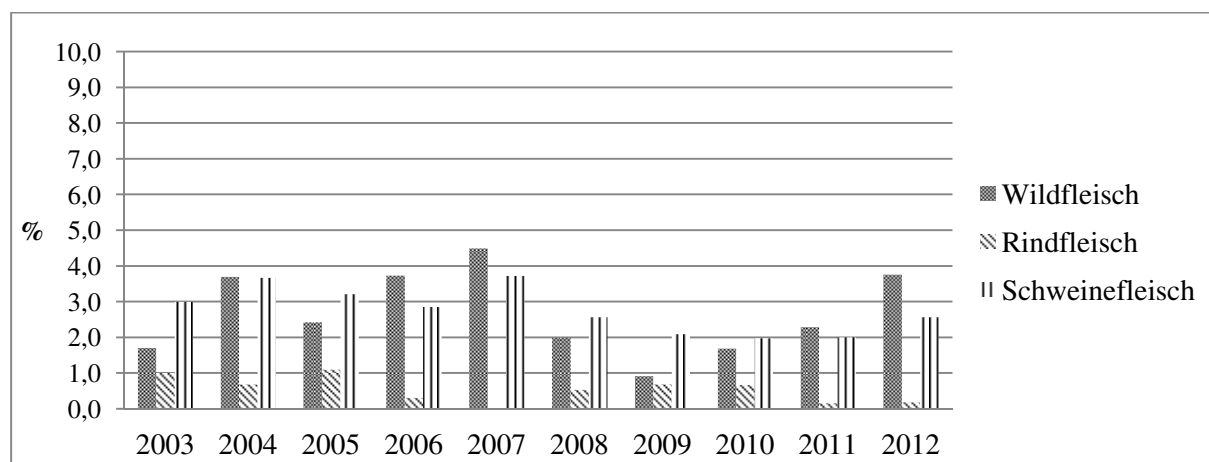
*Campylobacter* spp. werden als gramnegative, bewegliche Stäbchen bezeichnet, die charakteristisch gebogen oder spiralig gewunden sind (VANDAMME u. GOOSSENS 1992). Diese Keime zählen zur normalen Darmflora verschiedener warmblütiger Vögel und Säugetiere (HUMPHREY et al. 2007). Im Jahr 2011 wurden von den europäischen Mitgliedstaaten 220.209 Infektionen des Menschen mit *Campylobacter* spp. gemeldet. Mit dieser hohen Inzidenz an Krankheitsfällen ist dies die häufigste zoonotische Infektionsursache in Europa (EFSA 2013). Für das Jahr 2011 wurde *Campylobacter* spp., mit einer durchschnittlichen Nachweisrate in Europa von 31,3%, am häufigsten beim frischen Broilerfleisch isoliert. Trotz der hohen Prävalenz von Campylobacteriosen gingen die Infektionen in den meisten gemeldeten Fällen nicht mit dem Tod der infizierten Person einher (Letalitätszahl: 0,04%) (EFSA 2013). Über die Prävalenz von *Campylobacter* spp. im Fleisch von jagdbaren Schalenwildtieren gibt es verschiedene Angaben in der wissenschaftlichen Literatur. Einigen Autoren gelang der Nachweis von *Campylobacter* spp. nur in einem geringen Anteil der Tierkörper von Reh-, Rotwild und Wildschwein (1,9%-3,0%) (PAULSEN et al. 2003; ZIEGENFUSS 2003; ATANASSOVA et al. 2008). Hingegen, ermittelten DÍAZ-SANCHEZ et al. (2013) Prävalenzen zwischen 33% und 100% in erlegten Wildschweinen verschiedener Jagdreviere. Auf der Oberfläche der Eingeweide von Reh-, Rot- und Schwarzwildkörpern konnten KORONKIEWICZ et al. (2004) in 11,6% der Proben

*Campylobacter* spp. nachweisen. Verschiedene Studien zeigten in fäkalen Proben dieser Tierarten mit Nachweisraten von 0% bis 43,8% ähnliche Kontraste (KORONKIEWICZ et al. 2004; WAHLSTRÖM et al. 2003; LILLEHAUG et al. 2005; WACHECK et al. 2010; SASAKI et al. 2013; CARBONERO et al. 2014).

### 2.3.2.3 *Salmonella* spp.

Die Gattung *Salmonella* umfasst gramnegative, bewegliche, begeißelte Stäbchen. Taxonomisch gehören diese Bakterien zur Familie der *Enterobacteriaceae* (SU u. CHIU 2007). Die verschiedenen *Salmonella*-Arten kommen im Magendarm-Trakt einer Vielzahl von wechsel- und gleichwarmen Tiere vor, ohne zwangsläufige Auslösung von klinischen Symptomen (KINGSLEY u. BÄUMLER 2000). In Europa lagen menschliche Salmonelleninfektionen in 2011 bei 95.548 gemeldeten Krankheitsfällen (EFSA 2013). Nach Ergebnissen der europäischen Behörde starben im Jahr 2011 0,12% der an Salmonellose erkrankten Menschen als Folge der Infektion. In Europa wurde *Salmonella* spp. häufiger in frischem Broilerfleisch (5,9%) und in Schweinefleisch (0,7%) nachgewiesen (EFSA 2013). Auf Wildtierkörpern und Wildfleischprodukten ist das Vorkommen von Salmonellen mit Prävalenzen unter 2% niedrig, im Vergleich zu den europäischen Angaben für frisches Broilerfleisch (DEUTZ et al. 2000; PAULSEN et al. 2003; ATANASSOVA et al. 2008; EGLEZOS et al. 2008; PAULSEN et al. 2011; AVAGNINA et al. 2012; OBWEGESER et al. 2012; DIAZ SANCHEZ et al. 2013; VAN der WERME et al. 2013). Aus Untersuchungen von Kotproben dieser Tierarten werden Wildschweine häufiger als Träger von Salmonellen betrachtet, im Vergleich zu Wildwiederkäuern (WAHLSTRÖM et al. 2003; LILLEHAUG et al. 2005; KEMPER et al. 2006; RENTER et al. 2006; WACHECK et al. 2010; VIEIRA-PINTO et al. 2011; ZOTTOLA et al. 2012; SASAKI et al. 2013). Nach den Daten von HARTUNG (2005, 2006 a, b, 2007, 2009 a, b) und HARTUNG u. KÄSBOHRER (2010, 2011, 2012, 2013) aus dem jährlichen Bericht der Planprobenuntersuchung waren die Prävalenzen von Salmonellen in Schweinefleisch und Wildfleisch über die letzten 10 Jahre in Deutschland vergleichbar und lagen auf einem höheren Niveau als die entsprechenden Ergebnisse von Untersuchungen an Rindfleisch. Insgesamt betrachtet blieb die Nachweisrate für diese Produkte während der ganzen Periode unter 5% (Abb. 3).





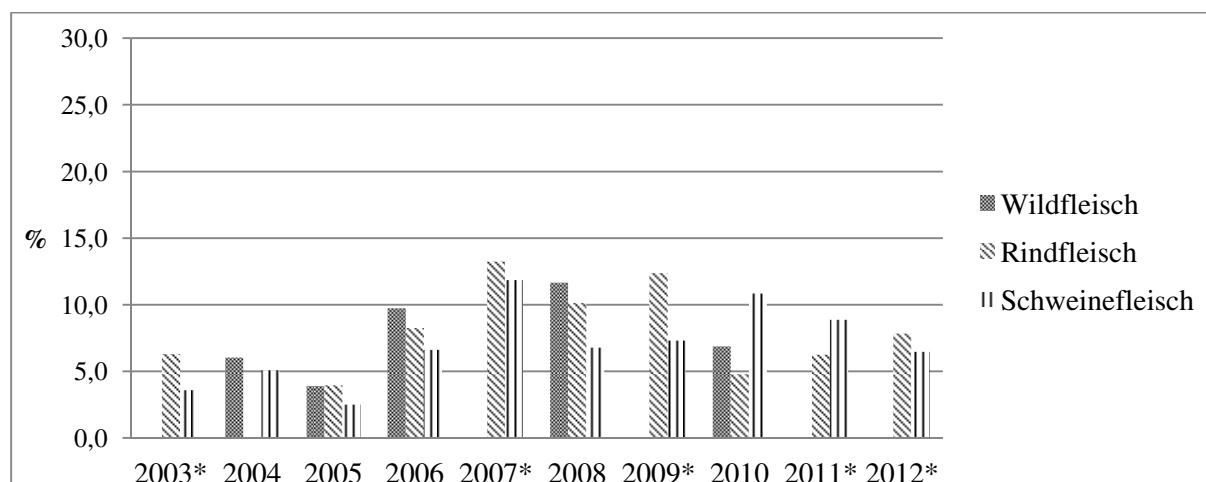
**Abb. 3: Vorkommen von Salmonellen in Rind-, Schweine- und Wildfleisch im Zeitraum 2003 bis 2012 nach den Angaben der Zoonosenerhebung bei Lebensmitteln in Deutschland (HARTUNG 2005, 2006 a, b, 2007, 2009 a, b; HARTUNG u. KÄSBOHRER 2010, 2011, 2012, 2013)**

#### 2.3.2.4 *Yersinia* spp.

Bakterien der Gattung *Yersinia* gehören zur Familie der *Enterobacteriaceae* und werden als gramnegative, fakultativ anaerobe, stäbchenförmige Keime beschrieben (STRALEY u. PERRY 1995). Von dieser Gattung können *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica* sowie *Y. pestis* Infektionskrankheiten beim Menschen auslösen. Während *Y. pestis* durch Flöhe übertragen wird und systemische Erkrankungen hervorruft, verursachen *Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica*, nach Aufnahme durch kontaminierte Lebensmittel, Magen-Darm-Infektionen (ALEKSIĆ u. BOCKEMÜHL 1990). In der Europäischen Union wurden im Jahr 2011 insgesamt 7017 Fälle von Infektionen mit *Yersinia* spp. gemeldet (EFSA 2013). In Lebensmitteln tierischen Ursprungs wurde *Y. enterocolitica* in Europa mit einer Prävalenz von 2,4% am häufigsten bei Schweinefleisch sowie Schweinefleischerzeugnissen nachgewiesen (EFSA 2013). Bezüglich des Vorkommens von Yersinien bei verschiedenen Wildtierarten, haben Studien gezeigt, dass potential pathogene Stämme im Darm von Schalenwildtieren isolierbar sind. Zwischen den Studien von KEMPER et al. (2006), ASCHFALK et al. (2008), FREDRIKSSON-AHOMAA et al. (2009), FRENCH et al. (2010), WACHEK et al. (2010) und SANNÖ et al. (2014) variierte die Prävalenz von Yersinien in Kotproben zwischen 0,6% und 30%. In Wildtierkörpern wiesen 15,4% der Fleischproben vom Schwarzwild und 7,1% der Proben von Rotwild *Yersinia* spp. auf (AVAGNINA et al. 2012).

### 2.3.2.5 *Listeria* spp.

Listerien sind grampositive, fakultativ anaerobe Stäbchen, die zur Gattung *Listeria* gehören. Diese Bakterien sind in einer Vielzahl unterschiedlicher ökologischer Lebensräume verbreitet und kommen aufgrund ihrer saprophytischen Lebensweise in pflanzlichem und in tierischem Material, sowie im Darmtrakt von Mensch und Tier, vor (FARBER u. PETERKIN 1991). Aufgrund der hohen Letalität in Europa (12,7% der Erkrankungsfälle) ist die Infektion des Menschen mit Listerien, besonders mit *Listeria monocytogenes*, von großer Bedeutung (EFSA 2013). Im Jahr 2011 wurden nach Ergebnissen von EFSA 1476 Krankheitsfälle in Europa bestätigt. Innerhalb der europäischen Union wurden Proben von Fischerzeugnissen und verschiedenen Käse- und Wurstsorten häufig mit Gehalten an Listerien (bis zu 6,7%) nachgewiesen, welche oberhalb der für verzehrfertige Produkte vorgegebenen Sicherheitsgrenzen lagen (EFSA 2013). Nach Angaben verschiedener Studien liegen die Prävalenzen von *L. monocytogenes* in Kotproben von Schalenwildtieren zwischen 0% und 6,1% (WACHECK et al. 2010; OBWEGESER et al. 2012; SASAKI et al. 2013). In Bezug auf das Vorkommen von *L. monocytogenes* in Wildfleisch wurden unterschiedliche Nachweisraten ermittelt. Dabei lag die Prävalenz bei bearbeiteten Wildfleischprodukten mit 12,5% - 20,6% höher, als bei Wildtierkörpern mit 0% - 7,0% (DEUTZ et al. 2000; JAKSIC et al. 2003; PAULSEN u. WINKELMAYER 2004; APELT 2007; TÜRCK 2008; AVAGNINA et al. 2012; OBWEGESER et al. 2012). Im Hinblick auf die Prävalenz von *L. monocytogenes* zeigten die Ergebnisse der Planprobenuntersuchung in Deutschland, dass die Nachweishäufigkeiten für Rind-, Schweine- und Wildfleisch aus den Handels- und Herstellerbetrieben von Jahr zu Jahr variierten (Abb. 4).



**Abb. 4: Vorkommen von *L. monocytogenes* in Rind-, Schweine- und Wildfleisch im Zeitraum 2003 bis 2012 nach den Angaben der Zoonosenerhebung bei Lebensmitteln in Deutschland (HARTUNG 2005, 2006 a, b, 2007, 2009 a, b; HARTUNG u. KÄSBOHRER 2010, 2011, 2012, 2013)**

\*In diesen Jahren fehlten Angaben für Wildfleisch

## 2.4. Resistenz gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen

### 2.4.1 Grundlage und Bedeutung der Entwicklung von Antibiotikaresistenzen bei Bakterien

Die zunehmende Reduzierung der therapeutischen Wirksamkeit verschiedener antimikrobieller Substanzen ist zur Zeit eines der wichtigsten Probleme der Volksgesundheit weltweit (WHO 2011). Angaben der Weltgesundheitsorganisation zufolge, sterben jährlich mehr als 25000 Menschen in Europa an den Folgen bakterieller Infektionen, die von resistenten Keimen hervorgerufen wurden (WHO 2011). Aufgrund der Ausbreitung von antimikrobiell resistenten Krankheitserregern in verschiedenen Bereichen der Human- und der Tiermedizin, sowie der ansteigenden Zahl antimikrobieller Wirkstoffe, gegen die sich die Mikroorganismen als unempfindlich erweisen, ist das Monitoring der Entwicklung und Verbreitung dieses Phänomens von Bedeutung (MOYAERT et al. 2014).

Die Antibiotikaunempfindlichkeit entsteht bei Mikroorganismen durch ihre Auseinandersetzung mit antimikrobiell wirksamen Substanzen (DAVIES 1994). In verschiedenen ökologischen Nischen entwickelten die Bakterien ursprünglich diese evolutive Anpassungsfähigkeit zur Vermeidung der antimikrobiellen Wirkung von Stoffen, die, aufgrund interspezifischer Konkurrenz, von anderen Mikroorganismen hergestellt und eingesetzt wurden (MARTINEZ 2009). Bei dem Begriff „Antibiotikaresistenz“ wird generell

zwischen einer intrinsischen und einer erworbenen Resistenz unterschieden. Die „intrinsische Resistenz“ bezeichnet natürliche art- oder gattungsspezifische Eigenschaften, die das Überleben in spezifischen antimikrobiellen Medien ermöglichen. Dies erfolgt aufgrund fehlender oder unzugänglicher Zielstrukturen in der Bakterienzelle, die bei dem Wirkungsmechanismus des Antibiotikums notwendig sind (SCHWARZ u. CHASLUS-DANCLA 2001). Natürlich resistente Mikroorganismen können dementsprechend unabhängig von der Konzentration des spezifischen Antibiotikums überleben (KRÜGER 2002). Die „erworbene Resistenz“ beruht hingegen auf der Fähigkeit eines Bakterienstamms, die tödliche bzw. wachstumshemmende Wirkung einer bestimmten Antibiotikakonzentration aufzuheben, bei welcher unter normalen Bedingungen eine erfolgreiche therapeutische Behandlung zu erwarten ist (SCHWARZ u. CHASLUS-DANCLA 2001). Die erworbene Resistenz entsteht bei dem entsprechenden Stamm entweder durch die Mutationen von bereits vorhandenen Genen (MARTINEZ u. BAQUERO 2000), oder durch die Aufnahme von mobilen Elementen (z.B. Plasmiden, Transposons, Integrons), die Resistenzgene enthalten (DAVIES 1994). Während die Übertragung intrinsischer Resistenzeigenschaften nur vertikal zu den Tochterzellen der nächsten Generation erfolgt, können die, auf mobilen Elementen gelagerten, Resistenzfaktoren sowohl vertikal als auch horizontal weitergegeben werden (ARBER 2000). Die horizontale Übertragung von Genen kann durch die Konjugation zweier Bakterienzellen, durch Aufnahme freier DNA (Transformation) oder über Bakteriophagen (Transduktion) erfolgen. Diese Übertragungsprozesse finden auch zwischen Mikroorganismen unterschiedlicher Art statt (DAVIES 1994). Die horizontale Übertragung von Resistenzgenen ermöglicht eine schnelle Ausbreitung erwerbbarer Antibiotikaresistenzigenschaften innerhalb einer Bakterienpopulation (ARBER 2000; CARATTOLI 2001). Da mobile Elemente mehrere Resistenzgene gleichzeitig transportieren können, wird die Entwicklung von multiresistenten Keimen durch die verschiedenen Übertragungsmechanismen begünstigt (O'BRIEN 2002). Zudem ist die Verbreitung von Gensequenzen, die Resistenzen gegenüber mehreren antimikrobiellen Wirkstoffen ermöglichen, für die öffentliche Gesundheit von besonderer Bedeutung (WHO 2011).

Seit der Entdeckung und Anwendung von Antibiotika durch die Menschen, sind die Mikroorganismen in verschiedenen mikrobiellen Umgebungen öfter unter selektivem Druck (SCHWARZ u. CHASLUS-DANCLA 2001). Durch die therapeutische bzw. vorbeugende

Verwendung von antimikrobiellen Substanzen, wurde die Selektion resistenter Bakterienpopulationen in den behandelten Tieren oder Menschen erzwungen (O'BRIEN 2002). In der Humanmedizin sowie in der Veterinärmedizin erregt es besondere Besorgnis, dass die unempfindlichen, pathogenen Keime von kommensalen Bakterienpopulationen des Darmes und der Haut durch Austausch beweglicher DNA-Segmente Resistenzgene erwerben können (WHO 2011). Die Darm- und Hautmikroflora tritt häufiger in Kontakt mit verschiedenen antibiotischen Wirkstoffen, als die pathogenen Keime und kann als potentielle Quelle genetischer Resistenzinformation für Krankheitserreger dienen (BLAKE et al. 2003). Zudem können erworbene Gene über mehrere Generationen im genetischen Material des Bakteriums auch ohne Kontakt mit dem entsprechenden Chemotherapeutikum, weitergegeben werden. Letzteres kann zu einer Beständigkeit von Resistenzen gegenüber Antibiotika führen, die selten oder nicht mehr angewendet werden (HARADA et al. 2006).

Die bakteriellen Resistenzmechanismen lassen sich in 3 Hauptkategorien einteilen: Enzymatische Inaktivierung des Wirkstoffes, Verminderung der intrazellulären Akkumulation von Antibiotika, dieses entweder durch die Verringerung der Aufnahme oder die Produktion energieabhängiger Ausschleusungsstrukturen, und Veränderung der zellulären Zielstrukturen (SCHWARZ u. CHASLUS-DANCLA 2001; VAN HOEK et al. 2011). In Tabelle 1 werden erwerbbar Resistenzenmechanismen gegen verschiedene Antibiotikasubstanzen zusammengefasst.

**Tab. 1: Resistenzmechanismen, die von erwerbbar Resistenzen genen kodiert werden (modifiziert nach SCHWARZ u. CHASLUS-DANCLA 2001 und VAN HOEK et al. 2011).**

Wirkstoffklasse	Resistenzmechanismen		
	EI	VA	VZ
Aminoglycoside	X	X	X
β-Laktame	X		X
Chloramphenicol	X	X	X
Glycopeptide			X
Makrolide-Lincosamide-Streptogramine	X	X	X
Chinolone	X	X	X
Streptothricin	X		
Sulfonamide		X	
Tetracycline	X	X	X
Trimethoprim		X	

EI: Enzymatische Inaktivierung, VA: Verminderung der Akkumulation, VZ: Veränderung der Zielstruktur

Die Problematik der Ausbreitung von unempfindlichen Mikroorganismen ist multifaktoriell und in ständiger Bewegung (MARTINEZ 2009). Die Kontrolle der Verbreitung mikrobieller Resistenzen ist von hoher Komplexität (WHO 2011), unter anderem weil sich das Maß der Anwendung von Antibiotika in einem Bereich (z.B. geographisch, fachlich) auswirkt, die folgende Entwicklung von Resistenzen sich aber auch in anderen Bereichen abspielt (O'BRIEN 2002).

#### ***2.4.2 Resistente Bakterien als Zoonoseerreger***

Die Anwendung von antimikrobiellen Chemotherapeutika in der landwirtschaftlichen Produktion spielt in der Epidemiologie der Antibiotikaresistenz eine besondere Rolle (WHO 2011). Die Mengen an verschiedenen antimikrobiellen Wirkstoffen, die zur Behandlung sowie Vorbeugung von Krankheiten eingesetzt wurden, haben im Laufe der Zeit den Selektionsdruck auf die mikrobiologischen Populationen der Nutztiere erhöht. Dieses hat die Entwicklung und Verbreitung von resistenten Stämmen bzw. Resistenzeigenschaften in der landwirtschaftlichen Produktion begünstigt (AARESTRUP u. WEGENER 1999; ANGULO et al. 2004). Das Risiko einer Übertragung resistenter Erreger von Tieren auf den Menschen, entweder durch direkten Kontakt mit den Tieren oder durch Verzehr des von ihnen stammenden Lebensmittelprodukts, ist erheblich (VAN den BOGAARD u. STOBBERINGH 2000; BYWATER et al. 2004). Während die Infektion mit resistenten Krankheitserregern einen direkten Einfluss auf die Effektivität der antibiotischen Therapie hat, wird die orale Aufnahme von resistenten, nicht-pathogenen Keimen, als potentielle Quelle verschiedener Resistenzeigenschaften für die humane Darmflora betrachtet (VAN den BOGAARD u. STOBBERINGH 2000; WANG et al. 2006). Laut HANNAH et al. (2009), VIEIRA et al. (2011) und CICCIOZZI et al. (2013) besteht ein epidemiologischer Zusammenhang zwischen dem Vorkommen bestimmter Resistenzeigenschaften in Bakterienstämmen, die aus Handelsfleisch isoliert wurden, und dem Vorkommen ähnlicher genetischer Sequenzen in der kommensalen Mikroflora der Fleischkonsumenten. Da eine horizontale Übertragung verschiedener Resistenzgene von kommensalen Darmkeimen auf pathogene Mikroorganismen möglich ist (BLAKE et al. 2003), hat die Vermeidung der Kontamination des Fleisches, auch mit nicht-pathogenen Mikroorganismen, einen hohen Stellenwert (WHO 2011).

Untersuchungen an Fleischprodukten von Nutztieren haben gezeigt, dass die, auf unterschiedlichen Ebenen der Herstellung entstandene, Fleischmikroflora auch aus resistenten Keimen zusammengesetzt ist (MAYRHOFER et al. 2006; ASLAM et al. 2009; SCHWAIGER et al. 2012; ZHAO et al. 2012). Hierbei gilt die bakterielle Darm- und Hautflora der geschlachteten Nutztiere als eine der wichtigsten Quellen resistenter Erreger für Fleischerzeugnisse. Es kann ein Zusammenhang bestehen zwischen den antibiotischen Therapieregimen, die bei den lebenden Tieren eingesetzt wurden, und dem Vorkommen resistenter Mikroorganismen auf eben diesen vermarkteten Fleischprodukten (MIRANDA et al. 2008; KOLA et al. 2012). Nach Angaben von ASLAM et al. (2004) und SCHWAIGER et al. (2012) ist zudem die Gefahr einer Kontamination des Fleisches mit Antibiotika-resistenten Keimen, die entweder von der Umgebung des Herstellungs- bzw. Vermarktungsbetriebs oder den Menschen (z.B. Betriebsmitarbeiter, Fleischhändler) herrühren, nicht auszuschließen.

#### ***2.4.3 Vorkommen resistenter Bakterien bei frei lebenden Wildtieren***

Die Entwicklung und Ausbreitung von resistenten Keimen beschränkt sich nicht auf die landwirtschaftliche Produktion oder die Humanmedizin, sondern hat sich auch in Ökosystemen außerhalb des von Menschen und Nutztieren bewohnten Gebiets ausgewirkt (GUENTHER et al. 2011). Besonders der anthropogene Einfluss auf die natürliche Umwelt wird als Grund für dieses Phänomen bezeichnet (RWEGO et al. 2008; SJÖLUND et al. 2008; WHEELER et al. 2012).

Verschiedene Arbeiten haben die Rolle der menschlichen Aktivität in Bezug auf die Prävalenz resistenter Keime bei verschiedenen Wildtieren analysiert. Durch die Untersuchung an Kotproben wilder Nagetiere konnten KOZAK et al. (2009), GUENTHER et al. (2010 a, b) und ALLEN et al. (2011) unterschiedliche Resistenzgrade bei Darmkeimen feststellen. Die Ergebnisse dieser Studien zeigten zudem, dass resistente Mikroorganismen häufiger bei Proben aus Tieren nachgewiesen wurden, die in unmittelbarer Nähe zu Siedlungen oder landwirtschaftlichen Betrieben gesammelt wurden, als bei Tierproben aus ländlichen Gebieten.

Bei europäischem Reh-, Rot- und Schwarzwild wurden ebenfalls Antibiotikaresistenzen verschiedener Art nachgewiesen. Durch die Antibiotikaempfindlichkeitstestung an

*Escherichia coli* konnten BRYAN et al. (2004), LILLEHAUG et al. (2005), COSTA et al. (2008), POETA et al. (2009) und LITERAK et al. (2010) unter anderem Resistenzen gegenüber Tetracyclinen, Sulfamethoxazol und  $\beta$ -Laktamen nachweisen. Des Weiteren konnten diese Autoren, mittels molekularbiologischer Untersuchungen der resistenten Stämme, das Vorhandensein von übertragbaren Resistenzfaktoren bestätigen. Salmonella-Stämme, isoliert aus Kotproben von erlegten Wildschweinen, wiesen auch verschiedene Resistenzphänotypen auf (NAVARRO-GONZALEZ et al. 2012). Ähnlich wie bei Nagetieren, nahmen die Autoren eine horizontale Übertragung genetischer Resistenzeigenschaften bzw. resistenter Erreger von Menschen oder Nutztieren auf verschiedene Wildtierpopulationen an. Hierbei ist der Kontakt der Wildtiere mit, durch Antibiotika oder resistente Mikroorganismen kontaminierten Abwässern oder Gülle von Bedeutung (LITERAK et al. 2010). Nach LITERAK et al. (2010) können Wildtiere, insbesondere Wildschweine, als potentielles Reservoir verschiedener Resistenzeigenschaften betrachtet werden. Nichtsdestotrotz ist die Prävalenz multiresistenter Keime bei Wildtieren niedriger, als bei Nutztieren (BRYAN et al. 2004).



### 3. MATERIAL UND METHODEN

Zur Bestimmung des Hygienestatus wurden insgesamt 188 Fleischproben verschiedener Wildtierarten mikrobiologisch untersucht. Hierbei stammten 68 Proben vom Reh- (*Capreolus capreolus*), 51 vom Rotwild (*Cervus elaphus*) und 69 vom Wildschwein (*Sus scrofa*). Die Wildfleischproben waren sowohl deutscher als auch internationaler Herkunft. Die Teilstücke wurden im Herstellungsbetrieb vakuumverpackt und tiefgekühlt gelagert (-18°C). Innerhalb der folgenden 3 bis 5 Tagen nach dem Verpacken wurden sie für die Durchführung der mikrobiologischen Analyse in das Labor transportiert. Im Labor wurden die Proben nach Erhalt bis 24 h vor Untersuchungsbeginn bei -18°C gelagert.

Die mikrobiologische Untersuchung erfolgte in Anlehnung an die amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 des Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuches (LFGB).

#### 3.1. Mikrobiologische Untersuchung

##### 3.1.1 Quantitative Untersuchung auf Hygieneparameter

Am Untersuchungstag wurden die Fleischstücke nach dem Auftauen (für 12 bis 18 h bei 4 °C ± 0.5 °C) aseptisch aus der Verpackung entnommen und auf einen sterilen Teller gelegt. Nachfolgend wurden von der Oberfläche jeder Fleischprobe jeweils 4 Gewebestanzungen (1-2 mm dick) entnommen. Insgesamt entsprachen die Stanzproben einer Fläche von 20 cm<sup>2</sup> und einem Gewicht von etwa 10 g. Zur Aufarbeitung wurde das Probematerial in einen sterilen Stomacherbeutel eingewogen, mit 90 ml NaCl-Peptonwasser (0,85% NaCl + 0.1% Pepton) als Verdünnungsflüssigkeit aufgefüllt, für 120 s in einem Stomacher (Seward, London, England) homogenisiert. Weitere Verdünnungsreihen wurden nachfolgend hergestellt.

Neben der quantitativen Untersuchung auf *E. coli* (§ 64 LFGB 00.00–132/2), wurde die Bestimmung der aeroben Gesamtkeimzahl (§ 64 LFGB L06.00-18), sowie die Quantifizierung von *Enterobacteriaceae* (§ 64 LFGB L06.00-24) durchgeführt.

Für die Untersuchung auf *E. coli* und die aerobe Gesamtkeimzahl wurden im Doppelansatz Aliquote von 1 ml des Homogenisats und jeder hergestellten Verdünnungsstufe mittels Plattengussverfahren mit dem Trypton-Galle-Glucuronoid-Medium (TBX-Agar, Oxoid LTD.,

Hampshire, England), und dem nicht selektiven Standard-I-Agar (St-I-Agar, Merck, KGaA, Darmstadt, Germany), vermischt. Nachfolgend wurden die Platten für 18-24 h bei  $44\text{ °C} \pm 0.5\text{ °C}$  bzw. für  $72 \pm 2\text{ h}$  bei  $30\text{ °C} \pm 0.5\text{ °C}$  aerob bebrütet.

Für die Untersuchung auf *Enterobacteriaceae* wurden im Doppelansatz Teilmengen von 0,1 ml der homogenisierten Proben sowie der hergestellten Verdünnungsreihe, mittels Oberflächenspatelverfahren auf Kristallviolett-Neutralrot-Galle-Glucose-Agar (VRBD-Agar, Merck, KGaA, Darmstadt, Germany) gegeben. Anschließend, wurden die VRBD-Agar-Platten im anaeroben Milieu für 48 h bei  $30\text{ °C} \pm 0.5\text{ °C}$  bebrütet.

Die Anzahl der Koloniebildenden Einheiten pro  $\text{cm}^2$  (KbE/ $\text{cm}^2$ ) für jeden Parameter wurde anhand der gezählten Kolonien berechnet. Dafür wurden die Petrischalen aus den Verdünnungsstufen, auf denen 1 und 300 bzw. 150 Kolonien gewachsen waren, nach Ablauf der Bebrütungszeit ausgewählt. Für die Berechnung der aeroben Gesamtkeimzahl wurden alle gewachsenen Kolonien gezählt, während nur die Kolonien, die typische Morphologie auf den entsprechenden Agar-medien aufwiesen (*Enterobacteriaceae*: Kolonien mit rosa bis rotem Präzipitationshof auf VRBD-Agar; *E. coli*: Kolonien mit blauer Präzipitat auf TBX-Agar), für die Berechnung der Zahl der *Enterobacteriaceae* und *E. coli* berücksichtigt wurden.

Die von der VO (EG) 2073/2005 über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel vorgegebenen Richt- und Grenzwerte wurden als Maßstäbe angewandt, um den hygienischen Status der untersuchten Proben zu beurteilen. Während die Bewertung der quantitativen Ergebnisse anhand der aeroben Gesamtkeimzahl einen allgemeinen Eindruck über die Hygienehandhabung der Fleischware erlaubt, weist der Gehalt an *E. coli* auf fäkale Kontamination während des gesamten Herstellungsprozesses hin. Die in dieser Verordnung empfohlener Kriterien gelten ausdrücklich für Hackfleisch und Faschiertes, wurden aber aufgrund der gemeinsamen technologischen Bearbeitungsprozessen, die für die industrielle Herstellung von Frischfleischprodukten [unter dem Begriff „unverarbeitete Erzeugnisse“ im Sinne der VO (EG) 852/2004] durchgeführt werden, hier zur Orientierung herangezogen. Die in der vorliegenden Arbeit zugrunde gelegten Richt- und Grenzwerte für die Bewertung von durch destruktives Verfahren entnommenen Fleischproben werden in Tabelle 2 dargestellt.

**Tab. 2: Prozesshygienekriterien für Hackfleisch und Faschiertes gemäß Verordnung (EG) 2073/2005 (Anh. I, Kap. 2) in Log<sub>10</sub>-Wert**

Parameter	befriedigend	akzeptabel	unbefriedigend
Gesamtkeimzahl	≤ 5,70	5,70 - 6,70	> 6,70
<i>E. coli</i>	≤ 1,70	1,70 - 2,70	> 2,70

### 3.1.2 Untersuchung auf Zoonoseerreger

Zur Bestimmung der mikrobiologischen Sicherheit der verpackten Wildfleischstücke wurden die Proben quantitativ auf Koagulase-positiven Staphylokokken (§ 64 LFGB L00.00-55) sowie qualitativ auf *Salmonella* spp. (§ 64 LFGB L00.00-20) und *L. monocytogenes* (§ 64 LFGB L00.00-32) untersucht.

Zum quantitativen Nachweis von Koagulase-positiven Staphylokokken wurden im Doppelansatz Teilmengen von 0,1 ml der o.g. 1:10 homogenisierten Proben sowie der hergestellten Verdünnungsreihe, mittels Oberflächenspatelverfahren auf Baird Parker Agar (BP-Agar, Merck, KGaA, Darmstadt, Germany) überführt und für 48 h bei 37 °C ± 0,5 °C unter aeroben Bedingungen bebrütet. Nach Ablauf der Bebrütungszeit wurden die schwarze Kolonien mit oder ohne umgebendem klaren Hof erst separat gezählt, einzeln isoliert und auf St-I-Agar subkultiviert. Die auf St-I gewachsenen Isolate wurden mittels Gramfärbung, Oxidase- und Katalase-Reaktion biochemisch überprüft. Zur weiteren Identifizierung wurden ausgewählte Kolonien auf DNase-Agar (Oxoid LTD., Hampshire, England) ausgestrichen und eine Impfkultur zur 24-stündigen Anreicherung in Hirn-Herz-Nährbouillon (Brain-Heart-Infusion, Merck, KGaA, Darmstadt, Germany) übertragen, um die Aktion des mikrobiellen Enzyms DNase bzw. Koagulase zu überprüfen. Anhand der Anzahl der Kolonien auf dem selektiven BP-Agar, die eine positive Koagulase-Reaktion aufwiesen, wurde der Gehalt an Koagulase-positive Staphylokokken, wie für die Hygieneparameter beschrieben, berechnet.

Zur qualitativen Untersuchung von *L. monocytogenes* wurden zunächst jedem Fleischstück 10 g entnommen, diese mit 90 ml Halb-Fraser-Bouillon (FRASER-Listeria-Selektiv-Anreicherungsbouillon, Merck, KGaA, Darmstadt, Germany) für 120 s homogenisiert und für 24 ± 2 h bei 30 °C ± 0,5 °C aerob bebrütet. Nach Ablauf der Bebrütungszeit wurden 0,1 ml der Anreicherungsflüssigkeit in 10 ml Voll-Fraser-Medium (FRASER-Listeria-Selektiv-

Anreicherungsbouillon, Merck, KGaA, Darmstadt, Germany) überimpft und für 48 h bei 37 °C ± 0.5 °C unter aeroben Bedingungen inkubiert. Nachfolgend wurde 10 µl des Homogenisats mittels Öse auf dem Selektivnährboden, Oxoid-Chromogen-*Listeria*-Agar (OCLA-Agar, Oxoid LTD., Hampshire, England) ausgestrichen und für 48 h bei 37 °C ± 0.5 °C bebrütet. Verdächtige Kolonien (Blaugefärbte Kolonien mit umgebendem trüben Präzipitationshof) wurden von den Platten isoliert und auf StI-Agar subkultiviert. Die Identifizierung von *L. monocytogenes* erfolgte durch Überprüfung der Oxidase- und Katalase-Reaktion sowie Gramfärbung, Beweglichkeit und API LISTERIA (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France).

Zum qualitativen Nachweis auf *Salmonella* spp. wurden 25 g Probenmaterial mit 225 ml gepuffertem Peptonwasser in einem Stomacherbeutel für 120 s homogenisiert. Nach aerober Bebrütung (18 bis 24 h bei 37 °C ± 0.5 °C) wurden 0,1 ml und 1 ml des Homogenisats in Magnesiumchlorid-Malachitgrün-Bouillon nach RAPAPPORT-VASSILIADIS (RVS Broth, Merck, KGaA, Darmstadt, Germany) bzw. Tetrathionat-Brilliantgrün-Galle-Bouillon (Oxoid LTD., Hampshire, England) transferiert und für 24 ± 2 h bei 42 °C ± 0.5 °C bzw. für 24 ± 2 h bei 37 °C ± 0.5 °C aerob bebrütet. Nachfolgend wurden 10 µl des jeweiligen Homogenisats mit Hilfe einer Öse auf dem Salmonella-selektiven Xylose-Lysin-Desoxycholat-Agar (XLD, Merck, KGaA, Darmstadt, Germany) sowie dem RAMBACH®-Agar (Merck, KGaA, Darmstadt, Germany) überführt und für 24 h bei 37 °C ± 0.5 °C inkubiert. Nach Isolierung von Kolonien typischer Morphologie (auf XLD: durchsichtbare bzw. blassrosa gefärbte Kolonien mit schwarzen Zentrum; auf RAMBACH®-Agar: Kolonien mit kirschrote Färbung) wurde das Vorhandensein von *Salmonella* spp. durch serologische Agglutinationstest mit polyvalentem Serum (SIFIN) und anschließende biochemische Überprüfung mittels API 20E (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) bestätigt.

### **3.2. Untersuchung der Antibiotikaempfindlichkeit**

Nach der Quantifizierung von *E. coli* wurden mehrere verdächtige Kolonien von den TBX-Platten entnommen und auf Standard-I-Agar subkultiviert. Nach 24-stündiger Bebrütungszeit wurden die Isolate aus den Kulturen, die eine homogene Koloniemorphologie auf St-I-Agar aufwiesen, ausgewählt und durch Oxidase-Reaktion und Gramfärbung vorläufig überprüft. *E.*

*coli*-Isolate wurden anschließend mittels API 20E (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) bestätigt.

Zur Empfindlichkeitsbestimmung gegenüber verschiedenen Antibiotika wurden je positiv getestete Probe willkürlich bis zu zwei *E. coli*-Isolate mit unterschiedlichem, biochemischem API 20E-Profil einbezogen. In Anlehnung an die CLSI-Methode (CLSI 2009) wurde die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentrationen (MHK) gegen 27 verschiedene antibiotische Substanzen im Mikrodilutionsverfahren nach Anweisung des Herstellers durchgeführt (MHK-Gramneg, Bio-Rad Medical Diagnostics Ltd., München, Germany). Nach erfolgter Bebrütung (18 bis 24 h bei  $35\text{ °C} \pm 0.5\text{ °C}$ ) wurden die Platten visuell ausgewertet. Die MHK bezeichnet die Konzentration eines Antibiotikums, die das bakterielle Wachstum komplett unterdrückt. Die Bewertung der MHK-Werte erfolgte beziehungsweise auf die klinischen Breakpoints und epidemiologischen Cut-off-Werte (ECOFF) für *Enterobacteriaceae*, die vom European Committee on Antimicrobial Susceptibility (EUCAST) festgelegt wurden (EUCAST, 2012). Die Isolate mit MHK-Werten über den klinischen Grenzwerten wurden als „resistent“ eingestuft. Waren klinische Breakpoints für ein Antibiotikum nicht verfügbar, wurde die Antibiotikaempfindlichkeit des zu testenden Isolats anhand der ECOFF-Werten beurteilt. Die ECOFF-Werte dienen dazu, eine sensible Wildtyp-Population von einer möglich veränderten Population mit entstehenden Resistenzen abzugrenzen (KAHLMETER et al. 2003). Aufgrund nicht vorhandener klinischer oder epidemiologischer Bewertungslinien für die antimikrobiellen Wirkstoffe Azlocillin, Mezlocillin, Cefazolin und Cefotiam wurden die Stämme, die MHK-Werte über die höchste geprüfte Konzentration dieser Antibiotika aufwiesen, als „resistent“ bezeichnet (Tab. 3).

Die MHK-Werte für 50% (MHK<sub>50</sub>) und 90% (MHK<sub>90</sub>) der getesteten Bakterienstämme wurde angewendet, um die Verteilung der MHK-Werte innerhalb der Bakterienpopulationen gegenüberzustellen. Der Referenzstamm *E. coli* DSM 1103 (ATCC 25922) wurde zur Qualitätssicherung bei der Durchführung des Mikrodilutionsverfahrens angewendet. Die überprüften antimikrobiellen Wirkstoffe, die getesteten Konzentrationen sowie die verwendeten Grenzwerte werden in Tabelle 3 dargestellt.

**Tab. 3: Eingesetzte Antibiotika, Konzentrationen und Grenzwerte für *Enterobacteriaceae* gemäß EUCAST (2013)**

Wirkstoffklasse	Wirkstoff	Konzentration (µg/ml)	MHK-Grenzwerte (µg/ml)	Bezug
β-Laktame	Ampicillin	2 – 8	>8	KB <sup>a</sup>
	Ampicilin/Sulbactam	2 – 8	>8	KB
	Azlocilin	8 – 64	>64	-
	Mezlocillin	4 – 16	>16	-
	Piperacillin	4 – 32	>16	KB
	Piperacilin/Tazobactam	4 – 32	>16	KB
	Ticarcillin	8 – 32	>16	KB
	Cefaclor	1 – 4	≤4	ECOFF <sup>b</sup>
	Cefixim	1 – 2	>1	KB
	Cefuroxim <sup>c</sup>	1 – 4	>8	KB
	Cefazolin	4 – 8	>8	-
	Cefotaxim	2 – 8	>2	KB
	Cefoxitin	4 – 8	≤8	ECOFF
	Cefoperazone	4 – 16	≤1	ECOFF
	Cefotiam	4 – 8	>8	-
	Ceftazidim	4 – 16	>4	KB
	Cefepim	4 – 8	>4	KB
	Monobactame	Aztreonam	2 – 16	>4
Aminoglycoside	Gentamicin	1 – 4	>4	KB
	Amikacin	4 – 16	>16	KB
	Tobramycin	1 – 4	>4	KB
Tetracycline	Doxycyclin	1 – 4	≤4	ECOFF
Phenicole	Chloramphenicol	8	>8	KB
Fluorchinolone	Ofloxacin	1 – 2	>1	KB
	Ciprofloxacin	1	>1	KB
Nitrofuran-Derivate	Nitrofurantoin	64 – 256	>64	KB

<sup>a</sup> Klinischer Breakpoint<sup>b</sup> Epidemiologischer Cut-Off Wert<sup>c</sup> Klassifizierung als resistent erfolgte nicht. Klinischer Breakpoint auf System nicht ablesbar

### 3.3. Charakterisierung von *E. coli*

#### 3.3.1 Zuordnung der *E. coli*-Isolate anhand der API 20E-Profile

Die biochemische Charakterisierung aller für Antibiotikaempfindlichkeitstestung einbezogenen *E. coli*-Isolate erfolgte anhand des numerischen API 20E-Profiles. Nach der Durchführung des API 20E wurden die Ergebnisse der Stoffwechselreaktionen, entsprechend den Vorgaben des Herstellers, visuell abgelesen. Die Ergebnisse einzelner Reaktionen wurden

mit positiv oder negativ beurteilt. Nach der Beurteilung wurde das Isolat anhand der numerischen Kennzahl mit Hilfe der APIWeb-Software ausgewertet und als *E. coli* bestätigt. Bei der Auswertung beurteilt die Software zudem die Identifikationsgüte. Wurden die Ergebnisse von der Software als „zweifelhaft“ oder „unakzeptabel“ bewertet, wurde die Reinheit der Kultur sowie die  $\beta$ -D-Glucuronidase-Reaktion des Isolats auf TBX-Agar erneut überprüft. Nachfolgend wurde die Untersuchung mittels des API 20E-Systems bei den reinen Isolaten durchgeführt. Wiederholte sich das Profil, wurde das Isolat, trotz der Ergebnisbeurteilung von API-Software, als *E. coli* bezeichnet. Eine positive Reaktion auf  $\beta$ -D-Glucuronidase ermöglicht eine zuverlässige Unterscheidung zwischen *E. coli*-Stämmen und anderen Enterobakterien (HANSEN u. YOURASSOWSKY 1984).

### **3.3.2 Molekularbiologische Charakterisierung unempfindlicher *E. coli*-Stämme**

Alle resistenten *E. coli*-Isolate und die, die eine verringerte Empfindlichkeit zeigten, wurden mittels des von HIGGINS et al. (2007) veröffentlichten PCR-Verfahrens weiter charakterisiert. Diese Untersuchung ermöglicht die Identifizierung der phylogenetischen Hauptgruppen (ECOR) A, B1, B2 und D. Die Zuordnung erfolgt anhand des Nachweises spezifischen genetischen Materials, nämlich der Gene *chuA*, *yjaA* und des DNA-Fragments TspE4.C2. Isolate, bei denen das alleinige Vorhandensein des Amplikons *yjaA*, *chuA*, oder TspE4.C2 nachgewiesen wird, werden den phylogenetischen Hauptgruppen A, D bzw. B1 zugeordnet. Wies das untersuchte Isolat die Kombination der 3 Amplikons, oder die Kombination *chuA* und *yjaA* auf, gehörte dieses der Phylogruppe B2 an. Werden keine von den Amplikons erhalten, wird das Isolat der phylogenetischen Gruppe A zugeordnet (CLERMONT et al. 2000).

Die Herstellung des DNA-Templates erfolgte durch Kochverfahren. Drei bis fünf Kolonien einer frischen Bakterienkultur (auf Standard I-Agar, 18 bis 24 h bei  $37\text{ °C} \pm 0.5\text{ °C}$ ) wurden in 300  $\mu\text{l}$  steriles, destilliertes Wasser suspendiert. Die Suspension wurde nachfolgend 10 min bei  $95\text{ °C}$  im Thermo-Shaker inkubiert (TS-100, Biosan SIA, Riga, Latvia). Nach erfolgter Zentrifugation für 2 min bei 10000 rpm, wurde 2  $\mu\text{l}$  reiner Überstand abgenommen und im PCR-Ansatz eingesetzt. Nach initialer Denaturierung (3 min bei  $94\text{ °C}$ ) folgten 35 Zyklen bei  $94\text{ °C}$  für 15 s,  $60\text{ °C}$  für 30 s und bei  $72\text{ °C}$  für 45 s, um die Amplifikation der Zielgene (*chuA* und *yjaA*) und des DNA-Fragments TspE4.C2 zu erzielen (HIGGINS et al. 2007). Die

Qualitätskontrolle des Extraktions- sowie Genotypisierungsverfahrens der untersuchten Isolate wurde mit dem Referenzstamm *E. coli* DSM 1103 (ATCC 25922) durchgeführt.

### 3.4. Statistische Auswertung

Die Ergebnisdaten der Oberflächenkeimzahl für alle quantitativen Merkmale wurden zur Basis Zehn logarithmiert ( $\text{Log}_{10} \text{KbE}/\text{cm}^2$ ) und auf zwei Dezimalstellen hinter dem Komma gerundet, um die statistische Analyse durchzuführen. Des Weiteren wurde der Box-and-Whisker-Plot zur graphischen Darstellung der Verteilung der quantitativen Daten verwendet. In der Graphik werden der Medianwert mit dem unteren ( $x_{0,25}$ ) und dem oberen ( $x_{0,75}$ ) Quartil sowie der Minimal- ( $x_{\text{Min}}$ ) und Maximalwert ( $x_{\text{Max}}$ ) der erhobenen Keimzahlen erfasst (Abb. 5).

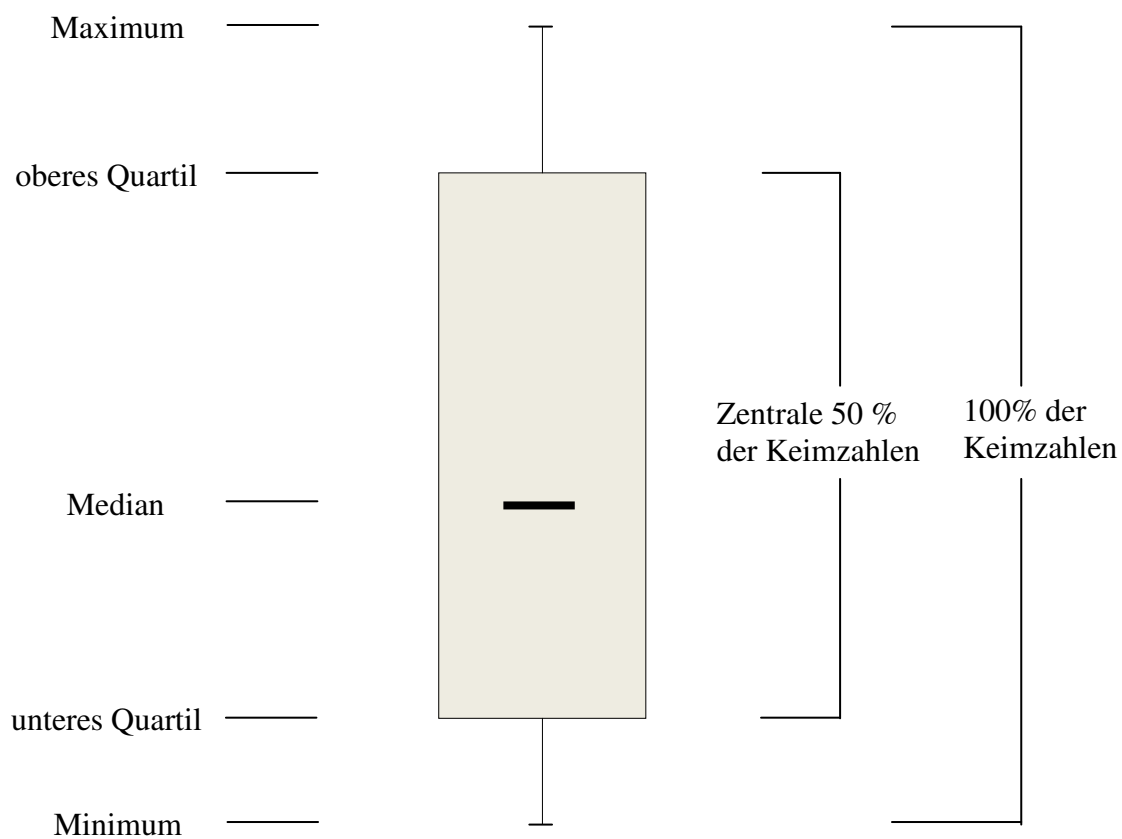


Abb. 5: Box- and Whisker-Plot-Darstellung



Der Einfluss der Herkunftstierart auf die bestimmten Keimgehalte wurde für die normalverteilten sowie für die nicht normalverteilten Ergebnisse mittels Varianzanalysen und t-Test bzw. Wilcoxon-Test bewertet.

Das Vorkommen der qualitativ erfassten Merkmale sowie der quantitativ analysierten Parameter für die einzelnen Tierarten wurden mit Hilfe des  $\chi^2$  –Homogenitäts-Testes statistisch gegenübergestellt.

Die Ergebnisse aller statistischen Auswertungen, bei denen eine Irrtumswahrscheinlichkeit von maximal 5% festzustellen war ( $p < 0,05$ ), wurden als statistisch signifikant bezeichnet.

Die o.g. statistischen Berechnungen erfolgten mit dem Statistikprogramm SAS Version 9,3 für Windows (SAS Institute Inc.). Die graphischen Abbildungen sowie die Tabellen wurden mit dem Programm Microsoft<sup>®</sup> EXCEL des Programmpakets Office 2010 erstellt.

## 4. ERGEBNISSE

### 4.1. Mikrobiologische Untersuchungen

Die Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen zum Hygienestatus der 188 Wildfleischproben werden in Tabelle 4 dargestellt. Von den untersuchten Proben wiesen 98,4% aerob wachsende Keime, 92,4% Enterobakterien und 68,1% *Escherichia coli* auf.

**Tab. 4: Prävalenzen von Indikatorkeimen bei verpacktem Wildfleisch**

Tierart	Anzahl Proben	Nachweisrate in %		
		Gesamtkeimzahl	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Escherichia coli</i>
Rehwild	68	100,0	95,6	72,1
Rotwild	51	94,1	90,2	74,5
Wildschwein	69	100,0	91,3	60,9
Total	188	98,4	92,5	68,1

Die graphische Darstellung der mikrobiologischen Ergebnisse sind in Abbildungen 6, 7 und 8 zu finden. Die Medianwerte der aeroben Gesamtkeimzahl und Zahl der *Enterobacteriaceae* lagen bei den einzelnen Tierarten in einer ähnlichen Größenordnung. Für die Gesamtkeimzahl lagen diese Werte zwischen 4,51 (Wildschwein) und 4,86 (Rehwild)  $\text{Log}_{10}$  KbE/cm<sup>2</sup> und für die Zahl der *Enterobacteriaceae* zwischen 3,82 (Wildschwein) und 4,28 (Rehwild)  $\text{Log}_{10}$  KbE/cm<sup>2</sup> (Abb. 6 und Abb. 7). Die statistische Auswertung der Ergebnisse der Gesamtkeimzahl sowie der Zahl der *Enterobacteriaceae* ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Tierarten ( $p > 0,05$ ). Die Untersuchung auf *E. coli* zeigte, dass im Vergleich zu den Proben des Reh- und Rotwildfleisches (72,1% bzw. 74,5%) in einem geringeren Anteil der Proben des Wildschweinfleisches (60,9%) *E. coli* nachweisbar war (Tab. 4). Der für Wildschweinproben ermittelte Medianwert des Gehaltes an *E. coli* (2,53  $\text{Log}_{10}$  KbE/cm<sup>2</sup>) war aber mit  $p < 0,05$  signifikant höher als der im Wildwiederkäuerfleisch (Rehwild: 1,31  $\text{Log}_{10}$  KbE/cm<sup>2</sup>, Rotwild: 1,84  $\text{Log}_{10}$  KbE/cm<sup>2</sup>) (Abb. 8). Der Gehalt an *E. coli* bei Fleischproben vom Rotwild war ebenfalls signifikant höher als bei Rehwildfleisch ( $p < 0,05$ ) (Abb. 8).

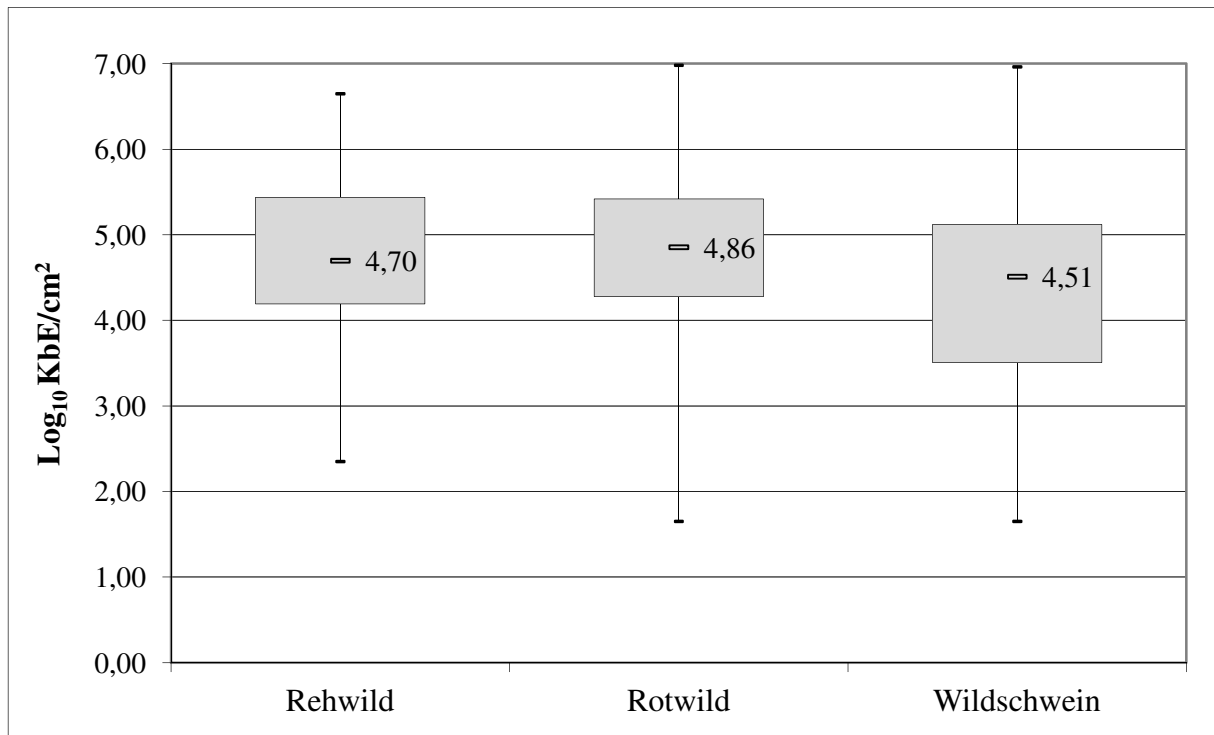


Abb. 6: Quantitative Darstellung der aerob wachsenden Gesamtkeimzahl beim verpackten Rehwild-, Rotwild- und Wildschweinfleisch in Log<sub>10</sub> KbE/cm<sup>2</sup>.

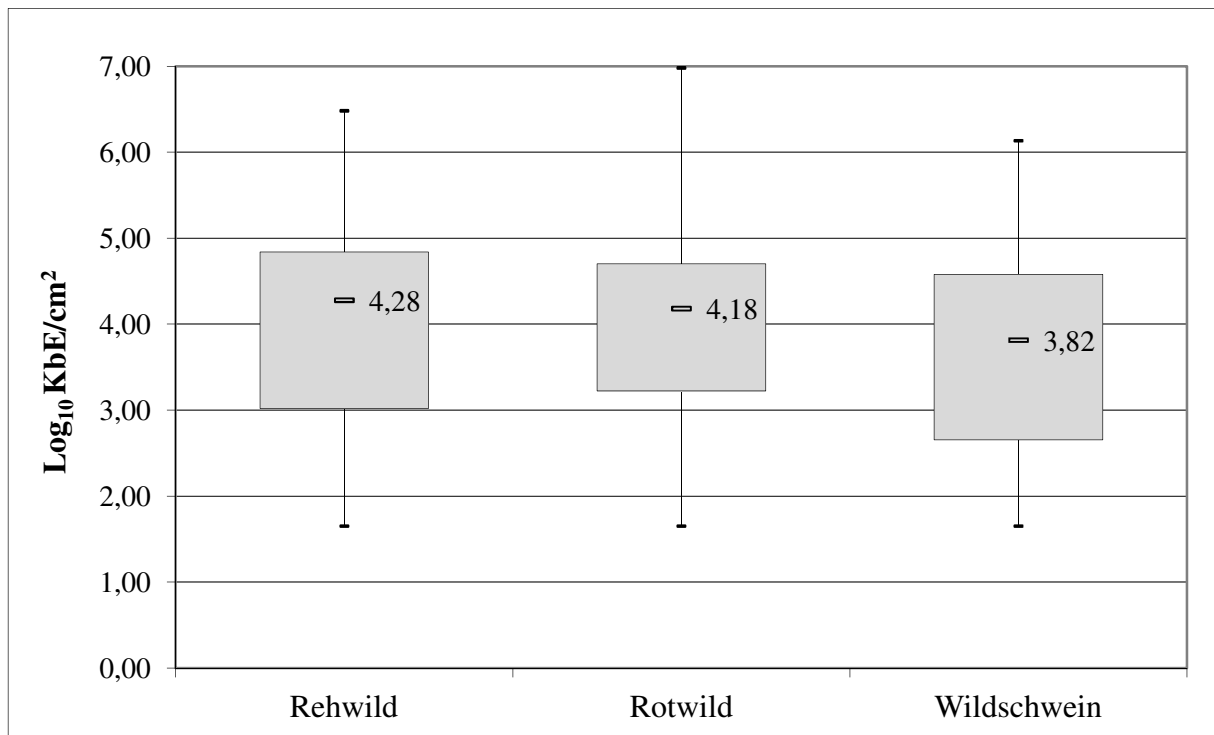
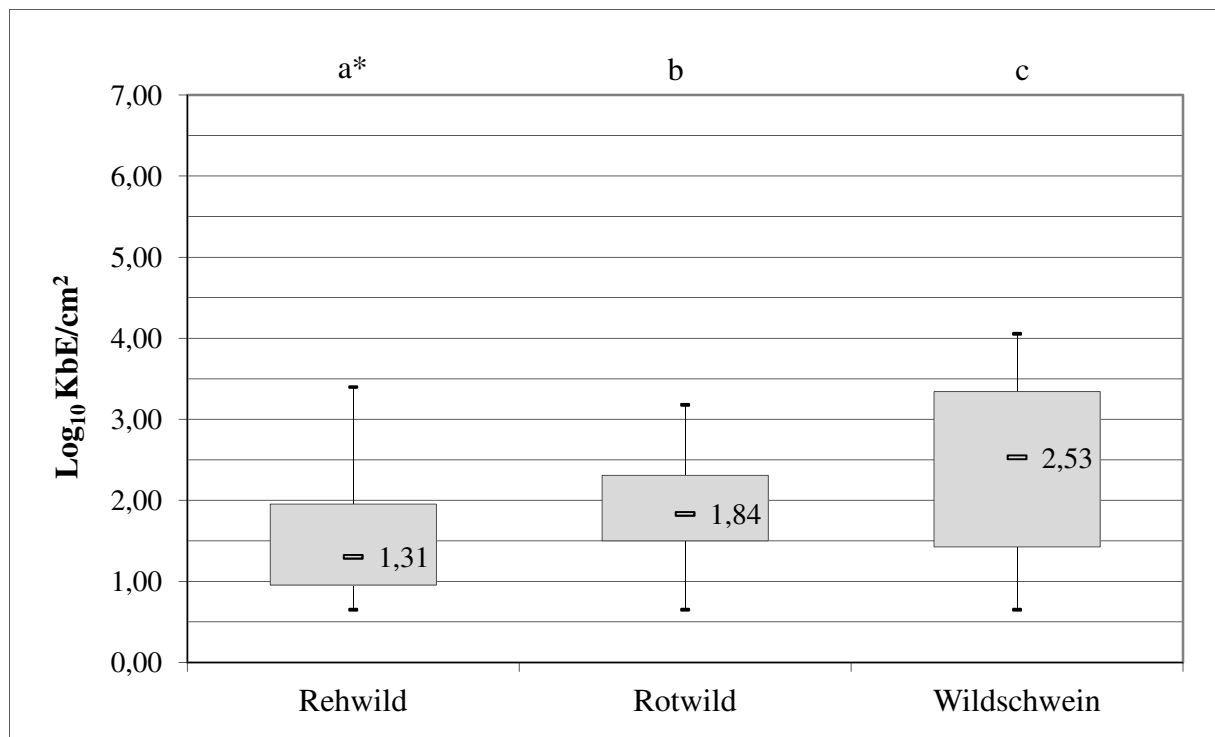


Abb. 7: Quantitative Darstellung der Zahl der *Enterobacteriaceae* beim verpackten Rehwild-, Rotwild- und Wildschweinfleisch in Log<sub>10</sub> KbE/cm<sup>2</sup>.



**Abb. 8: Quantitative Darstellung der Zahl der *E. coli* beim verpackten Rehwild-, Rotwild- und Wildschweinfleisch in Log<sub>10</sub> KBE/cm<sup>2</sup>.**

\* unterschiedliche Buchstaben zeigen statistische Signifikanz ( $p < 0,05$ ).

Anhand der Richt- und Grenzwerte der VO (EG) 2073/2005 konnten 58 (85,3%), 42 (82,4%) und 61 (88,4%) der Fleischproben vom Reh-, Rot- bzw. Schwarzwild bezüglich der Ergebnisse der aeroben Gesamtkeimzahl als befriedigend bezeichnet werden (Abb. 9). Des Weiteren wurden alle übrigen 10 (14,7%) Proben vom Rehwild als akzeptabel eingestuft und 9 Rotwild- und 8 Wildschweinfleischproben verteilten sich in dem akzeptablen und unbefriedigenden Bereich (11,8% und 5,9% bzw. 8,7% und 2,9%) (Abb. 9). Die Einordnung der Ergebnisse in Bezug auf den Gehalt an *E. coli* ergab ein unterschiedliches Bild. Während 94,1 % der Fleischproben vom Reh- und Rotwild als befriedigend oder akzeptabel eingestuft wurden, erfüllten 72,5% der Wildschweinproben die mikrobiologischen Kriterien. Die übrigen 4 (5,9%), 3 (5,9%) und 19 (27,5%) der Proben vom Reh-, Rot-, und Schwarzwild wurden als unbefriedigend eingeordnet (Abb. 10).

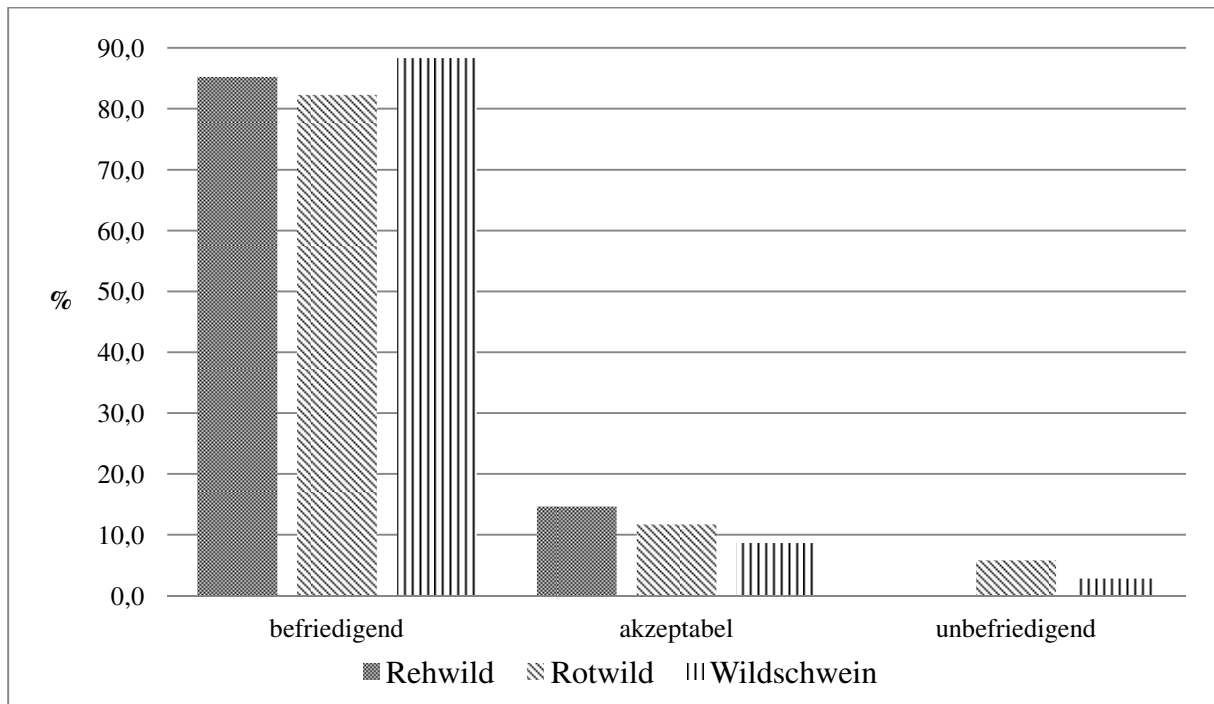


Abb. 9: Prozentuale Einteilung der untersuchten Wildfleischproben anhand der aeroben mesophilen Gesamtkeimzahl gemäß VO (EG) 2073/2005 in befriedigend, akzeptabel und unbefriedigend

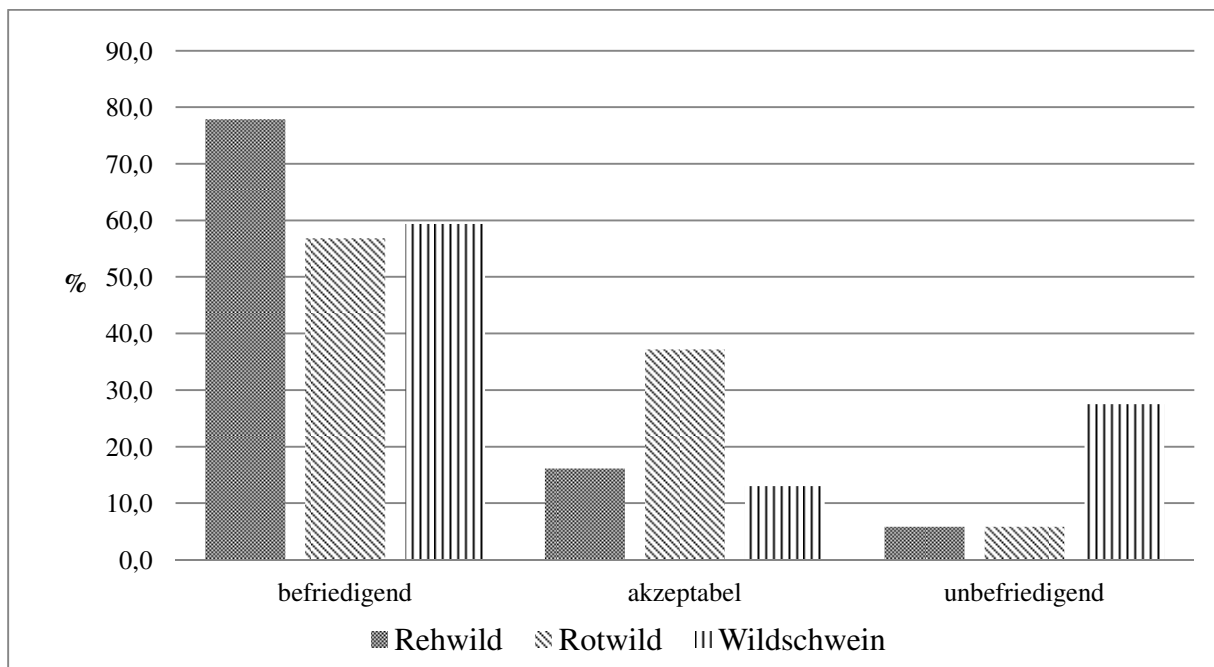


Abb. 10: Prozentuale Einteilung der untersuchten Wildfleischproben anhand des Gehaltes an *E. coli* gemäß VO (EG) 2073/2005 in befriedigend, akzeptabel und unbefriedigend

Koagulase-positive Staphylokokken wurden in insgesamt 20 Proben (10,6%) nachgewiesen (Tab. 5). Dabei gelang der Nachweis häufiger in Proben vom Wildschwein (18,8%) als in Proben vom Reh- (4,4%) und Rotwild (7,8%) (Tab. 5). Die Unterschiede zwischen den Prävalenzen vom Rehwild und Wildschwein waren statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ). Für die positiven Proben konnten Medianwerte von  $1,65 \text{ Log}_{10} \text{ KbE/cm}^2$  bei Rehwild,  $1,92 \text{ Log}_{10} \text{ KbE/cm}^2$  bei Rotwild und  $1,98 \text{ Log}_{10} \text{ KbE/cm}^2$  bei Wildschwein ermittelt werden. Die berechneten Mittelwerte der Zahl Koagulase-positiver Staphylokokken unterschieden sich bei den einzelnen Tierarten nicht signifikant voneinander ( $p > 0,05$ ).

In insgesamt 29 Proben (15,4%) konnte *L. monocytogenes* nachgewiesen werden (Tab. 5). Bei der Gegenüberstellung der Prävalenzen der einzelnen Tierarten stellte sich heraus, dass Proben des Wildschwein- und Rotwildfleisches mit einer Prävalenz von 21,7% bzw. 19,6% häufiger belastet waren als die Proben des Rehfleisches (5,9%) (Tab. 5). Der Häufigkeitsnachweis von *L. monocytogenes* bei Wildschwein und Rotwild war statistisch signifikant höher als bei Rehwild ( $p < 0,05$ ).

Salmonellen konnten lediglich aus 4 Proben vom Wildschwein (2,1% der gesamten Probenanzahl) isoliert werden (Tab. 5). Die Salmonellen-positiv getesteten Proben zeigten Gehalte von *E. coli*, die im oberen Quartil zu finden waren (über  $3,34 \text{ Log}_{10} \text{ KbE/cm}^2$ ). Die Gesamtkeimzahl und der Gehalt an *Enterobacteriaceae* von drei dieser Proben lagen mit Ergebnissen über  $5,12 \text{ Log}_{10} \text{ KbE/cm}^2$  bzw.  $4,58 \text{ Log}_{10} \text{ KbE/cm}^2$  ebenfalls auf dem oberen Quartil. Die Isolate wurden als *S. choleraesuis* subsp. *choleraesuis* identifiziert.

**Tab. 5: Prävalenzen von Zoonoseerregern bei verpacktem Wildfleisch**

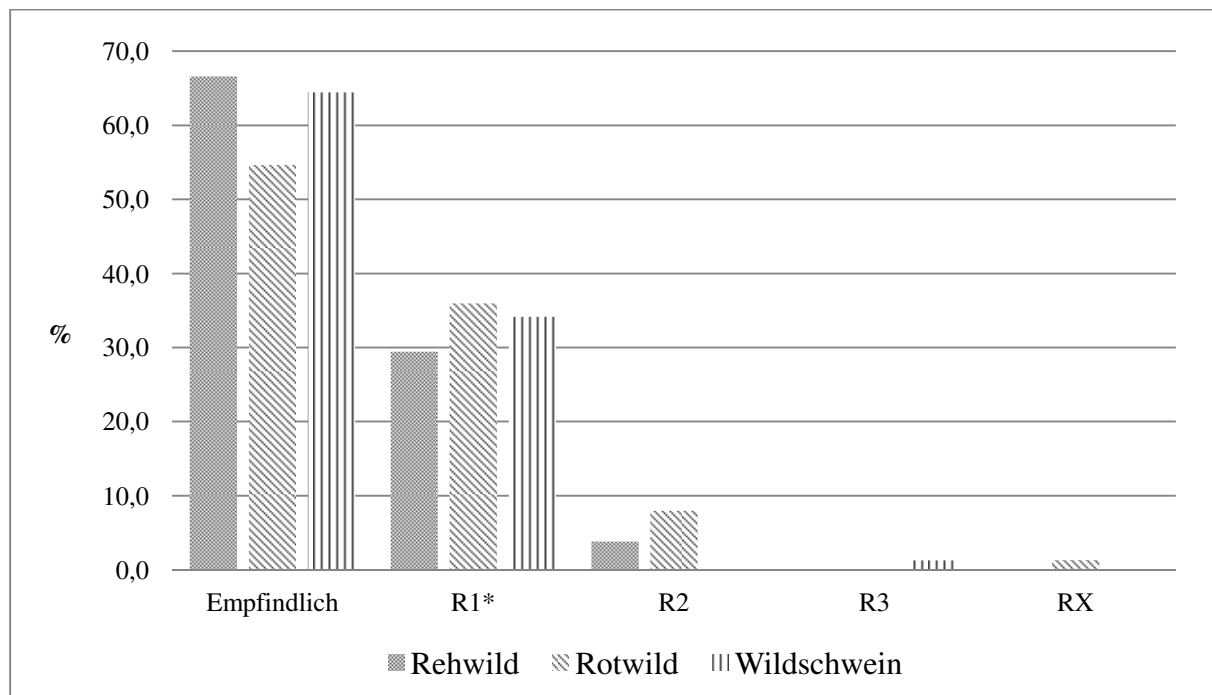
Tierart	Anzahl Proben	Nachweisrate in %*		
		koagulase positiven Staphylokokken	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Salmonella</i> spp.
Rehwild	68	4,4 <sup>a</sup>	5,9 <sup>a</sup>	-
Rotwild	51	7,8 <sup>ab</sup>	19,6 <sup>b</sup>	-
Wildschwein	69	18,8 <sup>b</sup>	21,7 <sup>b</sup>	5,8
Total	188	10,6	15,4	2,1

\* unterschiedliche Buchstaben zeigen statistische Signifikanz ( $p < 0,05$ ).

#### 4.2. Empfindlichkeitstestung von *E. coli*-Isolaten

Zur antibiotischen Sensibilitätsprüfung wurden insgesamt 229 *E. coli*-Isolate (78 vom Rehwild, 75 vom Rotwild und 76 vom Wildschwein) einbezogen. Mit Ausnahme von 20 Fleischproben vom Rehwild, einer Probe vom Rotwild und acht vom Schwarzwild wurden jeweils zwei Isolate mit unterschiedlichen biochemischen Profilen aus jeder positiven Fleischprobe auf ihre antibiotische Empfindlichkeit untersucht.

Von den einbezogenen *E. coli*-Stämmen überschritten 87 (38,0%) die beschriebenen MHK-Grenzwerte einer oder mehrerer Antibiotika (Abb. 11). Die unempfindlichen *E. coli*-Isolate stammten von insgesamt 70 Proben (21 vom Rehwild-, 27 vom Rotwild- und 22 vom Wildschweinfleisch). Die Mehrheit der positiven Fleischproben (88,6%) wies nur ein unempfindliches Isolat auf oder die Unempfindlichkeitsmuster beider Isolate waren unterschiedlich. Die unempfindlichen Isolate, aus den übrigen zwei Fleischproben vom Rehwild, drei vom Rotwild und drei vom Wildschwein, waren in Bezug auf das phänotypische Empfindlichkeitsmuster gleichzusetzen. Bei 29,5% der Isolate vom Rehwild, 36,0% vom Rotwild und 34,2% vom Wildschwein wurden Resistenzen oder ein erhöhter MHK-Wert gegenüber einem Antibiotikum nachgewiesen. Des Weiteren erwiesen sich 3,8%, 9,3% und 1,3% der Isolate vom Rehwild-, Rotwild- bzw. Wildschweinfleisch als unempfindlich gegen mehrere Antibiotika (mehr als zwei Substanzen) (Abb. 11).



**Abb. 11: Prozentuale Verteilung der Ergebnisse der Antibiotikaempfindlichkeitstestung von *E. coli*-Isolaten aus Wildfleisch**

\*R1-Antibiotikaunempfindlichkeit gegenüber einer Substanz, R2-Antibiotikaunempfindlichkeit gegenüber zwei Substanzen, R3-Antibiotikaunempfindlichkeit gegenüber drei Substanzen, RX-Antibiotikaunempfindlichkeit gegenüber mehr als 3 Substanzen (In diesem Fall 16)

Die allgemeinen Ergebnisse der Empfindlichkeitstestung der *E. coli*-Isolate vom Fleisch einzelner Tierarten werden in Tabelle 6 dargestellt. Die  $MHK_{50}$ - und  $MHK_{90}$ -Werte der getesteten *E. coli*-Population für jedes Antibiotikum wird in Anhangstabelle 6 zusammengestellt. Bei einem Teil der geprüften Isolate ließ sich eine reduzierte Wirksamkeit der Antibiotika Cefaclor (75/229), Doxycycline (9/229), Ampicillin (5/229), Cefoxitin (4/229), Chloramphenicol (4/229) und Tobramycin (2/229) feststellen. Eins der Isolate, welche hohe  $MHK$ -Werte gegenüber Cefaclor und Ampicillin aufwiesen, war ebenfalls resistent gegenüber weiteren  $\beta$ -Laktam-Antibiotika. Dieser *E. coli*-Stamm wurde aus einer Fleischprobe von Rotwild isoliert. Für Cefuroxim zeigten 40 Isolate (17,5%) einen  $MHK$ -Wert  $>4 \mu\text{g/ml}$ . Der klinische Grenzwert sowie der epidemiologische Cut-Off liegen bei  $>8 \mu\text{g/ml}$  und waren aus dem Testsystem nicht ablesbar, so dass für diese Isolate keine Einstufung als resistent erfolgen konnte. Die Wirkstoffkombinationen Cotrimoxazole, Piperacillin/Tazobactam, die Antibiotika aus der Gruppe der Fluorchinolone Ciprofloxacin und Ofloxacin sowie das synthetische Nitrofurantoin haben bei der



niedrigsten geprüften Konzentrationsstufe (16 µg/ml, 4 µg/ml, 1 µg/ml, 1 µg/ml bzw. 64 µg/ml) das Wachstum aller Isolate effektiv gehemmt.

**Tab. 6: Ergebnisse der Antibiotikaempfindlichkeitstestung von *E. coli*-Isolaten aus Wildfleisch**

Wirkstoff	Isolate mit MHK-Werten über Grenzwert					
	Rehwild (n=78)		Rotwild (n=75)		Wildschwein (n=76)	
	n	%	n	%	n	%
Ampicillin	-	-	5	6,7	-	-
Ampicilin/Sulbactam	-	-	1	1,3	-	-
Azlocilin	-	-	1	1,3	-	-
Mezlocillin	-	-	1	1,3	-	-
Piperacillin	-	-	1	1,3	-	-
Piperacilin/Tazobactam	-	-	-	-	-	-
Ticarcillin	-	-	1	1,3	-	-
Cefaclor	22	28,2	29	38,7	24	31,6
Cefixim	-	-	1	1,3	-	-
Cefazolin	-	-	1	1,3	-	-
Cefotaxim	-	-	1	1,3	-	-
Cefoxitin	2	2,6	1	1,3	1	1,3
Cefoperazone	-	-	1	1,3	-	-
Cefotiam	-	-	1	1,3	-	-
Ceftazidim	-	-	1	1,3	-	-
Cefepim	-	-	1	1,3	-	-
Aztreonam	-	-	1	1,3	-	-
Gentamicin	-	-	-	-	-	-
Amikacin	-	-	-	-	-	-
Tobramycin	1	1,3	1	1,3	-	-
Doxycyclin	4	5,1	3	4,0	2	2,6
Chloramphenicol	-	-	2	2,7	2	2,6
Ofloxacin	-	-	-	-	-	-
Ciprofloxacin	-	-	-	-	-	-
Nitrofurantoin	-	-	-	-	-	-
Cotrimoxazol	-	-	-	-	-	-

Die phänotypischen Unempfindlichkeitsmuster untersuchter *E. coli*-Isolate aus Wildfleisch werden in Tabelle 7 zusammengefasst. Isolate, die lediglich eine verringerte Empfindlichkeit gegenüber Cefaclor aufwiesen, waren die am häufigsten gefundenen Profile (19/26 von Rehwild, 23/34 von Rotwild und 24/27 von Wildschwein) gefolgt von Doxycyclin, welches bei 3 Isolate von Rehwild, 2 von Rotwild und 1 von Schwarzwild zu beobachten war. Einfache Resistenzen gegen Ampicillin (1 Isolat Rotwild), Chloramphenicol (1 Isolat Wildschwein) und Tobramycin (1 Isolat Rotwild) wurden ebenfalls ermittelt. Folgende phänotypischen Kombinationen wurden bei den übrigen Isolaten nachgewiesen: 3 Isolate aus Rotwildfleisch zeigten die Kombination Ampicillin-Cefaclor, 1 Isolat Cefaclor-Chloramphenicol und 1 Isolat Chloramphenicol-Doxycyclin. Bei einem Isolat vom Rehwild und einem vom Rotwild wurde die Kombination Cefaclor-Cefoxitin nachgewiesen. Außerdem wurden die Kombinationen Cefaclor-Tobramycin und Cefaclor-Doxycyclin jeweils bei einem Isolat Rehwild beobachtet. Nur 1 Isolat vom Wildschwein zeigte Resistenz gegen Chloramphenicol zusammen mit einer verringerten Empfindlichkeit gegenüber Cefoxitin und Doxycyclin und lediglich ein *E. coli*-Stamm aus Rotwildfleisch war resistent gegen alle  $\beta$ -Laktam-Antibiotika, Ampicillin/Sulbactam und Aztreonam, dieser erwies sich aber als empfindlich gegenüber Cefoxitin und der Wirkstoffkombination Piperacillin/Tazobactam (Tab. 7). Aus den 16 unempfindlichen *E. coli*-Isolaten, die aus der gleichen Probe stammten und gleiche phänotypische Unempfindlichkeitsmuster zeigten, wiesen 14 lediglich einen hohen MHK-Wert gegenüber Cefaclor auf. Die übrigen 2 Isolate aus Rotwildfleisch waren resistent gegenüber Ampicillin und zeigten gleichzeitig einen erhöhten MHK-Wert gegenüber Cefaclor.

**Tab. 7: Zusammenfassung der gefundenen Antibiotikaunempfindlichkeitsmuster bei *E. coli*-Isolaten aus Wildfleisch**

Antibiotikaunempfindlichkeitsmuster	Zahl der Isolate		
	Rehwild	Rotwild	Wildschwein
ALC-AMP-AMS-AZT-CAZ-CEC-CEP-CEZ-CFI-CTM-CTX-FOP-MZL-PIP-TIC	-	1	-
COX-CMP-DOX	-	-	1
AMP-CEC	-	3	-
CEC-CMP	-	1	-
CEC-COX	1	1	-
CEC-TOB	1	-	-
CEC-DOX	1	-	-
DOX-CMP	-	1	-
AMP	-	1	-
CEC	19	23	24
CMP	-	-	1
COX	1	-	-
DOX	3	2	1
TOB	-	1	-

ALC: Azlocillin, AMP: Ampicillin, AMS: Ampicillin/Sulbactam, AZT: Aztreonam, CAZ: Ceftazidim, CEC: Cefaclor, CEP: Cefepim, CEZ: Cefazolin, CFI: Cefixim, CMP: Chloramphenicol, COX: Cefoxitin, CTM: Cefotiam, CTX: Cefotaxim, DOX: Doxycyclin, FOP: Cefoperazone, MZL: Mezlocillin PIP: Piperacillin, TIC: Ticarcillin, TOB: Tobramycin.

### 4.3. Phänotypische Charakterisierung von *Escherichia coli* aus Wildfleisch

Die 229 untersuchten *E. coli*-Isolate konnten insgesamt 29 verschiedenen API 20E-Profilen zugeordnet werden. Die Fähigkeit, die Zucker Glukose, Mannit und Arabinose abzubauen, wurde bei allen untersuchten *E. coli*-Stämmen nachgewiesen. Die enzymatische Aktivität von  $\beta$ -Galaktosidase (97,4%) und Lysine Decarboxylase (96,9%), die Fermentation/Oxidation von Melibiose (95,2%), Rhamnose (94,8%) und Sorbit (99,1%), sowie die Indol-Bildung (98,7%) kamen in hohen Raten vor. Weniger häufig testeten die *E. coli*-Stämme auf die enzymatische Aktivität von Ornithine Decarboxylase (63,3%) und auf den biochemischen Abbau von Saccharose (68,1%). Ein vergleichsweise niedriger Anteil der *E. coli*-Isolate konnte Inosit (6,1%) und Amygdalin (2,2%) abbauen oder Arginin Dihydrolase (2,6%) bilden. In Anbetracht des vom API-System erstellten Zahlenprofils wurden 77,7% der untersuchten Isolate 4 API-Profilen zugeordnet (Tab. 8). Die isolierten *E. coli*- Stämme zeigten überwiegend die biochemischen Profile 5144572 (38,4%), 5044572 (17,5%), 5044552 (13,1%) und 5144552 (8,7%). Die übrigen API 20E-Profile wurden nur bei jeweils ein bis

maximal fünf Isolaten beobachtet (Tab. 8). Die in dieser Arbeit nachgewiesenen API 20E-Profile und die entsprechenden Stoffwechselphänotypen werden in Anhangstabelle 7 und Anhangstabelle 8 dargestellt.

**Tab. 8: Zuordnung der untersuchten *E. coli*-Isolate aus Wildfleisch anhand der API 20E-Profile**

API 20E-Profil	Prozentuale Verteilung der untersuchten Isolate		
	Rehwild (n=78)	Rotwild (n=75)	Wildschwein (n=76)
5144572	33,3	42,7	39,5
5044572	17,9	17,3	17,1
5044552	6,4	13,3	19,7
5144552	9,0	5,3	11,8
4144512	1,3	5,3	-
5144562	5,1	1,3	-
5144752	3,8	1,3	-
1144512	2,6	1,3	-
5044772	2,6	1,3	-
5104572	1,3	1,3	1,3
5144772	2,6	1,3	-
7044552	2,6	-	1,3
5044542	1,3	-	1,3
5044573	-	2,7	-
5144532	1,3	-	1,3
5144762	2,6	-	-
7144572	-	-	2,6
1044552	-	1,3	-
1044572	-	1,3	-
1144572	1,3	-	-
1144762	1,3	-	-
4144572	-	-	1,3
5044153	1,3	-	-
5044753	-	1,3	-
5144172	-	-	1,3
5144512	1,3	-	-
5144542	1,3	-	-
5144553	-	1,3	-
7144562	-	-	1,3

Die 87 *E. coli*-Stämme, die einen erhöhten MHK-Wert gegenüber mindestens einem Antibiotikum zeigen, verteilten sich auf 18 API 20E-Profile (Tab. 9). Ähnlich wie bei der gesamten Stichprobe, wurde das Profil 5144572, mit einem Vorkommen von 55,2%, bei unempfindlichen *E. coli*-Isolaten am häufigsten nachgewiesen, gefolgt von 5144552 (18,4%), 5044552 (6,9%) und 5044572 (3,4%) (Tab. 9). Hinsichtlich der phylogenetischen Zugehörigkeit waren die unempfindlichen Isolate überwiegend in Phylogruppe B1 (66,7%),

gefolgt von Phylogruppen A (19,5%), D (8,1%) und B2 (5,8%) einzuteilen (Tab. 10). Differenziert betrachtet, kam die phylogenetische Hauptgruppe B1 bei den unempfindlichen *E. coli*-Isolaten vom Rotwildfleisch häufiger vor (76,5%), im Vergleich zu den Isolaten vom Reh- und Wildschweinfleisch (53,8% und 66,7%). Hingegen, war die Prävalenz der Phylogruppe A bei *E. coli*-Stämmen vom Fleisch von Reh- und Schwarzwild höher (26,9% und 22,2%), als bei den Isolaten vom Rotwildfleisch (11,8%). Ferner wurde kein unempfindliches Isolat von Wildschweinfleisch der Phylogruppe B2 zugeordnet (Tab. 10).

**Tab. 9: Zuordnung der unempfindlichen *E. coli*-Isolate aus Wildfleisch anhand der API 20E-Profil**

API 20E-Profil	Prozentuale Verteilung der untersuchten Isolate		
	Rehwild (n= 26)	Rotwild (n= 34)	Wildschwein (n= 27)
5144572	53,8	61,8	48,1
5144552	15,4	14,7	25,9
5044552	3,8	8,8	7,4
5044572	3,8	-	7,4
1044552	-	2,9	-
1144512	-	2,9	-
4144512	-	2,9	-
4144572	-	-	3,7
5044153	3,8	-	-
5104572	-	2,9	-
5144172	-	-	3,7
5144512	3,8	-	-
5144532	3,8	-	-
5144542	3,8	-	-
5144562	3,8	-	-
5144762	3,8	-	-
5144772	-	2,9	-
7144562	-	-	3,7

**Tab. 10: Prozentuale Verteilung der unempfindlichen *E. coli*-Isolate aus Wildfleisch in den phylogenetischen Hauptgruppen**

Phylogenetische Hauptgruppe	Rehwild (n= 26)	Rotwild (n= 34)	Wildschwein (n= 27)
A	26.9	11.8	22.2
B1	53.8	76.5	66.7
B2	11.5	5.9	-
D	7.7	5.9	11.1

Wie aus Tabelle 11 ersichtlich, zeigten 91,2% der Isolate aus Phylogruppe B1 entweder das biochemische Profil 5144572 oder 5144552. Ähnlich dazu, wiesen 82,4% *E. coli*-Stämme aus Phylogruppe A die Profile 5144572, 5144552 und 5044552 auf. Im Gegensatz dazu verteilten sich 40,0% der *E. coli*-Isolate aus den phylogenetischen Gruppen B2 und D in den 3 häufigeren API 20E-Profilen.

**Tab. 11: Prozentuale Verteilung der unempfindlichen *E. coli*-Isolate von jeder phylogenetischen Hauptgruppe in die spezifischen API 20E-Profile**

API 20E-Profil	Phylogenetische Hauptgruppe			
	A (n=17)*	B1 (n=57)	B2 (n=6)	D (n=7)
5144572	29,4	73,7	16,7	-
5144552	23,5	17,5	33,3	-
5044552	29,4	-	-	14,3
5044572	-	-	-	42,9
1044552	5,9	-	-	-
1144512	-	-	-	14,3
4144512	-	-	16,7	-
4144572	-	1,8	-	-
5044153	5,9	-	-	-
5104572	-	1,8	-	-
5144172	-	1,8	-	-
5144512	-	-	-	14,3
5144532	-	-	16,7	-
5144542	-	-	-	14,3
5144562	-	1,8	-	-
5144762	-	1,8	-	-
5144772	-	-	16,7	-
7144562	5,9	-	-	-

\* Anzahl der unempfindlichen *E. coli*-Isolate, die zur entsprechenden phylogenetischen Hauptgruppe gehören.

Tabelle 12 gibt eine Übersicht der Verteilung der Isolate in den 4 phylogenetischen Hauptgruppen in Zusammenhang mit dem Unempfindlichkeitsmuster. In Bezug auf die Antibiotikaempfindlichkeit wurden 53, 11, 5 und 6 der *E. coli*-Isolaten, die bei 4 µg/ml Cefaclor wachsen konnten, den Phylogruppen B1, A, B2 bzw. D zugeordnet. Ähnlich verteilten sich die Isolate, die verringerte Empfindlichkeit gegenüber Doxycyclin zeigten, in den Phylogruppen B1 (55.6%), A (33.3%) und D (11.1%) (Tab. 12). Das mehrfachresistente Isolat von Rotwild sowie das Isolat aus Wildschweinfleisch, das das Unempfindlichkeitsmuster Cefoxitin-Chloramphenicol-Doxycyclin zeigte, gehörten zu der Phylogruppe A (Tab. 12).

**Tab. 12: Verteilung der unempfindlichen *E. coli*-Isolate auf die phylogenetischen Hauptgruppen**

Phylogenetische Hauptgruppe	Anzahl der Isolate mit erhöhtem MHK-Wert gegenüber entsprechendem Wirkstoff					
	AMP	CEC	CMP	COX	DOX	TOB
A	2	11	3	2	3	1
B1	2	53	1	1	5	1
B2	1	5	-	1	-	-
D	-	6	-	-	1	-

AMP: Ampicillin, CEC: Cefaclor, CMP: Chloramphenicol, COX: Cefoxitin, DOX: Doxycyclin, TOB: Tobramycin

## 5. DISKUSSION

### 5.1. Mikrobiologische Qualität von verpacktem Wildfleisch

In der vorliegenden Studie wurde die mikrobiologische Qualität verpackter Wildfleischproben anhand verschiedener Hygieneparameter untersucht. Das Bakterium *E. coli* wurde hierbei besonders berücksichtigt und detailliert betrachtet, weil es einerseits als wichtiger Kontrollparameter für fäkale Kontamination des Fleischproduktes während des Bearbeitungsprozesses gilt [VO (EG) 2073/2005] und andererseits als Erreger lebensmittelbedingter Infektionen von hoher Relevanz ist (NATARO u. KAPER 1998).

Das Probenmaterial zur vorliegenden Untersuchung bestand aus Fleischstücken, die von verschiedenen Wildtierarten (Reh-, Rot- und Schwarzwild) gewonnen wurden. Die Wildfleischproben wurden unverarbeitet im Herstellungsbetrieb vakuumverpackt und vor dem Versand ans Labor tiefgefroren (-18°C) gelagert. Die hier untersuchten Proben wurden dem gleichen Herstellungsprozess unterzogen, der für die zu vermarktenden Wildfleischprodukte vom Wildbearbeitungsbetrieb durchgeführt wird. Zur Wirkung des Gefrierprozesses und der folgenden Tiefgefrierlagerung wurde in verschiedenen Arbeiten ermittelt, dass die bakterielle Mikroflora in unterschiedlichem Grad von dieser Behandlungsart beschädigt wird. Der Beschädigungsgrad, der auf den Lebensmitteln vorhandenen Bakterien, hängt unter anderem von der Lagertemperatur, der Gefriereschwindigkeit oder der Zusammensetzung des Lebensmittels ab (ARCHER 2004). Das Zusammenspiel dieser Einflussfaktoren kann zu Variationen beim antimikrobiellen Wirkungsgrad des Einfrierprozesses und der Tiefkühlagerung zwischen verschiedenen Lebensmittelgruppen führen (GORMLEY et al. 2002; CASARIN et al. 2009). Laut Literaturangaben, kann dennoch allgemein für die Lebensmittel gelten, dass der größte Teil der Reduktion von Mikroorganismen während des Einfrierprozess stattfindet (5 – 33 %), während nur eine geringe Senkung der Bakterienpopulation bei der abschließenden Tiefkühlagerung zu erwarten ist (0 - 12 % monatlich) (ESCARTÍN et al. 2000; DYKES u. MOORHEAD 2001; MOORHEAD u. DYKES 2002; CASARIN et al. 2009; PRADOS et al. 2006; REINARZT 2011). Die hier untersuchten Wildfleischproben wurden erst nach 3 - 5 Tagen kontinuierlicher Tiefkühlagerung entnommen, so dass der Gefrierprozess vollständig abgeschlossen war. Der obengenannten Literatur zur Folge kann angenommen werden, dass



die hier dargestellten Ergebnisse aufgrund des Zeitpunkts, an dem die Probenahme stattfand, dem mikrobiologischen Status des dem Einzel- und Großhandel, sowie dem Endverbraucher angebotenen Produkts entsprechen könnten.

### ***5.1.1 Hygienische Qualität des verpackten Wildfleisches***

#### **5.1.1.1 Aerobe mesophile Gesamtkeimzahl**

Verschiedene Grade bakterieller Kontamination konnten anhand der Gesamtkeimzahl in 98,4% der untersuchten Proben nachgewiesen werden. Mit einem allgemeinen Medianwert von  $4,70 \text{ Log}_{10} \text{ KbE/cm}^2$ , waren die in dieser Arbeit festgestellten Keimgehalte von Wildfleisch niedriger, als die Ergebnisse ähnlicher Studien an verpacktem Wildfleisch, welche Mittelwerte zwischen  $5,2 \text{ Log}_{10} \text{ KbE/g}$  und  $6,9 \text{ Log}_{10} \text{ KbE/g}$  ergaben (KOBÉ u. RING 1992; KANAI et al. 1997; WACHEK 2008). Auch in einer Arbeit von TÜRCK (2008) wurde in Fleischproben von Reh- und Schwarzwild eine höhere Gesamtkeimzahl als in der vorliegenden Studie ( $5,7 \text{ Log}_{10} \text{ KbE/g}$  bzw.  $6 \text{ Log}_{10} \text{ KbE/g}$ ) angegeben. Der von TÜRCK (2008) ermittelte Medianwert der Gesamtkeimzahl für Rotwildfleisch war jedoch mit  $4,3 \text{ Log}_{10} \text{ KbE/g}$  niedriger als in der vorliegenden Untersuchung. Die Unterschiede zwischen den eigenen Ergebnissen und den Angaben anderer Autoren, könnten in der Art der Proben begründet sein, die in den verschiedenen Studien untersucht wurden. Während die hier untersuchten Fleischproben keinem Verarbeitungsprozess unterzogen wurden, sondern lediglich nach kurzer Lagerungszeit (3 – 5 Tage) im bearbeitenden Betrieb ins Labor transportiert wurden, untersuchten die anderen genannten Studien vor allem handelsübliche oder weiterverarbeitete Proben. In der Untersuchung von WACHEK (2008) wurde weiterverarbeitete Ware analysiert, während TÜRCK (2008) ausschließlich importiertes Wildfleisch untersuchte. Die von TÜRCK (2008) und WACHEK (2008) untersuchten Fleischprodukte waren zum Probezeitpunkt in tiefgefrorenem Zustand. Die von KOBÉ u. RING (1992) und KANAI et al. (1991) analysierten Proben stammten aus Einzelhandelsgeschäften. Die Verarbeitung oder auch die längere Lagerungsperiode der von den anderen Autoren untersuchten Fleischproben, könnten die Gründe für die beobachteten Unterschiede bei den aeroben Keimgehalten darstellen.

Nach Ergebnissen früherer Untersuchungen, ist bei weiterbehandeltem Fleisch üblicherweise von höheren Keimbelastungen auszugehen, als bei frisch geschlachteten und bearbeiteten Tierkörpern (REUTER 2008). Dennoch überschritten die vorliegenden Ergebnisse bezüglich der Gesamtkeimzahl nur zum Teil die Werte, die in der Literatur zur bakteriellen Kontamination von Wildtierkörpern an Sammelstellen und in bearbeitenden Betrieben angegebenen werden. ATANASSOVA et al. (2008) und AVAGNINA et al. (2012) ermittelten für frische Schalenwildkörper in der Decke durchschnittliche Oberflächenkeimgehalte zwischen 2,6 und 3,3  $\text{Log}_{10}$  KbE/cm<sup>2</sup>, während andere Autoren bei der Beprobung kühlgelagerter Körper einen höheren aeroben Keimgehalt feststellten (4,0 und 6,3  $\text{Log}_{10}$  KbE/cm<sup>2</sup>) (DEUTZ et al. 2000; PAULSEN u. WINKELMAYER 2004; ZWEIFEL et al. 2012). Bei Wildschweinkörpern an Sammelstellen lagen die Mittelwerte zwischen 3,2 und 4,6  $\text{Log}_{10}$  KbE/cm<sup>2</sup> und tendierten somit zu höheren Keimgehalten, als die Tierkörper von Wildwiederkäuern (APELT 2007; EGLEZOS et al. 2008; AVAGNINA et al. 2012). Aus den vorliegenden Ergebnissen und den Angaben der Literatur kann demnach nicht bestätigt werden, dass bei verpacktem Wildfleisch in der Regel von höheren Keimzahlen auszugehen ist, als bei Wildtierkörpern. Im Gegensatz zur traditionellen Fleischherstellung, ist die Gewinnung des Wildfleisches von hoch variablen Faktoren beeinflusst (GILL 2007). Diese Variabilität erschwert es, eine allgemein gültige Aussage über den generellen mikrobiologischen Status des Wildbrets zu treffen. Die Untersuchungen von APELT (2007) zeigten, dass ein guter Hygienestatus bei Wildtierkörpern durch eine korrekte Prozessdurchführung der ersten Gewinnungsphase erreicht werden kann. Es ist demnach anzunehmen, dass das hier analysierte Fleisch unter hygienisch günstigen Bedingungen gewonnen sowie sachgerecht behandelt wurde. Diese Faktoren können eine vergleichsweise niedrige Keimbelastung der in dieser Studie untersuchten Proben begünstigt haben.

#### 5.1.1.2 *Enterobacteriaceae* und *Escherichia coli*

Die Zahl der *Enterobacteriaceae* lag in der vorliegenden Untersuchung, mit einem Medianwert von 4,10  $\text{Log}_{10}$  KbE/cm<sup>2</sup> in 92,5% der Proben, zwischen den Werten anderer Studien zu verpacktem Wildfleisch. Während KOBE u. RING (1992) und WACHEK (2008) mit einem Mittelwert von 4,4  $\text{Log}_{10}$  KbE/g bzw. 5,9  $\text{Log}_{10}$  KbE/g eine höhere Belastung beschrieben, lagen die von BOERS et al. (1994) und TÜRCK (2008) ermittelten Medianwerte

zwischen 2,2 Log<sub>10</sub> KbE/g und 3,6 Log<sub>10</sub> KbE/g. Der Gehalt an *Enterobacteriaceae* in verpackten Fleischprodukten gibt nicht nur Hinweis auf fäkale Kontamination zum Zeitpunkt der Gewinnung, sondern weist auch auf mangelhafte Hygienebedingungen des Umfeldes hin, in welchem die Produkte bearbeitet bzw. verarbeitet wurden. Sowohl in dieser Studie, als auch in den vergleichend aufgeführten Arbeiten, waren die untersuchten Wildfleischproben unterschiedlicher Herkunft. Bestimmte Umweltbedingungen sowie die variierenden Methoden, durch welche die Wildfleischgewinnung in verschiedenen Regionen erfolgt, beeinflussen in unterschiedlicher Weise den Hygienegrad des Wildbrets (DEUTZ et al. 2000; PAULSEN u. WINKELMAYER 2004). Die Abweichungen der Zahl der *Enterobacteriaceae* könnten dementsprechend auf die variablen Erlegungsbedingungen, Jagdmethoden oder die Qualität der Hygienehandhabung auf allen folgenden Herstellungsstufen vor der Verpackung zurückgeführt werden.

Studien an Wildtierkörpern in verschiedenen Ländern haben unterschiedliche Ergebnisse der Untersuchung auf *Enterobacteriaceae* geliefert und unterstützen die bereits genannte Hypothese, dass die Herkunftsregion des Wildfleisches eine Rolle bei der hygienischen Qualität des verpackten Produktes spielen könnte. Bezüglich des Vorkommens von *Enterobacteriaceae* auf der Fleischoberfläche frisch erlegter Tiere divergierten die Angaben in den Untersuchungen von ATANASSOVA et al. (2008), AVAGNINA et al. (2012) und ZWEIFEL et al. (2012) deutlich. Während ZWEIFEL et al. (2012) eine gesamte Prävalenz von 87,5% und 89,3% für Rot- bzw. Rehschlachttierkörper in verschiedenen schweizerischen Wildbearbeitungsbetrieben beschrieb, konnten AVAGNINA et al. (2012) ein geringeres Vorkommen von *Enterobacteriaceae* bei Fleisch vom Reh- und Rotwild (73,8% bzw. 64,3%) an italienischen Sammelstellen nachweisen, während die Werte für Tierkörper von Schwarzwild (87,7%) vergleichbar waren. Bei frisch erlegten Tieren in Deutschland wurden Enterobakterien in noch geringerem Maße gefunden (ATANASSOVA et al. 2008). In dieser Studie lagen die Nachweisraten für in Deutschland erlegtes Reh-, Rotwild und Wildschwein bei 14,3%, 13,0% bzw. 30,8%. In den positiven Proben obengenannter Studien variierte der Gehalt an *Enterobacteriaceae* allerdings lediglich zwischen 1,80 und 3,45 Log<sub>10</sub> KbE/cm<sup>2</sup>, so dass anhand der quantitativen Untersuchung dieses Parameters geringe Unterschiede zwischen den Herkunftsregionen zu erkennen waren (ATANASSOVA et al. 2008; AVAGNINA et al. 2012; ZWEIFEL et al. 2012).

In der vorliegenden Arbeit wurden 68,1% der untersuchten Wildfleischproben positiv auf *Escherichia coli* getestet. Dabei war Wildschweinfleisch weniger häufig durch *E. coli* kontaminiert, als Fleisch von Wildwiederkäuern. Kam es jedoch zu einem positiven Befund bei Proben von Wildschweinfleisch, so war die Kontamination stärker ausgeprägt, als bei den Proben des Reh- und Rotwildes. Betrachtet man die Ergebnisse differenziert für die einzelnen Tierarten, war der Häufigkeitsnachweis dieses Keims für Wildschweinfleisch (60,9%) niedriger, als der für Reh- (72,1%) und Rotwildfleisch (72,5%). Diese Beobachtung entspricht den Angaben früherer Studien bezüglich Wildfleisches aus Wildgroßhandelsbetrieben und aus dem Einzelhandel. In den Untersuchungen von KOBE u. RING (1992) wurde auf der Oberfläche von 90,9% der Rotwildproben *E. coli* nachgewiesen, während 70,6% der Wildschweinfleischproben positiv auf diesen Parameter getestet wurden. TÜRCK (2008) ermittelte ebenfalls eine höhere Prävalenz von *E. coli* bei importierten Rotwildfleischstücken (62,1%) als bei importiertem Schwarzwildbret (52,4%). In der vorliegenden Studie war der *E. coli*-Medianwert für Wildschweinfleischproben höher ( $2,47 \text{ Log}_{10} \text{ KbE/cm}^2$ ) als bei Fleischproben von Reh- ( $1,27 \text{ Log}_{10} \text{ KbE/cm}^2$ ) und Rotwild ( $1,78 \text{ Log KbE/cm}^2$ ). Diese Unterschiede sind nach Kalkulationen unter Verwendung des Wilcoxon-Vorzeichen-Summen-Tests statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ). In Bezug auf die Belastung mit *E. coli* wurden im Vergleich mit Schwarzwildbret allerdings höhere durchschnittliche Keimgehalte in vermarktetem Rehwildfleisch ermittelt (TÜRCK 2008; MEMBRÉ et al. 2011). Die Unterschiede vorab genannter Arbeiten blieben jedoch ohne statistische Signifikanz. Die Untersuchung auf *E. coli* in vermarktetem Fleisch verschiedener Nutztierarten zeigten ebenfalls tierartlich bedingte Unterschiede bei dem Kontaminationsgrad der Fleischprodukte mit diesem Bakterium (ZHAO et al. 2001; BOHAYCHUK et al. 2006; GHAFIR et al. 2008). Bei der Gewinnung des Wildfleisches erschweren die charakteristischen Eigenschaften der einzelnen Tierarten (Verhaltensweise sowie spezifische anatomische Struktur) die Kontrolle der Kontamination aus der Darmflora in unterschiedlichem Maß (PAULSEN u. WINKELMAYER 2004; GILL 2007). Unterschiede bei dem Kontaminationsgrad von verpackten Wildfleischprodukten unterschiedlicher Tierarten könnten dementsprechend auf tierartbedingte Widrigkeiten, die bei der Kontrolle der bakteriellen Kontamination der Tierkörper auftreten können, zurückgeführt werden.

Ergebnisse anderer Untersuchungen auf frühen Produktionsstufen der Wildfleischgewinnung verdeutlichen, dass die Oberfläche frisch erlegter bzw. versorgter Wildschweinkörper häufiger und teilweise stärker mit fäkalen Mikroorganismen kontaminiert war, als die von Wildwiederkäuern. Beispielweise ermittelte APELT (2007) einen höheren Anteil *Enterobacteriaceae*-positiver Proben bei Wildschweinfleisch (30,8%) im Vergleich zu Reh- und Rotwildfleisch (14,3% bzw. 13,0%). Ähnlich dazu stellten AVAGNINA et al. (2012) eine höhere Prävalenz und Keimgehalt an *Enterobacteriaceae* für Wildschweinkörper gegenüber Wildwiederkäuern fest. Die Autoren begründeten ihre Ergebnisse damit, dass Wildschweinfleisch vorwiegend durch Bewegungsjagden gewonnen wird (AVAGNINA et al. 2012), bei welcher ein schlechterer Sitz des Schusses (Waidwundschuss an Magen-Darmbereich) häufig vorkommt (DEUTZ et al. 2006). Zudem kann die höhere Keimbelastung der Wildschweinschwarte durch Verhaltensweisen wie das „Suhlen“ der Tiere ein großes Risiko für eine Kreuzkontamination darstellen (ATANASSOVA et al. 2008). In den Untersuchungen von APELT (2007) und AVAGNINA et al. (2012) wurde zwar die Gesamtprävalenz von *Enterobacteriaceae*, jedoch nicht explizit das Vorhandensein von *E. coli* untersucht. Nach der VO (EG) 2073/2005 dienen *E. coli* und *Enterobacteriaceae* als Hygieneindikatoren zur Untersuchung fäkaler Kontamination von Fleischprodukten auf unterschiedlichen Herstellungsstufen. Während die quantitative Untersuchung auf *Enterobacteriaceae*, zum Nachweis fäkaler sowie Umfeld bedingter Kontamination bei Tierkörpern, vor dem Beginn des Kühlvorgangs, empfohlen wird, ist die Ermittlung der Belastung durch *E. coli* als genauere Parameter zur Beurteilung der mikrobiologischen Qualität des bearbeitenden Fleischproduktes vorgeschrieben. GHAFIR et al. (2008) bestätigte die Korrelation zwischen dem Gehalt an *Enterobacteriaceae* auf Schlachthofebene und dem Gehalt an *E. coli* auf Handelsebene bei traditionellen Fleischprodukten. Ein Zusammenhang zwischen den Beobachtungen einer höheren Belastung des verpackten Wildschweinfleisches mit *E. coli*, sowie den Ergebnissen früherer Studien bei unbearbeiteten Wildtierkörpern ist infolgedessen annehmbar. Dementsprechend ist eine genauere Fokussierung auf die tierartspezifischen Faktoren, die die Sicherheit der Wildschweinprodukte während des Gewinnungsprozesses gefährden, und die Suche nach Möglichkeiten für die Vermeidung der Kontamination des Wildschweinfleisches mit *E. coli* erforderlich.

### 5.1.1.3 Beurteilung der Hygiene anhand der mikrobiologischen Kriterien für Lebensmittel nach VO (EG) 2073/2005

Zur Gewährleistung der Sicherheit von Lebensmitteln müssen Lebensmittelunternehmer dafür sorgen, dass die rechtlichen Hygienevorschriften während des Herstellungsprozesses eingehalten werden [VO (EG) 584/2004 Kap. II Art. 3]. Zu diesem Zweck, müssen spezielle mikrobiologische Kriterien erfüllt werden [VO (EG) 584/2004 Kap. II Art. 4]. Für die sachliche Beurteilung mikrobiologischer Befunde gelten in europäischen Betrieben die Richt- und Grenzwerte der VO (EG) 2073/2005 als standardisierter Maßstab. Diese Verordnung wurde ausdrücklich für Schlachtkörper bzw. unverarbeitetes Fleisch von Rindern, Schafen, Ziegen, Pferden und Schweinen festgelegt und beinhaltet keine expliziten Angaben für die Beurteilung des Gewinnungsprozesses von Wildfleisch. Dennoch konnten APELT (2007), MAAHS (2010) und STÜBER (2012) aus ihren Ergebnissen von Reh-, Rot- und Schwarzwildtierkörpern schließen, dass die in der VO (EG) 2073/2005 vorgeschriebenen Kriterien ebenfalls für die Beurteilung der Hygiene von frisch gewonnenen Wildtierkörpern verwendet werden können. Trotz der hygienisch ungünstigeren Faktoren, die bei den ersten Phasen der Gewinnung vom Wildfleisch, im Vergleich zu landwirtschaftlichen Nutztieren, auftreten (vgl. oben, 2.3.1), konnten im Rahmen der erwähnten Studien, Wildtiere, die waidgerecht erlegt und versorgt sowie schnell gekühlt wurden, anhand der Oberflächenkeimgehalte entsprechend der VO (EG) 2073/2005 als befriedigend eingestuft werden. Auch in eigenen Untersuchungen konnten 97,3% und 86,2% der verpackten Wildfleischproben, in Bezug auf die Ergebnisse der aeroben Gesamtkeimzahl bzw. des Gehaltes an *E. coli*, als befriedigend oder akzeptabel eingestuft werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass der Herstellungsprozess des verpackten Wildbrets die mikrobiologischen Hygieneanforderungen erfüllen kann, die für zerkleinertes Fleisch von Nutztieren in Europa vorgeschrieben sind. Die Richt- und Grenzwerte der VO (EG) 2073/2005 wurden in der vorliegenden Studie als Maßstab für die Bewertung des hygienischen Status der untersuchten Wildfleischproben angewendet. Die hier dargestellten Beobachtungen lassen ferner die weitergehende Vermutung zu, dass die Anwendung der, in dieser Verordnung vorgeschriebenen Kriterien auch zur Beurteilung von portioniertem oder zerkleinertem Wildbret in Bearbeitungsbetrieben am Ende der Herstellungskette, herangezogen werden könnte.

### **5.1.2 Mikrobiologische Sicherheit des verpackten Wildfleisches**

Aufgrund des erheblichen Risikos, welches *Salmonella* spp. für die Fleischkonsumenten darstellt, ist das Vorhandensein dieser Krankheitserreger in Fleischprodukten, die entweder zum Rohverzehr oder zum Verzehr nach Erhitzen bestimmt sind, gemäß VO (EG) 2073/2005 zu überprüfen. Zur Beurteilung der mikrobiologischen Sicherheit des Fleischproduktes haben die lebensmittelbedingten Krankheitserreger Koagulase-positive Staphylokokken und *L. monocytogenes* zudem besondere Bedeutung, da sie nicht nur als wichtige Zoonoseerreger gelten, sondern auch als Indikatorkeime für unsachgemäße Prozessdurchführung während der Zerlegung und Verarbeitung in der industriellen Fleischproduktion dienen (DESMARCHELIER et al. 1999; CHASSEIGNAUX et al. 2002; PECCIO et al. 2003). In Bezug auf die Kontamination mit Koagulase-positiven Staphylokokken und *L. monocytogenes*, konnte in Untersuchungen von DEUTZ et al. (2000) und von VAN der MERWE et al. (2013) nachgewiesen werden, dass eine sachgerechte und hygienische Bearbeitung von Tierkörpern im direkten Zusammenhang mit einer niedrigen Nachweisrate dieser Krankheitserreger im Wildfleisch steht.

#### **5.1.2.1 Koagulase-positive Staphylokokken und *Listeria monocytogenes***

Die hier erhobenen Prävalenzen von Koagulase-positiven Staphylokokken und *L. monocytogenes* entsprechen den in anderen Studien ermittelten Ergebnissen zu verpacktem Wildfleisch und übertrafen die Werte, die für unbearbeitete Wildtierkörper veröffentlicht wurden. Die Prävalenz Koagulase-positiver Staphylokokken lag in der vorliegenden Untersuchung mit 10,6% auf vergleichbarem Niveau mit den Ergebnissen von Studien über Wildbret aus dem Handel. SARKIS et al. (2003) und TÜRCK (2008) ermittelten Prävalenzen zwischen 10,2% und 11% in vermarkteten Wildfleischprodukten. Hingegen zeigten die Untersuchungen von ZIEGENFUSS (2003), MAAHS (2010) und STÜBER (2012) niedrigere Nachweisraten bei frisch erlegten bzw. kühlgelagerten Tieren (zwischen 1,0% und 7,1%). Eine ähnliche Tendenz wurde bei der Nachweisrate von *L. monocytogenes* in Wildfleisch ermittelt. Während die Häufigkeiten in früheren Stadien der Wildfleischproduktion (vor Zerlegung der Tierkörper) von 0% bis zu 7,0% variierten (DEUTZ et al. 2000; PAULSEN u. WINKELMAYER 2004; APELT 2007; AVAGNINA et al. 2012; OBWEGESER et al. 2012), belegten die Untersuchungen von JAKSIC et al. (2003) und TÜRCK (2008) eine höhere

Nachweisrate (12,5% - 20,6%) für vermarktetes Wildfleisch. Die Resultate von Wildfleisch auf Handelsebene waren vergleichbar mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit (15,4%). In der Literatur wird beschrieben, dass die Kontamination von Fleisch mit *Staphylococcus aureus* und *L. monocytogenes* während der späteren Behandlungsstufen der Herstellung (wie z.B. Entbeinung, Grob- und Kleinzerlegung, Zerkleinerung) vermehrt nachweisbar ist (PHILLIPS et al. 2008; LUNING et al. 2011). Die Unterschiede in der Nachweishäufigkeit von Koagulase-positiven Staphylokokken sowie *L. monocytogenes* zwischen verpacktem Wildfleisch und frisch erlegten Tieren könnten infolgedessen auf sekundäre Verunreinigung während der weiteren technologischen Behandlung bis zum Verpacken zurückgeführt werden.

Bezüglich der Prävalenz von Koagulase-positiven Staphylokokken und *L. monocytogenes* bei den einzelnen Tierarten wurde in dieser Untersuchung beobachtet, dass Fleischproben von Rotwild und Wildschweinen im Vergleich zu den Proben von Rehwildfleisch signifikant höhere *L. monocytogenes*-Prävalenzen aufwiesen. Zudem war das Vorkommen von Staphylokokken bei Wildschweinfleisch signifikant höher als bei den Fleischproben von Rehwild. KANAI et al (1997), JAKSIC et al. (2003) und TÜRCK (2008) ermittelten in Proben aus dem Handel ebenfalls ein häufigeres Vorkommen von *L. monocytogenes* bei Wildschweinfleisch (23,7%, 23,5% bzw. 18,8%) als bei Rotwildfleisch (16,7%, 5,3% bzw. 10,2%). Bezüglich der Prävalenz von Staphylokokken konnten in der Untersuchung von TÜRCK (2008) keine signifikanten Unterschiede für die einzelnen Wildtierarten festgestellt werden (Rehwild 11,4%, Rotwild 10,2% und Wildschwein 10,3%). KOBE u. RING (1992) ermittelten hingegen eine höhere Nachweisrate von Staphylokokken in handelsüblichem Rehwildfleisch (30,8%), als in Fleischproben von handelsüblichem Rot- (9,1%) und Schwarzwild (0,0%). In Arbeiten über den Hygienestatus von frisch erlegtem Wild konnten auch tierbedingte Unterschiede in der Nachweisrate dieser Krankheitserreger beobachtet werden. APELT (2007) wies bei 5,5% der Wildschweinfleischproben Koagulase-positive *Staphylococcus aureus* nach, während die Prävalenz dieses Keims in den Proben von Reh- und Rotwildfleisch 2,9% bzw. 3,9% betrug. Bezüglich des Vorkommens von *L. monocytogenes* zeigten die Ergebnisse von APELT (2007) und STÜBER (2012) ein vermehrtes Auftreten von *L. monocytogenes* bei Wildtierkörpern von Wildschweinen (7,5% bzw. 7,8%) als bei frisch erlegten Wildwiederkäuern (0,0% - 1,0%). *Staphylococcus aureus* und *L. monocytogenes* kommen häufig als physiologische Komponente der Haut bzw. des



Darmes verschiedener Tierarten vor (WACHECK et al. 2010; OBWEGESER et al. 2012; SASAKI et al. 2013; MEYER et al. 2014). Es ist dementsprechend wahrscheinlich, dass sich Tierart-spezifische Faktoren (wie z.B. Körperbau, Verhaltensweise), ebenso wie für andere Hygieneparameter (Gehalt an *E. coli*) bereits thematisiert (vgl. oben, 5.1.1.2), auf das Vorkommen von Staphylokokken sowie Listerien im hier untersuchten Probenmaterial ausgewirkt haben. Obwohl eine Kontamination des Fleisches mit diesen pathogenen Erregern bei der Verarbeitung häufiger auftritt (DESMARCHELIER et al. 1999; CHASSEIGNAUX et al. 2002; PECCIO et al. 2003), sollte der Einfluss der Ausgangskeimbelastung der Wildtierkörper auf ihre Prävalenz in verpacktem Wildfleisch keinesfalls unterschätzt werden.

#### 5.1.2.2 *Salmonella* spp.

Das Vorkommen von *Salmonella* spp. war in dieser Untersuchung niedrig (2,1%). Die Ergebnisse entsprachen den Angaben anderer Autoren, welche in Untersuchungen von frischen Wildtierkörpern oder verpackten Wildfleischprodukten nicht oder nur in Einzelfällen Salmonellen nachweisen konnten (KOBE u. RING 1992; KANAI et al. 1997; DEUTZ et al. 2000; PAULSEN et al. 2003; ATANASSOVA et al. 2008; PAULSEN et al. 2011; AVAGNINA et al. 2012; OBWEGESER et al. 2012; VAN der WERME et al. 2013). In der Zoonosenerhebung aus dem Jahr 2012 wurde für deutsche Wildfleischplanproben eine Prävalenz von 3,8% ermittelt (HARTUNG u. KÄSBOHRER 2013). Die Nachweisrate für *Salmonella* spp. in Planproben von Geflügel-, Rind-, und Schweinefleisch lag im gleichen Zeitraum bei 5,8%, 0,2% bzw. 2,6%. Die in deutschen Fleischproben ermittelten Prävalenzen stimmten ferner mit den Ergebnissen aus Studien in anderen Ländern überein. Auf der Ebene der Vermarktung kommt *Salmonella* spp. tendenziell häufiger bei frischem Geflügelfleisch (0,0% - 31,0%) vor, als bei Frischfleisch von Schwein (0,0% - 9,6%) oder Rind (0,0% - 1,1%) (DUFFY et al. 2001; BOHAYCHUCK et al., 2006; CHRYSTAL et al. 2008; PRENDERGAST et al. 2009; PHILLIPS et al. 2008; MADDEN et al. 2011; COOK et al. 2012; VIPHAM et al. 2012). Die Ergebnisse der letztgenannten Arbeiten und der eigenen Untersuchung deuten darauf hin, dass die Prävalenz von Salmonellen in verpacktem Wildfleisch, vergleichbar mit dem Vorkommen dieser potentiellen Krankheitserreger in vermarkteten Fleischprodukten von schlachtbaren Nutztieren ist, bzw. niedriger als in Geflügelfleisch. Die Rolle, die der Wildfleischverzehr bei der Epidemiologie

lebensmittelbedingter *Salmonella*-Infektionen spielen könnte, ist dementsprechend vergleichbar mit der epidemiologischen Rolle von Fleischprodukten schlachtbarer Nutztiere.

In Bezug auf das Vorkommen von Salmonellen bei den einzelnen Tierarten fällt auf, dass die positiv getesteten Proben hier ausschließlich von Wildschweinfleisch stammten. In den Studien von KOBE u. RING (1992) und TÜRCK (2008) konnte nur bei einer Fleischprobe von Wildschweinfleisch aus dem Handel bzw. ausländischer Herkunft *Salmonella* spp. nachgewiesen werden. Auch bei der deutschen Planprobeuntersuchung im 2012 wurden Salmonellen lediglich aus Wildschweinfleisch isoliert (HARTUNG u. KÄSBOHRER 2013). Ähnliche Tendenzen wurden von DÍAZ-SÁNCHEZ et al (2013) in frisch erlegten Wildtieren ermittelt. In dieser Studie, die insgesamt 585 Fleisch- und 574 Kotproben verschiedener Wildtierarten umfasste, konnte *Salmonella* spp. in 4 Fleischproben von Schwarz- und einer Fleischprobe von Rotwild nachgewiesen werden. Bei einem der positiv getesteten Wildschweinkörper, gelang den Autoren in der Fleischprobe der Nachweis des identischen *Salmonella*-Serotyps wie in der entsprechenden Kotprobe des Tieres, so dass die Kontamination des Fleisches in diesem Fall direkt auf das erlegte Individuum zurückzuführen war. Derartige Beobachtungen zeigen die Rolle des infizierten Tieres als Kontaminationsquelle für das Fleisch. Ein vergleichsweise häufigeres Vorkommen von Salmonellen in Fleischproben von Wildschweinen kann dementsprechend mit der ebenfalls höheren Prävalenz von Salmonellen bei lebenden Wildschweinen (7,5% - 22%), im Vergleich zu Wildwiederkäuern (0,0% - 1,0%), erklärt werden (WAHLSTRÖM et al. 2003; LILLEHAUG et al. 2005; KEMPER et al. 2006; RENTER et al. 2006; WACHECK et al. 2010; VIEIRA-PINTO et al. 2011; ZOTTOLA et al. 2012; SASAKI et al. 2013). Deshalb hat die Vermeidung der Kontamination des Wildschweinkörpers mit Darmbakterien sehr große Bedeutung, um dem Eintrag von *Salmonella* spp. in Wildschweinfleisch wirksam vorzubeugen. Die Erfolgskontrolle präventiver Maßnahmen zur Vermeidung fäkaler Kontamination von vermarktetem Wildschweinfleisch kann durch die quantitative Untersuchung auf *E. coli* erreicht werden, da ein Zusammenhang zwischen hohen Gehalten an *E. coli* und dem erhöhten Vorkommen von *Salmonella* spp. in vermarkten Fleischprodukten besteht (GHAFIR et al. 2008).

## 5.2. Antibiotikaempfindlichkeit der *E. coli*-Isolate aus Wildfleisch

Aufgrund der weitreichenden Folgen, die die Verringerung der Wirksamkeit von Antibiotika bei der Behandlung bakterieller Infektionen hat, ist die mikrobielle Antibiotikaresistenz ein bedeutendes Problem für die menschliche Gesundheit weltweit und bedarf deshalb dringend mehr Aufmerksamkeit als in der Vergangenheit (MOYAERT et al. 2014). Eine der wichtigsten Maßnahmen, die von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) empfohlen wird, ist die Stärkung der Forschungsprojekte, die auf das Monitoring zur Entstehung und Verbreitung von Resistenzen innerhalb der bakteriellen Zoonoseerreger abzielen (WHO 2011). Dabei wird die Untersuchung der Antibiotikaempfindlichkeitsmuster von *E. coli* als adäquater Indikator gesehen, um die Entwicklung von Antibiotikaresistenzen bei kommensalen sowie pathogenen enteralen Mikroorganismen tierischen Ursprungs zu überwachen (CAPRIOLI et al. 2000).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Antibiotikaempfindlichkeit von *E. coli*-Stämmen aus verpacktem Wildfleisch untersucht. Die hier einbezogenen Fleischproben wurden keiner Anreicherung in Medien mit Antibiotikazusatz unterzogen, um allgemeine Informationen über die aktuelle Antibiotikaempfindlichkeitssituation der Bakterien-Populationen zu erhalten. Ein solches Verfahren kann jedoch zur Unterschätzung der Prävalenz bestimmter Resistenzmuster führen (CAPRIOLI et al. 1991). Um der niedrigeren Sensibilität dieser Vorgehensweise bei der Suche unempfindlicher *E. coli*-Stämme entgegenzuwirken, wurden, soweit möglich, jeweils 2 Isolate mit unterschiedlichem biochemischem API 20E-Profil von jeder positiven Probe eingehend auf die Antibiotikaempfindlichkeit untersucht. Ähnliche Methoden wurden bereits von anderen Autoren für die Antibiotikaempfindlichkeitstestung der *E. coli*-Isolate aus verschiedenen Fleischsorten angewendet (MAYRHOFER et al. 2006).

Der gesteigerte Einsatz von Antibiotika in der landwirtschaftlichen Industrie kann die Entwicklung und Verbreitung von Resistenzen in bakteriellen Populationen von Nutztierarten fördern (AARESTRUP u. WEGENER 1999; ANGULO et al. 2004). Der Konsum von Fleischerzeugnissen gilt als Risikoquelle für die Aufnahme resistenter Bakterien tierischen Ursprungs durch der Menschen (WHO 2011). Da frei lebende Wildtiere, im Gegensatz zu den Nutztieren, nicht mit Antibiotika behandelt werden, ist das Vorkommen von resistenten Keimen in Wildfleischprodukten nicht bzw. nur in geringerem Maße zu erwarten. Die hier

vorgestellten Ergebnisse, bezüglich der Antibiotikaempfindlichkeit von *Escherichia coli*-Stämmen aus verpacktem Wildfleisch, bestätigen die niedrige Prävalenz resistenter Keime bei verpacktem Wildfleisch. Es wurden ferner *E. coli*-Stämme isoliert, die einen MHK-Wert gegenüber verschiedenen Antibiotika aufwiesen, der über dem für die empfindliche Wildtyp-Population beschriebenen ECOFF-Wert lag.

Die Gegenüberstellung der Prävalenz unempfindlicher *E. coli*-Isolate von Reh-, Rot- und Schwarzwildfleisch (33,3%, 45,3% bzw. 35,5%) ergab in der vorliegenden Studie keine signifikanten Unterschiede ( $p > 0,05$ ). Im Gegensatz dazu ließen Untersuchungen konventioneller Fleischprodukte tierartbedingte Tendenzen erkennen. In den Vergleichsstudien von MAYRHOFER et al. (2006) und ZHAO et al. (2012) wurden einfache und multiresistente Keime häufiger bei Schweinefleischprodukten gefunden als bei Geflügel- oder Rindfleischproben. Ähnliche Untersuchungen zeigten die höchsten Nachweishäufigkeiten von Resistenzen bei Isolaten aus Geflügelfleisch und die niedrigsten bei denen aus Rindfleisch (GUERRA et al. 2003; KOO u. WOO 2012; SCHWAIGER et al. 2012). Diese Studien legen nahe, dass die Resistenzraten abhängig von den ursprünglichen Fleischtierarten variieren und dass die Häufigkeiten von Resistenzen auf das antibiotische Behandlungsschema der jeweiligen Tierbestände zurückgeführt werden können. Auch die erhobenen Resistenzphänotypen standen laut MAYRHOFER et al. (2006) in Beziehung mit den angewendeten antimikrobiellen Wirkstoffen. Die Beobachtungen von MIRANDA et al. (2008, 2009 b) und KOLA et al. (2012) bestätigten den Einfluss der Tierhaltungsart und des Behandlungsschemas auf den Resistenzstatus der Isolate aus verpackten Produkten von Rind und Geflügel. Hierbei wurden niedrigere Resistenzraten bei Bakterien, die aus Handelsfleisch ökologischer Herstellung isoliert wurden, im Vergleich zu den konventionell hergestellten Produkten nachgewiesen. Ferner tendieren die unempfindlichen *E. coli*-Isolate aus konventionellem Fleisch häufiger dazu, Mehrfachresistenzen aufzuweisen, als die Isolate aus ökologisch hergestelltem Fleisch (MIRANDA et al. 2008). Die im allgemeinen ähnlichen Nachweishäufigkeiten unempfindlicher *E. coli*-Populationen bei den hier untersuchten Wildfleischsorten könnten dementsprechend gleiche Ursachen haben, da diese Tiere einen ähnlichen und teilweise gemeinsamen Lebensraum haben.

In der eigenen Untersuchung zeigten 38,0% der untersuchten *E. coli*-Isolate aus Wildfleischproben Antibiotikaresistenz oder einen erhöhten MHK-Wert gegenüber mindestens einem Antibiotikum. In der Literatur finden sich verschiedene Angaben über die Resistenzhäufigkeit bei *E. coli*-Isolaten aus Wildfleischkörpern. Während LI et al. (2007) Resistenzen gegenüber mindestens einem Antibiotikum in 16,7% der *E. coli*-Stämme ermittelten, die aus Bison-Schlachttierkörpern in einem amerikanischen Wildverarbeitungsbetrieb isoliert wurden, konnten MAYRHOFER et al. (2006) in Österreich nur bei einem *E. coli*-Isolat, aus 100 Proben von Rehwildkörpern, Antibiotikaresistenz nachweisen. Die *E. coli*-Isolate, deren MHK-Wert über den für Cefaclor beschriebenen ECOFF-Wert ( $\leq 4 \mu\text{g/ml}$ ) lag, machten eine große Zahl der Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung aus. Die MHK-Werte von 88,2% der Isolate mit einfach verringerter Empfindlichkeit und 81,8% der Isolate mit mehrfachem Unempfindlichkeitsmuster erwiesen sich als unempfindlich gegenüber Cefaclor. Dieser Wirkstoff wurde von MAYRHOFER et al. (2006) und LI et al. (2007) nicht überprüft, welches eine direkte Gegenüberstellung der gesamten Unempfindlichkeitsraten erschwert. In einer anderen Untersuchung wurden *E. coli*-Isolate aus Fleischproben von frisch geschlachtetem und vermarktetem Geflügel sowie Schweinen ebenfalls auf die Empfindlichkeit gegenüber Cefaclor getestet (SCHWAIGER et al. 2012). Bei den Resistenzraten der Fleischproben letztgenannter Studie, zeigten maximal 16,2% der überprüften Isolate MHK-Werte über  $4 \mu\text{g/ml}$ .

Der antibiotische Wirkstoff Cefaclor gehört zur Gruppe der Cephalosporine der zweiten Generation und zählt zu den am häufigsten eingesetzten Antibiotikasubstanzen europaweit. Dieses Antibiotikum wird zur Behandlung von akuten und chronischen bakteriellen Infektionen verabreicht (COENEN et al. 2006). Die Unempfindlichkeit von Enterobakterien gegenüber Cefaclor, sowie gegenüber anderen  $\beta$ -Laktam-Antibiotika, wird zumeist mit der Aktivität der Enzyme, den sogenannten „Extended Spectrum Beta-Lactamases“ (ESBL), in Zusammenhang gebracht (LIVERMORE et al. 2001). Die Bildung dieser Enzyme gelingt *E. coli*-Populationen durch die Kodierung von Gensequenzen, die meistens durch horizontale Übertragung erworben wurden (JACOBY 1997). Die Analyse der MHK-Werte, mit Hilfe der ECOFF-Werte, ermöglicht die Erkennung von Bakterienpopulationen, die erworbene Resistenzeigenschaften tragen könnten (KAHLMETER et al. 2003). Nach der Interpretation des gesamten phänotypischen Empfindlichkeitsmusters, ist bei der Mehrzahl der auffälligen

Isolate dieser Studie jedoch das Vorhandensein einer übertragbaren Breitspektrum  $\beta$ -Laktamase auszuschließen (LIVERMORE et al. 2001): Für 93% dieser Isolate wurde keine gleichzeitige Resistenz oder erhöhte MHK-Werte gegenüber weiteren  $\beta$ -Laktam-Antibiotika festgestellt. Dieser Befund legt die Vermutung nahe, dass eigene intrinsische Mechanismen der untersuchten *E. coli*-Isolate (z.B. Veränderung der Zelldurchlässigkeit, aktive Austreibung der antibiotischen Moleküle), welche die Anpassung in Medien mit Konzentrationen bis zu 4  $\mu\text{g/ml}$  von Cefaclor schaffen könnten, für die hier feststellbare Unempfindlichkeit gegenüber diesem antimikrobiellen Wirkstoff verantwortlich waren. Ähnliche Ergebnisse wurden von KÄLLMAN et al. (2003) für den Wirkstoff Cefuroxim bei klinischen *E. coli*-Isolaten bereits beschrieben.

Ein erhöhter MHK-Wert gegenüber Doxycyclin, einem Antibiotikum aus der Klasse der Tetracycline, einzeln oder in Kombination mit anderen phänotypischen Unempfindlichkeitsmustern, wurde bei 9 von 229 *E.coli*-Isolaten nachgewiesen (3,9%) und war somit das am zweithäufigsten vorkommende Unempfindlichkeitsmuster in der vorliegenden Studie. Mit einer Nachweisrate von 13,0%, war der Anteil Tetracyclin-resistenter *E. coli*-Isolate aus Bisonschlachtkörpern (LI et al. 2007), höher als die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung. Die phänotypischen Resistenzen gegen Tetracyclin und Doxycyclin zählen zu den Empfindlichkeitsmustern, die am häufigsten bei *Enterobacteriaceae* aus traditionellen Fleischprodukten nachgewiesen werden (MAYRHOFER et al. 2006; KOO u. WOO 2012, ZHAO et al. 2012). Resistenzen gegen Tetracyclin konnten MAYRHOFER et al. (2006) in 231 von den 445 (51,9%) kommensalen *E. coli*-Isolaten, aus österreichischen Fleischproben verschiedener Nutztierarten nachweisen. Die Untersuchungen an traditionellen Fleischprodukten aus dem Einzelhandel von KOO u. WOO (2012) in Korea und ZHAO et al. (2012) in den USA ergaben Häufigkeiten von Tetracyclin-Resistenz bei *E. coli*, die zwischen 48,3% und 74,7% variierten. Über das Vorkommen von unempfindlichen *E. coli*-Isolaten gegenüber Doxycyclin in konventionellen Fleischprodukten wurden verschiedene Daten publiziert: MIRANDA et al. (2008, 2009 b) berichteten von Prävalenzen zwischen 17,2% und 28,7% bzw. 41,8% und 51,8% bei verpackten Rindfleisch- und Geflügelfleischprodukten aus spanischen Supermärkten und Fleischereien. In Deutschland zeigten 36,4% und 40,7% der *E. coli*-Stämme, die aus

vermarktetem Schweine- sowie Geflügelfleisch isoliert wurden, MHK-Werte über 4 µg/ml (SCHWAIGER et al. 2012).

Die phänotypische Resistenz gegenüber den Tetracyclinen bei *Enterobacteriaceae* liefert Hinweise auf die Aktivität der Resistenzmechanismen, kodiert aus der Familie der sogenannten *tet*-Gene (LIVERMORE et al. 2001). Die Resistenz gegen Doxycylin wird besonders mit dem Vorhandensein der übertragbaren Gene *tet(A)* und *tet(B)*, in den resistenten Isolaten von Menschen und Tieren, in Zusammenhang gebracht (SCHWAIGER et al. 2010; KOO u. WOO 2011). Diese genetischen Sequenzen werden auch am häufigsten bei Tetracyclin-resistenten, enteralen Keimen gefunden (BRYAN et al. 2004). In der vorliegenden Studie erwiesen sich die Mehrzahl der *E. coli*-Isolate, die eine verminderte Empfindlichkeit gegenüber Doxycylin und anderen Antibiotika zeigten, ebenfalls als resistent gegenüber Chloramphenicol. Diese Beobachtung legt nahe, dass erworbene Resistenzeigenschaften zumindest für einen Teil der vorliegenden Ergebnisse verantwortlich sein könnten, da die Verbreitung von Chloramphenicol-Resistenz zwischen unterschiedlichen Bakterien durch Co-Selektion von Resistenzgenen (z.B. *tet*-Gene) erfolgen kann. Diese befinden sich häufig gemeinsam auf mobilen, genetischen Elementen (TRAVIS et al. 2006).

In der vorliegenden Arbeit wurden bei 2,2% der überprüften *E. coli*-Isolate eine Resistenz gegenüber Ampicillin, einzeln oder in Kombination, nachgewiesen. Diese Ergebnisse stimmten mit denen von MAYRHOFER et al. (2006) und LI et al. (2007), bei *E. coli*-Isolaten aus Bison- und Rehschlachtkörpern (1,5% bzw. 1,3%), überein. Die Resistenz gegenüber Ampicillin ist eine von den wichtigsten Befunden bei traditionellen Fleischprodukten, wobei verschiedene Nachweishäufigkeiten in der Literatur angegeben werden. MIRANDA et al. (2008, 2009 b) konnten Resistenzraten bei *E. coli*-Isolaten, aus traditionell- sowie ökologisch hergestellten Rinder- und Geflügelprodukten nachweisen, die zwischen 21,9% und 53,9%, lagen. In den Untersuchungen von MAYRHOFER et al. (2006) und KOO u. WOO (2012) variierte das Vorkommen resistenter Keime, isoliert aus Rinder-, Schweine- und Geflügelfleisch, zwischen 8,0% und 30,0% bzw. 27,0% und 57,1%. In Deutschland gelang SCHWAIGER et al. (2012) der Nachweis Ampicillin-resistenter *E. coli* bei Geflügel- und Schweineschlachtkörpern in 43,2% bzw. 23,2% und in 46,1% bzw. 22,7% vermarkteter Fleischprodukte dieser Tierarten. Bei der Analyse von amerikanischen Fleischproben von

Geflügel, Rind und Schwein in dem Zeitraum von 2002 bis 2008, ermittelten ZHAO et al. (2012) Resistenzraten, die zwischen 18,3% und 28,3% lagen.

In der Literatur wird die Resistenz gegen Ampicillin überwiegend in Kombination mit Resistenzen oder verringerter Empfindlichkeit gegenüber mehreren Wirkstoffen der Gruppe der  $\beta$ -Laktame beschrieben (LIVERMORE et al. 2001). In den eigenen Untersuchungen konnte lediglich ein *E. coli*-Stamm isoliert werden (0,4% der gesamten Zahl), der zusätzlich Unempfindlichkeit gegenüber mehreren  $\beta$ -Laktam-Antibiotika zeigte, aber empfindlich gegenüber Cefoxitin war. Bei *E. coli* weisen solche phänotypischen Resistenzmuster sehr häufig auf das Vorhandensein von genetischen Sequenzen hin, die die Bildung der Enzyme ESBL ermöglichen (PATERSON u. BONOMO 2005). Mittels dieser Enzyme gelingt dem Bakterium die Hydrolyse des  $\beta$ -Laktam-Rings und somit die Deaktivierung der antimikrobiellen Wirkung der  $\beta$ -Laktam-Antibiotika (WALEY 1987). Für die Bildung von  $\beta$ -Laktamasen sind verschiedene, erworbene Gene verantwortlich, von welchen die so genannten ESBL der Gruppe *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> und *bla*<sub>CTX-M</sub> bei *E. coli*-Isolaten aus Handelsfleisch am häufigsten nachgewiesen werden (DHANJI et al. 2010; HIROI et al. 2011; KOLA et al. 2012; SHEIKH et al. 2012). Verschiedene Arbeiten haben über das Vorhandensein von ESBL-Produzenten im Darminhalt jagdbarer Wildtiere in Europa berichtet, jedoch in niedrigen Prävalenzen als bei Nutztieren (COSTA et al. 2006; LITERAK et al. 2010; STEPHAN u. HÄCHLER 2012). Bei den multiresistenten Isolaten letztgenannter Studien wurde das Vorhandensein der Gensequenzen *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> und *bla*<sub>CTX-M</sub> ebenfalls nachgewiesen. Obwohl diese Daten die Annahme unterstützen, dass der hier isolierte, multiresistente *E. coli*-Stamm ursprünglich vom erlegten Tier stammte, sind weitere Schlussfolgerungen über den Ursprung dieses Stammes nur mit Vorsicht zu ziehen. Angaben in der Literatur über die verschiedenen potenziellen Kontaminationsquellen von resistenten Keimen, entlang der Produktionskette traditioneller Fleischprodukte (z.B. durch Geräte, Bearbeitungsbetriebsmitarbeiter, usw.), lassen eine sekundäre Kontamination in späteren Prozessstufen nicht ausschließen (ASLAM et al. 2004; SCHWAIGER et al. 2012). Das Monitoring der Entwicklung von Antibiotikaresistenzen in Wildfleisch ist, aufgrund der Ausbreitung von resistenten Mikroorganismen in jagdbaren Wildtierpopulationen und der eigenen Ergebnisse, weiter von Bedeutung.



### **5.3. Charakterisierung von *E. coli*-Isolaten aus verpacktem Wildfleisch**

#### ***5.3.1 Biochemische Charakterisierung von bei Wildfleisch vorkommenden E. coli-Populationen anhand der API 20E- Profile***

In dieser Untersuchung wurden 229 *E. coli*-Isolate aus 129 Wildfleischproben, die positiv auf *E. coli* getestet wurden, eingehend untersucht. Durch die Untersuchung mittels des API 20E-Systems war es möglich, alle *E. coli*-Isolate zu bestätigen. Die hier untersuchten *E. coli*-Isolate konnten in insgesamt 29 verschiedene API 20E-Profilen eingeteilt werden. Das Profil 5144572 wurde hierbei mit einem Vorkommen von 38,4% am häufigsten im Fleisch aller untersuchten Tierarten nachgewiesen. In anderen Studien von klinischen *E. coli*-Isolaten von Menschen und Tieren wurde dieses API 20E-Profil ebenfalls häufig nachgewiesen. In Übereinstimmung mit der vorliegenden Untersuchung wiesen 31,4% der *E. coli*-Isolate aus Kotproben verschiedener Tierarten das Profil 5144572 auf (GODBOUT-DELASALLE u. HIGGINS 1986). In Studien von *E. coli*-Isolaten aus Harnwegsinfektionen des Menschen wurde das API 20E-Profil 5144572 mit Prävalenzen von 39,1% am häufigsten oder von 19% bzw. 21% am zweithäufigsten nachgewiesen (DAVIES 1977; GARGAN et al. 1982; CAGNACCI et al. 2008). Trotz der hohen Prävalenz des Profils 5144572 dieser Studien und vorliegender Arbeit kann ein direkter Vergleich nicht durchgeführt werden. In den letztgenannten Studien wurden ausschließlich Isolate von erkrankten Menschen und Tieren für die biochemische Zuordnung einbezogen. Im Gegensatz dazu stammten die hier untersuchten *E. coli*-Isolate aus verpackten Wildfleischproben von gesunden Tieren. Bisher wurden keine wissenschaftlichen Daten über die Stoffwechseleigenschaften von *E. coli*-Populationen aus dem Fleisch von Nutz- oder Wildtieren veröffentlicht.

Über das Pathogenitätspotential der *E. coli*-Populationen, ermittelte DAVIES (1977) die Tendenz, spezifische API 20E-Profile bei *E. coli*-Isolaten aus Harnwegsinfektionen häufiger nachzuweisen. Andere Autoren konnten hingegen keine Beziehung zwischen dem biochemischen Profil und dem einhergegangenen Krankheitsbild bei Menschen oder Tieren bestätigen (SILVA et al. 1980; GODBOUT-DELASALLE u. HIGGINS 1986). Im Jahr 2011 veröffentlichte EGGERT (2011) die Ergebnisse von Untersuchungen über das Vorhandensein von STEC bei Kotproben von Rot- ( $n=30$ ) und Rehwild ( $n=30$ ) in Bayern. In dieser Studie wurde die von den STEC-Stämmen aufgewiesenen API 20E-Profile zu der Information über

die Prävalenz dieser Krankheitserreger bei den Tieren zusammengefügt. Von den STEC-Isolaten von Rot- ( $n=16$ ) und Rehwild ( $n=11$ ) zeigten ein bzw. zwei Isolate das Profil 5144572. Dabei wiesen STEC-Isolate aus Rotwildkotproben am häufigsten die API 20E-Profile 5044572 (4/16) und 5044772 (4/16) auf, während die Profile 5144572, 5144562 und 1144752 bei jeweils zwei STEC-Isolaten aus Rehwildkotproben nachgewiesen wurden. Im Vergleich zu den Ergebnissen vorliegender Studie, ist es interessant zu beobachten, dass API 20E-Profile, die bei Wildfleischproben am häufigsten vorkamen (wie z.B. 5144572), bei den STEC-Stämmen unterrepräsentiert waren. Nur das Vorkommen des Profils 5044572 schien in beiden Studien vergleichbar zu sein. Ferner wurden die von EGGERT (2011) am häufigsten ermittelten Profilen bei vorliegender Untersuchung nicht (1144752) oder nur selten (5144562 und 5044772) nachgewiesen. GARCIA et al. (2002) stellten API 20E-Profile der EHEC-Stämme, die aus erkrankten Kaninchen isoliert wurden, den Profilen von *E. coli*-Isolaten gesunder Tiere gegenüber. Dabei beobachteten die Autoren, dass die EHEC-Stämme unterschiedliche Profile aufwiesen (5144162 und 5144552) im Vergleich zu den kommensal vorkommenden *E. coli*-Isolaten (5144572). Wildfleisch kann, nach Angaben des Bundesministeriums für Risikobewertung (BfR), in der Epidemiologie von verotoxinbildenden *E. coli*-Stämmen eine wichtige Rolle spielen (HARTUNG u. KÄSBOHRER 2013). Dennoch ist die vorliegende Information noch unzureichend, um weitere Schlüsse über das Pathogenitätspotential der hier untersuchten Isolate zu ziehen. Die Nützlichkeit der API 20E-Profile zur schnellen Erkennung potentiell pathogener *E. coli*-Stämme bei Wildfleisch ist, aufgrund der eigenen Ergebnisse sowie der Angaben der o.g. Autoren, weiter zu untersuchen.

### **5.3.2 Charakterisierung von *E. coli*-Isolaten mit unterschiedlichen**

#### ***Unempfindlichkeitsmustern***

Bezüglich des Vorkommens von API 20E-Profilen bei unempfindlichen *E. coli*-Isolaten wurden die Profile 5144572 (55,2%), 5144552 (18,4%), 5044552 (6,9%) und 5044572 (3,4%) in der vorliegenden Studie am häufigsten nachgewiesen und waren somit zu der gesamten Stichprobe vergleichbar. Diese Beobachtung legt nahe, dass keine Zusammenhänge zwischen den Stoffwechseleigenschaften eines *E. coli*-Stammes und einem bestimmten Unempfindlichkeitsmuster besteht, sowie ebenfalls von GODBOUT-DELASALLE u.

HIGGINS (1986) und GRIBBEL et al. (2012) ermittelt. Diese Autoren konnten keine Korrelation zwischen dem biochemischen Profil verschiedener *E. coli*-Stämme aus klinischen Proben und einem bestimmten Resistenzmuster nachweisen. Im Gegensatz dazu, ermittelte CAPRIOLI et al. (1991), dass resistente *E. coli*-Isolate, aus Kotproben gesunder Wildtiere, die gleichen API 20E-Profile zeigten. Die entsprechenden Profile wurden jedoch von den letztgenannten Autoren nicht veröffentlicht.

Bezüglich der phylogenetischen Zugehörigkeit wurden die resistenten *E. coli*-Isolate und jene Isolate, die eine verringerte Empfindlichkeit gegenüber verschiedenen Antibiotika aufwiesen, im Rahmen der vorliegenden Arbeit den 4 Phylogruppen beinahe gleichmäßig zugeordnet. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass kein Zusammenhang zwischen dem Unempfindlichkeitsmuster der *E. coli*-Isolate und der phylogenetischen Zugehörigkeit bestand. Eine Ausnahme bildeten die Stämme mit erhöhtem MHK-Wert gegenüber Cefaclor, welche überwiegend einer phylogenetischen Gruppe angehörten (70,7% der Phylogruppe B1). Die Ergebnisse der Phylotypisierung entsprechen der Beobachtung, die bei der Analyse der API 20E-Profile der untersuchten Isolate gemacht wurde, sie zeigen, dass ein bestimmtes Unempfindlichkeitsmuster bei *E. coli*-Populationen unabhängig von der phylogenetischen Zugehörigkeit vorkommt. Diese Annahme gilt im Falle des Vorhandenseins erworbener Resistenzeigenschaften. In den Studien von HANNAH et al. (2009), JOHNSON et al. (2009) und JAKOBSEN et al. (2010 a) an *E. coli*-Stämmen isoliert aus Geflügel-, Rind- und Schweinefleischprodukten, hingen die Zugehörigkeit zu einer bestimmten Phylogruppe mit dem Grad der Unempfindlichkeit des jeweiligen untersuchten Isolates (einfach- oder multiresistent) zusammen. Die ermittelten Zusammenhänge dieser Studien variierten dennoch je nach Herkunft der Isolate, so dass andere Faktoren, wie beispielsweise die antibiotische Therapie des lebensmittelliefernden Tieres, einen größeren Einfluss auf die Prävalenz unempfindlicher Keime sowie bestimmter Resistenzmuster haben könnte, als die phylogenetische Grundlage der auf dem Fleisch vorhandenen *E. coli*-Populationen (JOHNSON et al. 2009).

Bezüglich der Verteilung der *E. coli*-Populationen in den phylogenetischen Hauptgruppen, entsprachen die vorliegende Ergebnisse zum Teil den Angaben von Studien an *E. coli*-Stämmen, isoliert aus traditionellen Fleischarten. In dieser Studie wurden überwiegend die *E.*

*coli*-Isolate der Phylogruppe B1 (66,7%) zugeordnet. Des Weiteren zählten 19,5%, 8,1% und 5,8% der Isolate zu den phylogenetischen Gruppen A, D bzw. B2. In der Untersuchung von JOHNSON et al. (2009) gehörten die *E. coli*-Populationen, isoliert aus vermarkteten Rind- und Schweinefleischprodukten überwiegend zur Phylogruppe B1 (50%) bzw. A (51%). Die Gruppen A, D und B2 wurden in dieser Studie ebenfalls bei Rindfleisch nachgewiesen (35%, 12% bzw. 3%), während die übrigen 49% der Isolate aus Schweinefleisch ausschließlich zur Phylogruppe B1 gehörten. *E. coli*-Stämme, isoliert aus dänischem Schweinefleisch direkt aus dem Handel, wurden den phylogenetischen Gruppen A (32%), B1 (29%), B2 (16%) und D (7%) zugeordnet (JAKOBSEN et al. 2010 a). Dabei konnten 16% der untersuchten Isolate nicht charakterisiert werden. HANNAH et al. (2009) teilten in ihrer Studie zur Charakterisierung von *E. coli* aus Geflügel- und Rindfleisch die Stämme den phylogenetischen Gruppen A (40%), D (34%), B1 (17%) und B2 (9%) zu. Die Häufigkeit, mit der die, aus Menschen oder Tieren isolierten, *E. coli*-Populationen einer spezifischen Phylogruppe zugeordnet werden, wird von Faktoren, wie z.B. die Ernährungsgewohnheiten sowie Habitat des Wirtorganismus, beeinflusst (GORDON u. COWLING 2003; ESCOBAR-PÁRAMO et al. 2004). Die anatomische Lokalisation, aus welcher die Isolierung erfolgte, spielt ebenfalls bei der Nachweisrate bestimmter *E. coli*-Phylogruppe eine Rolle (HIGGINS et al. 2007; SCHIERACK et al. 2009). In der vorliegenden Arbeit wurden nur geringe Unterschiede bei der Nachweishäufigkeit einzelner phylogenetischer Gruppe für die unterschiedlichen Tierarten nachgewiesen. Die Ähnlichkeiten könnten, entsprechend den vorab genannten Studien, auf ähnliche Prävalenzen der *E. coli*-Phylogruppe bei den verschiedenen Tierarten zurückgeführt werden. In der Studie von SCHIERACK et al. (2009) an *E. coli*-Stämmen aus Darminhaltproben von Wildschweinen, zeigten diese allerdings ein niedrigeres Vorkommen von der Phylogruppe B1 (10,4% - 25,9%), im Vergleich zu der eigenen Untersuchung (66,7%). Demnach ist es wahrscheinlich, dass verschiedene Faktoren, die entlang des Prozesses von der Erlegung des Tieres bis zur Gefrierlagerung oder während der Lagerung auftreten, eine zusätzliche Rolle bei der Nachweishäufigkeit spezifischer *E. coli*-Phylogruppen auf Wildfleischprodukten gespielt haben. Das Überleben und das Wachstum der auf dem Fleisch vorhandenen Bakterien kann in unterschiedlicher Weise von Faktoren, wie beispielsweise Lagerungstemperatur oder der Art der Mikroorganismen, aus welcher die Fleischmikroflora besteht, beeinflusst werden (DE FILLIPIS et al. 2013).

Die Ergebnisse phylogenetischer Untersuchungen an *E. coli*-Isolaten von erkrankten Menschen zeigten, dass eine Korrelation zwischen dem Vorhandensein von Virulenzfaktoren und einer spezifischen phylogenetischen Zugehörigkeit besteht. Beispielsweise werden die sogenannten ExPEC, die durch spezifische genetische Eigenschaften zu verschiedenen Krankheiten außerhalb des intestinalen Traktes beim Menschen führen können (z.B. Harnwegsinfektionen, Sepsis, usw.), häufiger der Phylogruppe B2 zugeordnet (JOHNSON u. RUSSO 2002; MAYNARD et al. 2004; FRÖMMEL et al. 2013). Ferner gehören wichtige, potentielle Erreger intestinaler Erkrankungen beim Menschen, wie beispielsweise STEC und EPEC, häufig zur phylogenetischen Gruppe B1 (ISHII, et al. 2007; MORA et al. 2012).

Bezüglich des Pathogenitätspotentials, der bei Fleischprodukten vorkommenden *E. coli*-Populationen, nimmt die Identifizierung von *E. coli*-Stämmen, auch mit Hilfe der Phylotypisierung, an Bedeutung zu. Die genetischen Sequenzen, die die Pathogenitätsfaktoren der von Menschen isolierten ExPEC-Stämme in hohem Grad ähneln, werden ebenfalls bei *E. coli*-Isolaten der Phylogruppe B2 aus Fleischprodukten verschiedener Tierarten nachgewiesen (JOHNSON et al. 2005; JAKOBSEN et al. 2010 b; XIA et al. 2011). Epidemiologische Studien stützen die Annahme, dass Fleischprodukten als Quelle von ExPEC-Stämmen, für die Fleischkonsumenten, dienen können (MANGES et al. 2007; HANNAH et al. 2009; JAKOBSEN et al. 2010 a). Die hier ermittelte Prävalenz der phylogenetischen Gruppe B2 lag mit 5,8% zwischen den Angaben anderer Studien zum Fleisch traditioneller Nutztierarten (3,0% und 16%) (HANNAH et al. 2009; JOHNSON et al. 2009; JAKOBSEN et al. 2010 a). Zurzeit gibt es keine wissenschaftlichen Angaben über den Ähnlichkeitsgrad der aus Wildfleisch isolierten *E. coli*-Stämme der Phylogruppe B2 und dem ExPEC von Menschen. Aufgrund dessen können keine weiteren Schlüsse über das extraintestinale Pathogenitätspotential dieser Isolate gezogen werden. Aufgrund der hier ermittelten, niedrigen Prävalenz von *E. coli*-Stämmen der Hauptgruppe B2 ist allerdings von einer geringen Gefahr einer Infektion beim Verzehr von Wildfleischprodukten auszugehen. Ferner, da STEC- sowie EPEC-Stämme in Kot- sowie Fleischproben von Großwild (besonders Wildwiederkäuer) häufig vorkommen (MIKO et al. 2009; SÁNCHEZ et al. 2009; BARDIAU et al. 2010; DIAZ-SÁNCHEZ et al. 2012), ist die Rolle, die die *E. coli*-Stämme der häufig

vorkommenden Phylogruppe B1 des im Einzel- und Großhandel vermarkteten Wildbrets, nicht zu unterschätzen.

## 6. SCHLUSSFOLGERUNGEN

Aus den vorliegenden Ergebnissen kann geschlossen werden, dass die verpackten Wildfleischprodukte die hygienischen Erfordernisse erfüllen können, die zur Evaluierung des Hygienegrads der traditionellen Fleischherstellung vorgegeben wurden. Die Untersuchung auf aerob wachsende Keime zeigte, dass die hygienische Qualität von lediglich 2,7% der Fleischproben aus Reh-, Rot- und Schwarzwild als unbefriedigend bezeichnet werden musste (Keimgehalte über  $6,70 \text{ Log}_{10} \text{ KbE/cm}^2$ ). Im Hinblick auf den Hygieneindikator *E. coli* wiesen zudem 86,2 % der Wildfleischproben Gehalte von weniger als  $2,70 \text{ Log}_{10} \text{ KbE/cm}^2$  auf und konnten somit als befriedigend oder akzeptabel gemäß der VO (EG) 2073/2005 eingestuft werden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten potentiell pathogene Keime in unterschiedlicher Häufigkeit bei verpackten Wildfleischproben nachgewiesen werden. So konnten Koagulase-positive Staphylokokken und *Listeria monocytogenes* in 10,6% bzw. 15,4% der gesamten Probenzahl ermittelt werden. Der Nachweis von Salmonellen gelang lediglich bei 4 Proben von Wildschweinfleisch.

Die statistische Analyse der erhobenen *E. coli*-Gehalte sowie des Vorkommens von Koagulase-positiven Staphylokokken und *Listeria monocytogenes* zeigten, dass das Fleisch vom Wildschwein während des Produktionsprozesses in höherem Grad bzw. häufiger bakteriell kontaminiert wurde, als das Reh- oder Rotwildfleisch. Die Kontamination verpackter Wildfleischprodukte wird von verschiedenen Faktoren entlang der Produktionskette beeinflusst. Weitere Untersuchungen sollen erhellen, welche intrinsischen oder extrinsischen Faktoren das Fleisch von Wildschweinen, während der Gewinnung, anfälliger für bakterielle Besiedlung macht.

Zur Bestimmung der Antibiotikaempfindlichkeit von *E. coli*- Isolaten aus verpacktem Wildfleisch zeigten die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung, dass die Prävalenz multiresistenter Keime niedrig ist. Dennoch konnte belegt werden, dass die bakterielle Mikroflora der Wildfleischprodukte ebenfalls unempfindliche Stämme enthalten kann. Die epidemiologische Entwicklung der Antibiotikaresistenz in Wildfleischprodukten sollte weiter

untersucht werden und dazu sollten Studien auf die Erkennung möglicher Kontaminationsquellen abzielen.

Die im Wildfleisch isolierten *E. coli*-Populationen wurden anhand ihrer Stoffwechseleigenschaften verschiedenen API 20E-Profilen zugeordnet. Dabei wurde das Profil 5144572 sowohl bei empfindlichen als auch bei unempfindlichen Isolaten am häufigsten nachgewiesen. Zudem konnten unempfindliche *E. coli*, isoliert aus verpacktem Wildfleisch, den phylogenetischen Hauptgruppen A, B1, B2 und D zugeordnet werden. Das Vorkommen der verschiedenen Phylogruppen in dieser Studie war vergleichbar, mit deren Vorkommen bei *E. coli*-Stämmen, isoliert aus traditionellen Fleischprodukten. Ferner konnte kein Zusammenhang zwischen dem API 20E-Profil oder einer phylogenetischen Zugehörigkeit eines *E. coli*-Isolats und das Vorkommen eines spezifischen Unempfindlichkeitsphänotyps im Rahmen dieser Studie nachgewiesen werden.



## 7. ZUSAMMENFASSUNG

Mateus Vargas, Rafael Hernán:

Vorkommen, phänotypische Charakterisierung und Bedeutung von *Escherichia coli* aus Wildfleisch

Gemäß VO (EG) 178/2002 und VO (EG) 852/2004 sind die Lebensmittelunternehmer verpflichtet, dem Endverbraucher ein sicheres Produkt anzubieten. Dafür müssen die Fleischprodukte auf vorgegebene mikrobielle Parameter zur Überprüfung der Prozesshygiene untersucht werden. Zudem ist die Überwachung der Antibiotikaempfindlichkeit in Mikroorganismen isoliert aus Fleischprodukten von großer Bedeutung.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 188 vakuumverpackte Teilstücke von Reh-, Rotwild und Wildschwein auf verschiedene Hygieneindikatoren und potentielle Krankheitserreger mikrobiologisch untersucht. In Anlehnung an die amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB, wurden die Wildfleischproben quantitativ auf aerob wachsende Keime, *Enterobacteriaceae* und *E. coli* untersucht. Die Quantifizierung Koagulase-positiver Staphylokokken, sowie die qualitative Bestimmung des Vorhandenseins von *Salmonella* spp. und *Listeria monocytogenes* wurden ebenfalls durchgeführt.

Anhand der Richt- und Grenzwerte der VO (EG) 2073/2005 konnten die Mehrzahl der Wildfleischproben als befriedigend oder akzeptabel bezeichnet werden. Die Medianwerte der aeroben Gesamtkeimzahl, der Zahl der *Enterobacteriaceae* und *E. coli* lagen bei 4,55 Log<sub>10</sub> KbE/cm<sup>2</sup>, 4,10 Log<sub>10</sub> KbE/cm<sup>2</sup> bzw. für *E. coli* bei 1,84 Log<sub>10</sub> KbE/cm<sup>2</sup>. Während die Medianwerte der Gesamtkeimzahl und des Gehaltes an *Enterobacteriaceae* beim Fleisch der einzelnen Tierarten auf einem vergleichbaren Niveau lagen, konnten signifikante Unterschiede zwischen den Keimzahlen von *E. coli* bei Wildschwein, gegenüber denen bei Rehwild bestätigt werden (2,53 Log<sub>10</sub> KbE/cm<sup>2</sup> im Vergleich zu 1,31 Log<sub>10</sub> KbE/cm<sup>2</sup>). Koagulase-positiv Staphylokokken und *L. monocytogenes* wurden in 10,6% bzw. 15,4% der 188 Wildfleischproben nachgewiesen. Hierbei wiesen die Wildschweinproben signifikant höhere Prävalenzen auf, als das Fleisch vom Rehwild. Des Weiteren gelang der Nachweis von *Salmonella* spp. nur bei Fleisch vom Wildschwein ( $n=4$ ).

Der Antibiotikaempfindlichkeitsstatus willkürlich ausgewählter Isolate von *E. coli* gegenüber 27 Antibiotika, wurde ebenfalls überprüft. Nach der Quantifizierung von *E. coli* wurden die minimalen Hemmkonzentrationen ausgewählter Isolate durch einen Mikro-Reihenverdünnungstest ausgewertet und Bezug nehmend auf die von EUCAST publizierten Grenzwerte evaluiert.

Bei der Antibiotikaempfindlichkeitstestung von insgesamt 229 *E. coli*-Isolaten, zeigten 38,0% einen erhöhten MHK-Wert gegenüber mindestens einem Antibiotikum. Im Allgemeinen konnten verringerte Empfindlichkeiten gegenüber Cefaclor (32,8%), Doxycyclin (3,9%) und Cefoxitin (1,7%), sowie Resistenzen gegenüber Ampicillin (2,2%), Chloramphenicol (1,7%) und Tobramycin (0,9%) festgestellt werden. Einer von den Ampicillin-resistenten Stämmen, welcher aus Rotwildfleisch isoliert wurde, war ebenfalls phänotypisch resistent gegenüber anderen  $\beta$ -Laktam-Derivaten und Aztreonam aber empfindlich gegenüber Cefoxitin. Aufgrund der Art des in dieser Studie untersuchten Materials (verpacktes Wildfleisch) konnte nicht zugeordnet werden, ob dieses Isolat vom erlegten Tier stammte oder während des weiteren Herstellungsprozesses auf die Fleischoberfläche gelangte.

Die untersuchten *E. coli*-Isolate wurden anschließend anhand biochemischer Merkmale kategorisiert. Des Weiteren wurden unempfindliche Isolate den phylogenetischen Hauptgruppen zugeordnet. Insgesamt wurden 29 verschiedenen API 20E-Profile nachgewiesen. Das Profil 5144572 kam beim Fleisch der verschiedenen Wildtierarten am häufigsten vor (38,4%). Dieses Profil wurde bei den *E. coli*-Stämmen, die eine verringerte Empfindlichkeit gegenüber mindestens einem Antibiotikum aufwiesen, ebenfalls am häufigsten nachgewiesen (55,2%). Die unempfindlichen *E. coli*-Isolate wurden überwiegend der Phylogruppe B1 (66,7%) zugeordnet. Die übrigen Isolate gehörten zu den Phylogruppen A (19,5%), D (8,1%) und B2 (5,8%).

Die Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen zeigten, dass die Mehrheit der verpackten Wildfleischproben, gemäß VO (EG) 2073/2005, die Erfordernisse erfüllt haben, die zur Evaluierung des Hygienegrads für die Herstellung von traditionellen Fleischprodukten vorgegeben wurden. Anhand der statistischen Analyse der quantitativen sowie qualitativen Ergebnisse der mikrobiologischen Parameter wurde zudem deutlich, dass das Wildschweinfleisch signifikant häufiger oder in höheren Grad bakteriell kontaminiert war, im

Vergleich zum Fleisch von Wildwiederkäuern. In Bezug auf die Antibiotikaempfindlichkeit der isolierten *E. coli*-Stämme wurde im Rahmen dieser Arbeit eine niedrige Prävalenz multiresistenter *E. coli*-Stämme nachgewiesen. Ferner konnten die hier isolierten *E. coli*-Populationen anhand ihrer Stoffwechseleigenschaften und phylogenetischer Zugehörigkeit eingeordnet werden. In dieser Arbeit konnten keine Zusammenhänge zwischen den biochemischen oder molekularbiologischen Eigenschaften der *E. coli*-Isolate und dem Vorkommen spezifischer Unempfindlichkeitsmuster bestätigt werden.

## 8. SUMMARY

Mateus Vargas, Rafael Hernán:

Prevalence, phenotypical characterization and significance of *Escherichia coli* in game meat

The safety of foodstuffs offered to consumers must be ensured by the food business operator (Regulation EC 178/2002 and Regulation EC 852/2004). In order to fulfill the given standards, the acceptability of these products and their manufacturing processes must be controlled by hygiene control measures that may include the examination of microbiological agents. Moreover, monitoring of the antimicrobial susceptibility of micro-organisms isolated from meat products is a matter of great significance for public health and safety.

In this study a total of 188 samples of vacuum-packaged meat cuts of roe deer, red deer and wild boar were examined. The microbiological examinations included testing against bacterial indicators of hygiene and the presence potentially pathogenic species. Game meat samples were examined microbiologically according to § 64 of the LFGB. Microbiological examinations included the quantitative determination of aerobic mesophilic bacteria, *Enterobacteriaceae* and *Escherichia coli*. Additionally, quantification of coagulase-positive staphylococci and qualitative examination of *Salmonella* spp. und *Listeria monocytogenes* were conducted.

According to criteria given by Regulation EC 2073/2005, a majority of the game meat samples were categorized as hygienically satisfactory or acceptable. The median values for the aerobic mesophilic count, the number of *Enterobacteriaceae* and the number of *E. coli* were  $4.55 \log_{10} \text{ cfu/cm}^2$ ,  $4.10 \log_{10} \text{ cfu/cm}^2$  and  $1.84 \log_{10} \text{ cfu/cm}^2$ , respectively. Meat of different animal species showed similar median  $\log_{10}$  values for *Enterobacteriaceae* and the aerobic mesophilic count, while the analysis of the median  $\log_{10}$  values of *E. coli* revealed significant differences between the bacterial content of meat of wild boar and that of roe deer ( $2.53 \log_{10} \text{ cfu/cm}^2$  vs.  $1.31 \log_{10} \text{ cfu/cm}^2$ ). Coagulase-positive staphylococci and *L. monocytogenes* were detected in 10.6% and 15.4% of the 188 game meat samples studied, respectively. It was possible to isolate *Salmonella* spp. from 4 samples of wild boar.

In addition to the microbiological examinations, the antimicrobial susceptibility of randomly selected isolates of *E. coli* to 27 antimicrobial substances was determined. For positive samples, and after quantification of *E. coli*, the minimal inhibitory concentration (MIC) of selected isolates was determined using a microdilution technique. The results were evaluated referring to the cut-off values published by EUCAST.

The antimicrobial susceptibility testing showed that 38.0% of 229 *E. coli* isolates showed a decreased susceptibility or resistance phenotype to at least one antimicrobial agent. In general, decreased susceptibility was more often observed to cefaclor (32.8%), followed by doxycyclin (3.9%) and ceftiofur (1.7%). Resistance to ampicillin (2.2%), chloramphenicol (1.7%) and tobramycin (0.9%) was detected as well. One of the isolates of meat of red deer showing resistance to ampicillin was phenotypically resistant to other  $\beta$ -lactam antibiotic compounds and aztreonam, however it was found to be susceptible to ceftiofur. Due to the type of samples analyzed in this study (packaged game meat) it was not possible to trace the isolate back to either the animal itself or to a cross-contamination of the meat surface during the processing.

In this study, all *E. coli* isolates examined were categorized on the basis of biochemical characteristics. Moreover, the isolates showing reduced susceptibility or resistance to antibiotics were phylogenetically characterized by PCR. A total of 29 different API 20E biochemical profiles were found. The biotype 5144572 was the most prevalent among the isolates obtained from meat of the different wild animal species (38.4%). This biotype accounted also for 55.2% of the *E. coli* isolates showing decreased susceptibility to at least one antibiotic. Phylogenetic analysis demonstrated that resistant isolates and those with decreased susceptibility belonged predominantly to phylogroup B1 (66.7%). The remaining isolates were separated into phylogroups A (19.5%), D (8.1%) and B2 (5.8%).

Based on the microbiological results we conclude that most of the game meat samples fulfilled the hygiene standards that are provided in Regulation EC 2073/2005 to evaluate the hygiene of the traditional meat production process. The statistical analysis of the qualitative and quantitative results of microbiological criteria revealed that meat of wild boar was contaminated significantly more often with certain bacteria or was contaminated to a higher degree than the meat of wild ruminants. Concerning the antimicrobial susceptibility of *E. coli*

isolates, it was observed that the prevalence of multiple resistant *E. coli* in packaged game meat is low. Additionally, it was possible to characterize the *E. coli* population isolated from game on the basis of their metabolic characters and phylogenetical belonging. In this study, the obtained biochemical or molecular characters of the *E. coli* isolates did not appear to correlate with specific antimicrobial susceptibility patterns.

## 9. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1: Expositionspfade für potentielle mikrobiologische Gefahren aus Wildtieren und ihren Produkten für den Menschen.....	10
Abb. 2: Vorkommen von verotoxinbildenden <i>E. coli</i> in Rind-, Schweine- und Wildfleisch im Zeitraum 2003 bis 2012 nach den Angaben der Zoonosenerhebung bei Lebensmitteln in Deutschland.....	13
Abb. 3: Vorkommen von Salmonellen in Rind-, Schweine- und Wildfleisch im Zeitraum 2003 bis 2012 nach den Angaben der Zoonosenerhebung bei Lebensmitteln in Deutschland.....	15
Abb. 4: Vorkommen von <i>L. monocytogenes</i> in Rind-, Schweine- und Wildfleisch im Zeitraum 2003 bis 2012 nach den Angaben der Zoonosenerhebung bei Lebensmitteln in Deutschland.....	17
Abb. 5: Box- and Whisker-Plot-Darstellung.....	30
Abb. 6: Quantitative Darstellung der aerob wachsenden Gesamtkeimzahl beim verpackten Rehwild-, Rotwild- und Wildschweinfleisch in $\text{Log}_{10} \text{KbE/cm}^2$ . ....	33
Abb. 7: Quantitative Darstellung der Zahl der <i>Enterobacteriaceae</i> beim verpackten Rehwild-, Rotwild- und Wildschweinfleisch in $\text{Log}_{10} \text{KbE/cm}^2$ . ....	33
Abb. 8: Quantitative Darstellung der Zahl der <i>E. coli</i> beim verpackten Rehwild-, Rotwild- und Wildschweinfleisch in $\text{Log}_{10} \text{KbE/cm}^2$ . ....	34
Abb. 9: Prozentuale Einteilung der untersuchten Wildfleischproben anhand der aeroben mesophilen Gesamtkeimzahl gemäß VO (EG) 2073/2005 in befriedigend, akzeptabel und unbefriedigend.....	35
Abb. 10: Prozentuale Einteilung der untersuchten Wildfleischproben anhand des Gehaltes an <i>E. coli</i> gemäß VO (EG) 2073/2005 in befriedigend, akzeptabel und unbefriedigend .	35
Abb. 11: Prozentuale Verteilung der Ergebnisse der Antibiotikaempfindlichkeitstestung von <i>E. coli</i> -Isolaten aus Wildfleisch.....	38

**10. TABELLENVERZEICHNIS**

Tab. 1: Resistenzmechanismen, die von erwerbbaaren Resistenzgenen kodiert werden. ....	19
Tab. 2: Prozesshygienekriterien für Hackfleisch und Faschiertes gemäß Verordnung (EG) 2073/2005 (Anh. I, Kap. 2) in Log <sub>10</sub> -Wert.....	25
Tab. 3: Eingesetzte Antibiotika, Konzentrationen und Grenzwerte für <i>Enterobacteriaceae</i> gemäß EUCAST (2013) .....	28
Tab. 4: Prävalenzen von Indikatorkeimen bei verpacktem Wildfleisch .....	32
Tab. 5: Prävalenzen von Zoonoseerregern bei verpacktem Wildfleisch.....	36
Tab. 6: Ergebnisse der Antibiotikaempfindlichkeitstestung von <i>E. coli</i> -Isolaten aus Wildfleisch .....	39
Tab. 7: Zusammenfassung der gefundenen Antibiotikaunempfindlichkeitsmuster bei <i>E. coli</i> -Isolaten aus Wildfleisch .....	41
Tab. 8: Zuordnung der untersuchten <i>E. coli</i> -Isolate aus Wildfleisch anhand der API 20E-Profile .....	42
Tab. 9: Zuordnung der unempfindlichen <i>E. coli</i> -Isolate aus Wildfleisch anhand der API 20E-Profile .....	43
Tab. 10: Prozentuale Verteilung der unempfindlichen <i>E. coli</i> -Isolate aus Wildfleisch in den phylogenetischen Hauptgruppen .....	43
Tab. 11: Prozentuale Verteilung der unempfindlichen <i>E. coli</i> -Isolate von jeder phylogenetischen Hauptgruppe in die spezifischen API 20E-Profile .....	44
Tab. 12: Verteilung der unempfindlichen <i>E. coli</i> -Isolate auf die phylogenetischen Hauptgruppen .....	45



**11. LITERATURVERZEICHNIS**

- AARESTRUP, F.M. u. H.C. WEGENER (1999): The effects of antibiotic usage in food animals on the development of antimicrobial resistance of importance for humans in *Campylobacter* and *Escherichia coli*. *Microbes Infect.* 1, 639-644.
- AGRMC (2012): Deer (venison) ranching profile. (zuletzt besucht am: 21. Februar 2013). [http://www.agmrc.org/commodities\\_products/livestock/deer-venison-ranching-profile/](http://www.agmrc.org/commodities_products/livestock/deer-venison-ranching-profile/)
- ALEKSIĆ, S. u. J. BOCKEMÜHL (1990): Mikrobiologie und Epidemiologie der Yersiniosen. *Immun. Infekt.* 18, 178-185.
- ALLEN, S.E., P. BOERLIN, N. JANECKO, J.S. LUMSDEN, I.K. BARKER, D.L. PEARL, R.J. REID-SMITH u. C. JARDINE (2011): Antimicrobial resistance in generic *Escherichia coli* isolates from wild small mammals living in swine farm, residential, landfill, and natural environments in southern Ontario, Canada. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 882-888.
- ANGULO, F.J., V.N. NARGUND u. T.C. CHILLER (2004): Evidence of an association between use of anti-microbial agents in food animals and anti-microbial resistance among bacteria isolated from humans and the human health consequences. *J. Vet. Med. B.* 51, 374-379.
- APELT, J.M. (2007): Hygienestatus von frisch erlegten Wildtieren aus verschiedenen Jagdrevieren Deutschlands. Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.
- ARBER, W. (2000): Genetic variation: molecular mechanisms and impact on microbial evolution. *FEMS Microbiol. Rev.* 24, 1-7.
- ARCHER, D.L. (2004): Freezing: an underutilized food safety technology?. *Int. J. Food Microbiol.* 90, 127-138.
- ARSLAN, S. u. A. EYI (2010): Occurrence and antimicrobial resistance profiles of *Salmonella* species in retail meat products. *J. Food. Prot.* 73, 1613-1617.
- ASCHFALK, A., N. KEMPER, J.M. ARNEMO, V. VEIBERG, O. ROSEF u. H. NEUBAUER (2008): Prevalence of *Yersinia* species in healthy free-ranging red deer (*Cervus elaphus*) in Norway. *Vet. Rec.* 163, 27-28.
- ASLAM, M., F. NATTRESS, G. GREER, C. YOST, C. GILL u. L. MCMULLEN (2003): Origin of contamination and genetic diversity of *Escherichia coli* in beef cattle. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 2794-2799.

- ASLAM, M., G.G. GREER, F.M. NATTRESS, C.O. GILL u. L.M. MCMULLEN (2004): Genotypic analysis of *Escherichia coli* recovered from product and equipment at a beef-packing plant. *J. Appl. Microbiol.* 97, 78-86.
- ASLAM, M., M.S. DIARRA, C. SERVICE u. H. REMPEL (2009): Antimicrobial resistance genes in *Escherichia coli* isolates recovered from a commercial beef processing plant. *J. Food. Prot.* 72, 1089-1093.
- ASLAM, M., S. CHECKLEY, B. AVERY, G. CHALMERS, V. BOHAYCHUK, G. GENSLER, R. REID-SMITH u. P. BOERLIN (2012): Phenotypic and genetic characterization of antimicrobial resistance in *Salmonella* serovars isolated from retail meats in Alberta, Canada. *Food Microbiol.* 32, 110-117.
- ATANASSOVA, V., J. APELT, F. REICH u. G. KLEIN (2008): Microbiological quality of freshly shot game in Germany. *Meat Sci.* 78, 414-419.
- AVAGNINA, A., D. NUCERA, M.A. GRASSI, E. FERROGLIO, A. DALMASSO u. T. CIVERA (2012): The microbiological conditions of carcasses from large game animals in Italy. *Meat Sci.* 91, 266-271.
- BACCI, C., E. BONI, I. ALPIGIANI, E. LANZONI, S. BONARDI u. F. BRINDANI (2012): Phenotypic and genotypic features of antibiotic resistance in *Salmonella enterica* isolated from chicken meat and chicken and quail carcasses. *Int. J. Food Microbiol.* 160, 16-23.
- BANDICK, N. u. C. RING (1996): Wildbret als Nahrungsmittel. *Fleischwirtschaft.* 76, 888-896.
- BARDIAU, M., F. GRÉGOIRE, A. MUylaERT, A. NAHAYO, J.-N. DUPREZ, J. MAINIL u. A. LINDEN (2010): Enteropathogenic (EPEC), enterohaemorrhagic (EHEC) and verotoxigenic (VTEC) *Escherichia coli* in wild cervids. *J. Appl. Microbiol.* 109, 2214-2222.
- BLAKE, D.P., K. HILLMAN, D.R. FENLON u. J.C. LOW (2003): Transfer of antibiotic resistance between commensal and pathogenic members of the Enterobacteriaceae under ileal conditions. *J. Appl. Microbiol.* 95, 428-436.
- BMELV (2012): Verbrauch von Nahrungsmitteln je Kopf, Statistisches Jahrbuch über Ernährung, Landwirtschaft und Forsten 2011 (zuletzt besucht am: 13. September 2013). <http://berichte.bmelv-statistik.de/SJT-4010500-0000.pdf>.
- BOERS, R.H., K.E. DIJKMANN u. G. WIJNGAARDS (1994): Shelf-life of vacuum-packaged wild boar meat in relation to that of vacuum-packaged pork: Relevance of intrinsic factors. *Meat Sci.* 37, 91-102.

- BOHAYCHUK, V.M., G.E. GENSLER, R.K. KING, K.I. MANNINEN, O. SORENSEN, J.T. WU, M.E. STILES u. L.M. MCMULLEN (2006): Occurrence of pathogens in raw and ready-to-eat meat and poultry products collected from the retail marketplace in Edmonton, Alberta, Canada. *J. Food Prot.* 69, 2176-2182.
- BORCH, E., M.-L. KANT-MUERMANS u. Y. BLIXT (1996): Bacterial spoilage of meat and cured products. *Int. J. Food Microbiol.* 33, 103-122.
- BRODOWSKI, G. u. D. BEUTLING (1998): Die hygienische Gewinnung von Wildbret unter jagdlichen Bedingungen Untersuchungen an Dam-, Reh-, Schwarz-, und Rotwild aus Sachsen-Anhalt. *Fleischwirtschaft.* 78, 1208-1210.
- BRYAN, A., N. SHAPIR u. M.J. SADOWSKY (2004): Frequency and distribution of tetracycline resistance genes in genetically diverse, nonselected, and nonclinical *Escherichia coli* strains isolated from diverse human and animal sources. *Appl. Environ. Microb.* 70, 2503-2507.
- BYWATER, R., H. DELUYKER, E. DEROOVER, A. DE JONG, H. MARION, M. MCCONVILLE, T. ROWAN, T. SHRYOCK, D. SHUSTER, V. THOMAS, M. VALLÉ u. J. WALTERS (2004): A European survey of antimicrobial susceptibility among zoonotic and commensal bacteria isolated from food-producing animals. *J. Antimicrob. Chemother.* 54, 744-754.
- BVDF (2013): Geschäftsbericht 2012/2013. (zuletzt besucht am: 21. Februar 2014). [http://www.bvdf.de/aktuell/geschaeftsbericht\\_2012\\_13/](http://www.bvdf.de/aktuell/geschaeftsbericht_2012_13/).
- CAGNACCI, S., L. GUALCO, E. DEBBIA, G.C. SCHITO u. A. MARCHESE (2008): European emergence of ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* clonal groups O25:H4-ST 131 and O15:K52:H1 causing community-acquired uncomplicated cystitis. *J. Clin. Microbiol.* 46, 2605-2612.
- CAPRIOLI, A., G. DONELLI, V. FALBO, C. PASSI, A. PAGANO u. A. MANTOVANI (1991): Antimicrobial resistance and productions of toxins in *Escherichia coli* strains from wild ruminants and the alpine marmot. *J. Wildl. Dis.* 27, 324-327.
- CAPRIOLI, A., L. BUSANI, J.L. MARTEL u. R. HELMUTH (2000): Monitoring of antibiotic resistance in bacteria of animal origin: epidemiological and microbiological methods. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 14, 295-301.
- CARATTOLI, A. (2001): Importance of integrons in the diffusion of resistance. *Vet. Res.* 32, 243-259.

- CARBONERO, A., J. PANIAGUA, A. TORRALBO, A. ARENAS-MONTES, C. BORGE u. I. GARCÍA-BOCANEGRA (2014): *Campylobacter* infection in wild artiodactyl species from southern Spain: Occurrence, risk factors and antimicrobial susceptibility. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 37, 115-121.
- CASARIN, L.S., E.C. TONDO, M.P. KLEIN u. A. BRANDELLI (2009): Survival of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* Enteritidis in frozen chicken hamburger. *J. Muscle Foods.* 20, 478-488.
- CHASSEIGNAUX, E., P. GÉRAULT, M.-T. TOQUIN, G. SALVAT, P. COLIN u. G. ERMEL (2002): Ecology of *Listeria monocytogenes* in the environment of raw poultry meat and raw pork meat processing plants. *FEMS Microbiol. Lett.* 210, 271-275.
- CICCOZZI, M., M. GIUFRÈ, M. ACCOGLI, A. LO PRESTI, C. GRAZIANI, E. CELLA u. M. CERQUETTI (2013): Phylogenetic analysis of multidrug-resistant *Escherichia coli* clones isolated from humans and poultry. *New Microbiol.* 36, 385-394.
- CHOMEL, B.B., A. BELOTTO u. F.-X. MESLIN (2007): Wildlife, exotic pets, and emerging zoonoses. *Emerg. Infect. Dis.* 13, 6-11.
- CHRYSTAL, N.D., S.J. HARGRAVES, A.C. BOA u. C.J. IRONSIDE (2008): Counts of *Campylobacter* spp. and prevalence of *Salmonella* associated with New Zealand broiler carcasses. *J. Food Prot.* 71, 2526-2532.
- CLERMONT, O., S. BONACORSI u. E. BINGEN (2000): Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 4555-4558.
- CLSI (2009): Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 19th informational supplement. CLSI document M100-S19. Wayne, PA.
- COBURN, H.L., E.L. SNARY, L.A. KELLY u. M. WOOLDRIDGE (2005): Qualitative risk assessment of the hazards and risks from wild game. *Vet. Rec.* 157, 321-322.
- COENEN, S., M. FERECHE, K. DVORAKOVA, E. HENDRICKX, C. SUETENS, H. GOOSSENS u. ESAC PROJECT GROUP (2006): European surveillance of antimicrobial consumption (ESAC): outpatient cephalosporin use in Europe. *J. Antimicrob. Chemother.* 58, 413-417.
- COOK, A., J. ODUMERU, S. LEE u. F. POLLARI (2012): *Campylobacter*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, verotoxigenic *Escherichia coli*, and *Escherichia coli* prevalence, enumeration, and subtypes on retail chicken breasts with and without skin. *J. Food Prot.* 75, 34-40.

- COSTA, D., P. POETA, Y. SÁENZ, L. VINUÉ, A.C. COELHO, M. MATOS, B. ROJO-BEZARES, J. RODRIGUES u. C. TORRES (2008): Mechanisms of antibiotic resistance in *Escherichia coli*, isolates recovered from wild animals. *Microb. Drug Resist.* 14, 71-77.
- COSTA, D., P. POETA, Y. SÁENZ, L. VINUÉ, B. ROJO-BEZARES, A. JOUINI, M. ZARAZAGA, J. RODRIGUES u. C. TORRES (2006): Detection of *Escherichia coli* harbouring extended-spectrum  $\beta$ -lactamases of the CTX-M, TEM and SHV classes in faecal samples of wild animals in Portugal. *J. Antimicrob. Chemother.* 58, 1311-1312.
- DAVIES, B.I. (1977): Biochemical typing of urinary *Escherichia coli* strains by means of the API 20 E Enterobacteriaceae system. *J. Med. Microbiol.* 10, 293-298.
- DAVIES, J. (1994): Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. *Science.* 264, 375-382.
- DE FILLIPIS, F., A. LA STORIA, F. VILLANI u. D. ERCOLINI (2013): Exploring sources of bacterial spoilers in beefsteaks by culture-independent high-throughput sequencing. *PLoS One*, 8, e702222. doi: 10.1371/journal.pone.0070222.
- DESMARCHELIER, P.M., G.M. HIGGS, L. MILLS, A.M. SULLIVAN u. P.B. VANDERLINDE (1999): Incidence of coagulase positive *Staphylococcus* on beef carcasses in three Australian abattoirs. *Int. J. Food Microbiol.* 47, 221-229.
- DJV (2012): Wildschweinbraten bleibt Nummer eins auf dem Teller. (zuletzt besucht am: 21. Februar 2013). [http://www.jagdnetz.de/news?meta\\_id=3204](http://www.jagdnetz.de/news?meta_id=3204).
- DEUTZ, A., F. VÖLK, P. PLESS, H. FLÖTSCHL u. P. WAGNER (2006): Wildfleischhygienische Aspekte zu Stöberjagden auf Rot- und Rehwild. *Arch. Lebensmittelhyg.* 57, 197-202.
- DEUTZ, A., K. FUCHS, P. PLESS, U. DEUTZ PIEBER u. J. KÖFER (2000): Hygienierisiken bei Wildfleisch - Oberflächenkeimgehalte und humanpathogene Keime. *Fleischwirtsch.* 89, 106-108.
- DHANJI, H., N.M. MURPHY, M. DOUMITH, S. DURMUS, S.S. LEE, R. HOPE, N. WOODFORD u. D.M. LIVERMORE (2010): Cephalosporin resistance mechanisms in *Escherichia coli* isolated from raw chicken imported into the UK. *J. Antimicrob. Chemother.* 65, 2534-2537.
- DÍAZ-SÁNCHEZ, S., S. SÁNCHEZ, M. SÁNCHEZ, S. HERRERA-LEÓN, I. HANNING u. D. VIDAL (2012): Detection and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in game meat and ready-to-eat meat products. *Int. J. Food Microbiol.* 160, 179-182.

- DÍAZ-SÁNCHEZ, S., S. SÁNCHEZ, S. HERRERA-LEÓN, C. PORRERO, J. BLANCO, G. DAHBI, J.E. BLANCO, A. MORA, R. MATEO, I. HANNING u. D. VIDAL (2013): Prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. and *Campylobacter* spp. in large game animals intended for consumption: Relationship between management practices and livestock influence. *Vet. Microbiol.* 163, 274-281.
- DUFFY, E.A., K.E. BELK, J.N. SOFOS, G.R. BELLINGER, A. PAPE u. G.C. SMITH (2001): Extent of microbial contamination in United States pork retail products. *J. Food Prot.* 64, 172-178.
- DYKES, G.A. u. S.M. MOORHEAD (2001): Survival of three *Salmonella* serotypes on beef trimmings during simulated commercial freezing and frozen storage. *J. Food Safety.* 21, 87-96.
- EFSA (2013): Scientific report of EFSA and ECDC: The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food borne outbreaks in 2011. *EFSA Journal.* 11, 3129. doi:10.2903/j.efsa.2013.3129.
- EGGERT, M. (2011): Nachweis und Charakterisierung von Shigatoxin-bildenden *Escherichia coli* in Wildwiederkäuern. München, Ludwig-Maximilians-Universität, Diss.
- EGLEZOS, S., E. STUTTARD, B. HUANG, G.A. DYKES, N. FEGAN (2008): A survey of the microbiological quality of feral pig carcasses processed for human consumption in Queensland, Australia. *Foodborne Pathog. Dis.* 5, 105-109.
- ESCARTÍN, E.F., SALDAÑA LOZANO u. O. RODRÍGUEZ GARCIA (2000): Quantitative survival of native *Salmonella* serovars during storage of frozen raw pork. *Int. J. Food Microbiol.* 54, 19-25.
- ESCOBAR-PÁRAMO, P., K. GRENET, A. LE MENAC'H, L. RODE, E. SALGADO, C. AMORIN, S. GOURIOU, B. PICARD, M.C. RAHIMY, A. ANDREMONT, E. DENAMUR u. R. RUIMY (2004): Large-scale population structure of human commensal *Escherichia coli* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 5698-5700.
- EUCAST (2013): Antimicrobial Wild type distributions of microorganisms. Available at: <http://mic.eucast.org/Eucast2/>. Accessed: 30 June 2013.
- FARBER, J.M. u. P.I. PETERKIN (1991): *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol. Rev.* 55, 467-511.
- FEHLHABER, K. u. T. ALTER (1999): Mikrobielle Folgen prämortaler Belastungen bei Schlachtschweinen. *Fleischwirtsch.* 79, 86-90.

- FREDRIKSSON-AHOMAA, M., S. WACHECK, M. KOENIG, A. STOLLE u. R. STEPHAN (2009): Prevalence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* in wild boars in Switzerland. *Int. J. Food. Microbiol.* 135, 199-202.
- FRENCH, E., A. RODRIGUEZ-PALACIOS u. J.T. LEJEUNE (2010): Enteric bacterial pathogens with zoonotic potential isolated from farm-raised deer. *Foodborne Pathog. Dis.* 7, 1031-1037.
- FRÖMMEL, U., W. LEHMANN, S. RÖDIGER, A. BÖHM, J. NITSCHKE, J. WEINREICH, J. GROß, D. ROGGENBUCK, O. ZINKE, H. ANSORGE, S. VOGEL, P. KLEMM, T. WEX, C. SCHRÖDER, L.H. WIELER u. P. SCHIERACK (2013): Adhesion of human and animal *Escherichia coli* strains in association with their virulence-associated genes and phylogenetic origins. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 5814-5829.
- GARCIA, A., R.P. MARINI, Y. FENG, A. VITSKY, K.A. KNOX, N.S. TAYLOR, D.B. SCHAUER u. J.G. FOX (2002): A naturally occurring rabbit model of enterohemorrhagic *Escherichia coli*-induced disease. *J. Infect. Dis.* 186, 1682-1686.
- GARGAN, R., W. BRUMFITT u. J.M.T. HAMILTON-MILLER (1982): A concise biotyping system for differentiating strains of *Escherichia coli*. *J. Clin. Pathol.* 35, 1366-1369.
- GHAFIR, Y., B. CHINA, K. DIERICK, L. DE ZUTTER u. G. DAUBE (2008): Hygiene indicator microorganisms for selected pathogens on beef, pork and poultry meats in Belgium. *J. Food Prot.* 71, 35-45.
- GILL, C.O. (2007): Microbiological conditions of meats from large game animals and birds. *Meat Sci.* 77, 149-160.
- GILL, C.O. u. N. PENNEY (1977): Penetration of bacteria into meat. *Appl. Environ. Microbiol.* 33, 1284-1286.
- GODBOUT-DELASALLE, F. u. R. HIGGINS (1986): Biotyping of clinical isolates of *Escherichia coli* of animal origin, using the Analytab API 20E system. *Can. J. Vet. Res.* 50, 418-421.
- GOMES-NEVES, E., P. ANTUNES, V. MANAGEIRO, F. GÄRTNER, M. CANIÇA, J.M. CORREIA DA COSTA u. L. PEIXE (2014): Clinically relevant multidrug resistant *Salmonella enterica* in swine and meat handlers at the abattoir. *Vet. Microbiol.* 168, 229-233.
- GORDON, D.M. u. A. COWLING (2003): The distribution and genetic structure of *Escherichia coli* in Australian vertebrates: host and geographic effects. *Microbiology.* 149: 3575-3586.

- GORMLEY, R., T. WALSHE, K. HUSSEY u. F. BUTLER (2002): The effect of fluctuating vs. constant frozen storage temperature regimes on some quality parameters of selected food products. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* 35, 190-200.
- GUENTHER, S., C. EWERS u. L.H. WIELER (2011): Extended-spectrum beta-lactamases producing *E. coli* in wildlife, yet another form of environmental pollution?. *Front. Microbiol.* [serial online]. 2, 246. doi: 10.3389/fmicb.2011.00246.
- GUENTHER, S., M. GROBBEL, J. BEUTLICH, B. GUERRA, R.G. ULRICH, L.H. WIELER u. C. EWERS (2010a): Detection of pandemic B2-O25-ST131 *Escherichia coli* harbouring the CTX-M-9 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase type in a feral urban brown rat (*Rattus norvegicus*). *J. Antimicrob. Chemother.* 65, 582-584.
- GUENTHER, S., M. GROBBEL, K. HEIDEMANN, M. SCHLEGEL, R.G. ULRICH, C. EWERS u. L.H. WIELER (2010b): First insight into antimicrobial resistance among faecal *Escherichia coli* isolates from small wild mammals in rural areas. *Sci. Total Environ.* 408, 3519-3522.
- GUERRA, B., E. JUNKER, A. SCHROETER, B. MALORNY, S. LEHMANN u. R. HELMUTH (2003): Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance in German *Escherichia coli* isolates from cattle, swine and poultry. *J. Antimicrob. Chemother.* 52, 489-492.
- HANNAH, E.L., J.R. JOHNSON, F. ANGULO, B. HADDADIN, J. WILLIAMSON u. M.H. SAMORE. (2009): Molecular analysis of antimicrobial-susceptible and -resistant *Escherichia coli* from retail meats and human stool and clinical specimens in a rural community setting. *Foodborne Pathog. Dis.* 6, 285-295.
- HANSEN, W., u. E. YOURASSOWSKY (1984): Detection of  $\beta$ -Glucuronidase in Lactose-fermenting members of the family *Enterobacteriaceae* and its presence in bacterial urine cultures. *J. Clin. Microbiol.* 20, 1177-1179.
- HARADA, K., T. ASAI, A. KOJIMA, K. ISHIHARA u. T. TAKAHASHI (2006): Role of coresistance in the development of resistance to chloramphenicol in *Escherichia coli* isolated from sick cattle and pigs. *Am. J. Vet. Res.* 67, 230-235.
- HARTUNG, M. (2005): Ergebnisse der Zoonosenerhebung 2003 in Deutschland bei Lebensmitteln. *Fleischwirtsch.* 4, 116-121.
- HARTUNG, M. (2006 a): Ergebnisse der Zoonosenerhebung 2004 bei Lebensmitteln. *Fleischwirtsch.* 3, 155-161.
- HARTUNG, M. (2006 b): Ergebnisse der Zoonosenerhebung 2005 bei Lebensmitteln. *J. Verbr. Lebensm.* 1 (S2), 196-204.



- HARTUNG, M. (2007): Ergebnisse der Zoonosenerhebung bei Lebensmitteln für das Jahr 2006. J. Verbr. Lebensm. 2, 468-479.
- HARTUNG, M. (2009 a): Ergebnisse der Zoonosenerhebung 2007 bei der amtlichen Lebensmittelüberwachung. J. Verbr. Lebensm. 4 (S1), 14-23.
- HARTUNG, M. (2009 b): Ergebnisse der Zoonosenerhebung 2008 bei Lebensmitteln in Deutschland. Fleischwirtsch. 11, 92-100.
- HARTUNG, M. u. A. KÄSBOHRER (2010): Ergebnisse der Zoonosenerhebung 2009 bei Lebensmitteln in Deutschland. Fleischwirtsch. 11, 116-122.
- HARTUNG, M. u. A. KÄSBOHRER (2011): Ergebnisse der Zoonosenerhebung 2010 bei Lebensmitteln in Deutschland. Fleischwirtsch. 12, 101-108.
- HARTUNG, M. u. A. KÄSBOHRER (2012): Ergebnisse der Zoonosenerhebung 2011 bei Lebensmitteln in Deutschland. Fleischwirtsch. 9, 109-116.
- HARTUNG, M. u. A. KÄSBOHRER (2013): Ergebnisse der Zoonosenerhebung 2012 bei Lebensmitteln in Deutschland. Fleischwirtsch. 12, 96-103.
- HIGGINS, J., C. HOHN, S. HORNOR, M. FRANA, M. DENVER u. R. JOERGER (2007): Genotyping of *Escherichia coli* from environmental and animal samples. J. Microbiol. Methods. 70, 227-235.
- HIROI, M., T. HARADA, F. KAWAMORI, N. TAKAHASHI, T. KANDA, K. SUGIYAMA, T. MASUDA, Y. YOSHIKAWA u. N. OHASHI (2011): A survey of  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* in farm animals and raw retail meat in Shizuoka Prefecture, Japan. Jpn. J. Infect. Dis. 64, 153-155.
- HOFFMAN, L.C. u. E. WIKLUND (2006): Game and venison – meat for the modern consumer. Meat Sci. 74, 197-208.
- HOFFMAN, L.C. u. L.L. LAUBSCHER (2010): A comparison between the effects of day and night cropping on gemsbok (*Oryx gazella*) meat quality. Meat Sci. 85, 356-362.
- HUDAULT, S., J. GUIGNOT u. A.L. SERVIN (2001): *Escherichia coli* strains colonising the gastrointestinal tract protect germ-free mice against *Salmonella typhimurium* infection. Gut. 49, 47-55.
- HUMPHREY, T., S. O'BRIEN u. M. MADSEN (2007): *Campylobacters* as zoonotic pathogens: A food production perspective. Int. J. Food. Microbiol. 117, 237-257.
- HURLIN, J. u. H. SCHULZE (2007): Möglichkeiten und Grenzen der Qualitätssicherung in der Wildfleischvermarktung. (zuletzt besucht am: 01.03.2014) <http://www.uni-goettingen.de/de/34019.html>.

- HUSSEIN, H.S. (2007): Prevalence and pathogenicity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef cattle and their products. *J. Anim. Sci.* 85 (S13), E63-E72.
- ISHII, S., K.P. MEYER u. M.J. SADOWSKY (2007): Relationship between phylogenetic groups, genotypic clusters, and virulence gene profiles of *Escherichia coli* strains from diverse human and animal sources. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 5703-5710.
- JACOBY, G.A. (1997): Extended-spectrum beta-lactamases and other enzymes providing resistance to oxyimino-beta-lactams. *Infect. Dis. Clin. North. Am.* 11, 875-887.
- JAKOBSEN, L., A. KURBASIC, L. SKJØT-RASMUSSEN, K. EJRNÆS, L.J. PORSBO, K. PEDERSEN, L.B. JENSEN, H.-D. EMBORG, Y. AGERSØ, K.E.P. OLSEN, F.M. AARESTRUP, N. FRIMODT-MØLLER u. A.M. HAMMERUM (2010a): *coli* isolates from broiler chicken meat, broiler chickens, pork, and pig share phylogroups and antimicrobial resistance with community-dwelling humans and patients with urinary tract infection. *Foodborne Pathog. Dis.* 7, 537-547.
- JAKOBSEN, L., D.J. SPANGHOLM, K. PEDERSEN, L.B. JENSEN, H.-D. EMBORG, Y. AGERSØ, F.M. AARESTRUP, A.M. HAMMERUM u. N. FRIMODT-MØLLER (2010b): Broiler chickens, broiler chicken meat, pigs and pork as sources of ExPEC related virulence genes and resistance in *Escherichia coli* isolates from community-dwelling humans and UTI patients. *Int. J. Food Microbiol.* 142, 264-272.
- JAKSIC, S., S. UHITIL, A. ASAJ, T. PETRAK u. K. BOTKA-PETRAK (2003): Salmonellen in Wildfleisch. *Allg. Forst- u. J.-Ztg.* 174, 57-58.
- JERICHO, K.W.F., J.A. BRADLEY u. G.C. KOZUB (1994): Microbiological evaluation of groups of beef carcasses: heifers and steers. *Can. J. Vet. Res.* 58, 185-188.
- JOHNSON, J.R., M.A. KUSKOWSKI, K. SMITH, T.T. O'BRYAN u. S. TATINI (2005): Antimicrobial-resistance and extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in retail foods. *J. Infect. Dis.* 191, 1040-1049.
- JOHNSON, J.R., S. MCCABE, D.G. WHITE, B. JOHNSTON, M.A. KUSKOWSKI u. P. MCDERMOTT (2009): Molecular analysis of *Escherichia coli* from retail meats (2002-2004) from the United States national antimicrobial resistance monitoring system. *Clin. Infect. Dis.* 49, 195-201.
- JOHNSON, J.R. u. T.A. RUSSO (2002): Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: "The other bad *E. coli*". *J. Lab. Clin. Med.* 139, 155-162.

- KAHLMETER, G., D.F.J. BROWN, F.W. GOLDSTEIN, A.P. MACGOWAN, J.W. MOUTON, A. ÖSTERLUND, A. RODLOFF, M. STEINBAKK, P. URBASKOVA u. A. VATOPOULUS (2003): European harmonization of MIC breakpoints for antimicrobial susceptibility testing of bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.* 52, 145-148.
- KÄLLMAN O., F. FENDUKLY, I. KARLSSON u. G. KRONVALL (2003): Contribution of Efflux to Cefuroxim resistance in clinical isolates of *Escherichia coli*. *Scand. J. Infect. Dis.* 35, 464-470.
- KANAI, Y., H. HAYASHIDANI, K.-I. KANEKO, M. OGAWA, T. TAKAHASHI u. M. NAKAMURAT (1997): Occurrence of zoonotic bacteria in retail game meat in Japan with special reference to *Erysipelothrix*. *J. Food Prot.* 60, 328-331.
- KAPER, J.B., J.P. NATARO u. H.L.T. MOBLEY (2004): Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 123-140.
- KARMALI, M.A. (1989): Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 2, 15-38.
- KEMPER, N., A. ASCHFALK u. C. HÖLLER (2006): *Campylobacter* spp., *Enterococcus* spp., *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Yersinia* spp., and *Cryptosporidium* oocysts in semi-domesticated reindeer (*Rangifer tarandus tarandus*) in Northern Finland in Norway. *Acta Vet. Scand.* 48, 7.
- KEENE, W.E., E. SAZIE, J. KOK, D.H. RICE, D.D. HANCOCK, V.K. BALAN, T. ZHAO u. M.P. DOYLE (1997): An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections traced to jerky made from deer meat. *JAMA.* 277, 1229-1231.
- KINGSLEY, R.A. u. A.J. BÄUMLER (2000): Host adaptation and the emergence of infectious disease: the *Salmonella* paradigm. *Mol. Microbiol.* 36, 1006-1014.
- KLEIN, G. u. J. LOUWERS (1994): Mikrobiologische Qualität von frischem und gelagertem Hackfleisch aus industrieller Herstellung. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* 107, 361-367.
- KOBE, A. u. C. RING (1992): Zum Hygienestatus von Wildfleisch aus dem Handel. In: DVG, Arbeitstagung des Arbeitsgebietes „Lebensmittelhygiene“, 33, 434-441. 29. Sept. bis 2 Okt. 1992, Garmisch-Partenkirchen, Germany.

- KOLA, A., C. KOHLER, Y. PFEIFER, F. SCHWAB, K. KÜHN, K. SCHUTZ, V. BALAU, K. BREITBACH, A. BAST, W. WITTE, P. GASTMEIER u. I. STEINMETZ (2012): High prevalence of extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in organic and conventional retail chicken meat, Germany. *J. Antimicrob. Chemother.* 67, 2631-2634.
- KOO, H.-J u. G.-J WOO (2011): Distribution and transferability of tetracycline resistance determinants in *Escherichia coli* isolated from meat and meat products. *Int. J. Food Microbiol.* 145, 407-413.
- KOO, H.-J u. G.-J WOO (2012): Characterization of antimicrobial resistance of *Escherichia coli* recovered from foods of animal and fish origin in Korea. *J. Food Prot.* 75, 966-972.
- KORONKIEWICZ, A., E. DACZKOWSKA-KOZON, K. MARKIEWICZ, A. WOJCIECHOWSKA, E. ZMUDA u. W. DABROWSKI (2004): Game animals as carriers of enteric pathogens. *Folia Universitatis Agriculturae Stetinesis, Scientia Alimentaria.* 238, 79-84.
- KOZAK, G.K., P. BOERLIN, N. JANECKO, R.J. REID-SMITH u. C. JARDINE (2009): Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolates from swine and wild small mammals in the proximity of swine farms and in natural environments in Ontario, Canada. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 559-566.
- KRÖCKEL, L. u. H. HECHELMANN (1999): Mikrobiologie der Kühlung, Kühllagerung und Fleischreifung. *Fleischwirtsch.* 79, 90-93.
- KRUSE, H., A.-M. KIRKEMO u. K. HANDELAND (2004): Wildlife as source of zoonotic infections. *Emerg. Infect. Dis.* 10, 2067-2072.
- KRÜGER, M. (2002): Allgemeine Bakteriologie. In: ROLLE, M., A. MAYR: Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. Enke Verlag, Stuttgart.
- LI, Q., J.S. SHERWOOD u. C.M. LOGUE (2007): Characterization of antimicrobial resistant *Escherichia coli* isolated from processed bison carcasses. *J. Appl. Microbiol.* 103, 2361-2369.
- LI, R., J. LAI, Y. WANG, S. LIU, Y. LI, K. LIU, J. SHEN u. C. WU (2013): Prevalence and characterization of *Salmonella* species isolated from pigs, ducks and chickens in Sichuan Province, China. *Int. J. Food Microbiol.* 163, 14-18.

- LILLEHAUG, A., B. BERGSJØ, J. SCHAU, T. BRUHEIM, T. VIKØREN u. K. HANDELAND (2005): *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., verocytotoxic *Escherichia coli* and antibiotic resistance in indicator organisms in wild cervids. Acta Vet. Scand. 46, 23-32.
- LITERAK, I., M. DOLEJSKA, T. RADIMERSKY, J. KLIMES, M. FRIEDMAN, F.M. AARESTRUP, H. HASMAN u. A. CIZEK (2010): Antimicrobial-resistant faecal *Escherichia coli* in wild mammals in central Europe: multiresistant *Escherichia coli* producing extended-spectrum beta-lactamases in wild boars. J. Appl. Microbiol. 108, 1702-1711.
- LITTLE, C.L., J.F. RICHARDSON, R.J. OWEN, E. DE PINNA u. E.J. THRELFALL (2008): *Campylobacter* and *Salmonella* in raw red meats in the United Kingdom: Prevalence, characterization and antimicrobial resistance pattern, 2003-2005. Food Microbiol. 25, 538-543.
- LIVERMORE, D.M. (2012): Current epidemiology and growing resistance of gram-negative pathogens. Korean J. Intern. Med. 27, 128-142.
- LIVERMORE, D., T.G. WINSTANLEY u. K.P. SHANNON (2001): Interpretative reading: recognizing the unusual and inferring resistance mechanisms from resistance phenotypes. J. Antimicrob. Chemother. 48 (S1), 87-102.
- LUNING, P.A., L. JACXSENS, J. ROVIRA, S.M. OSÉS, M. UYTTENDAELE u. W.J. MARCELIS (2011): A concurrent diagnosis of microbiological food safety output and food safety management system performance: Cases from meat processing industries. Food Control. 22, 555-565.
- MAAHS, C. (2010): Untersuchung zur mikrobiologischen Qualität von Rehwild unter verschiedenen Kühlbedingungen. Hannover, Tierärztliche Hochschule, Diss.
- MADDEN, R.H., L. MORAN, P. SCATES, J. MCBRIDE u. C. KELLY (2011): Prevalence of *Campylobacter* and *Salmonella* in raw chicken on retail sale in the republic of Ireland. J. Food Prot. 74, 1912-1916.
- MANGES, A.R., S.P. SMITH, B.J. LAU, C.J. NUVAL, J.N.S. EISENBERG, P.S. DIETRICH u. L.W. RILEY (2007): Retail meat consumption and the acquisition of antimicrobial resistant *Escherichia coli* causing urinary tract infection: A case-control study. Foodborne Pathog. Dis. 4, 419-431.
- MARTINEZ, J.L. (2009): The role of natural environments in the evolution of resistance traits in pathogenic bacteria. Proc. R. Soc. B. 276, 2521-2530.

- MARTINEZ, J.L. u. F. BAQUERO (2000): Mutation frequencies and antibiotic resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 1771-1777.
- MAYNARD, C., S. BEKAL, F. SANSCHAGRIN, R.C. LEVESQUE, R. BROUSSEAU, L. MASSON, S. LARIVIÈRE u. J. HAREL (2004): Heterogeneity among virulence and antimicrobial resistance gene profiles of extraintestinal *Escherichia coli* Isolates of animal and human origin. *J. Clin. Microbiol.* 42, 5444-5452.
- MAYRHOFER, S., P. PAULSEN, F.J.M. SMULDERS u. F. HILBERT (2004): Antimicrobial resistance profile of five major food-borne pathogens isolated from beef, pork and poultry. *Int. J. Food Microbiol.* 97, 23-29.
- MAYRHOFER, S., P. PAULSEN, F.J.M. SMULDERS u. F. HILBERT (2006): Antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* isolated from muscle foods as related to the veterinary use of antimicrobial agents in food-producing animals in Austria. *Microb. Drug Resist.* 12, 278-283.
- MEMBRÉ, J.-M., M. LAROCHE u. C. MAGRAS (2011): Assessment of levels of bacterial contamination of large wild game meat in Europe. *Food Microbiol.* 28, 1072-1079.
- MEYER, C., M. HEURICH, I. HUBER, G. KRAUSE, U. ULLRICH u. A. FETSCH (2014): Die Bedeutung von Wildtieren als Reservoir für antibiotikaresistente Erreger in Bayern – erste Ergebnisse. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.* 127, 129-134.
- MIKO, A., K. PRIES, S. HABY, K. STEEGE, N. ALBRECHT, G. KRAUSE u. L. BEUTIN (2009): Assessment of shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from wildlife meat as potential pathogens for humans. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 6462-6470.
- MIRANDA, J.M., A.C. MONDRAGÓN, B. MARTÍNEZ, M. GUARDDON u. J.A. RODRIGUEZ (2009a): Prevalence and Antimicrobial resistance patterns of *Salmonella* from different raw foods in Mexico. *J. Food Prot.* 72, 966-971.
- MIRANDA, J.M., A. MONDRAGÓN, B.I. VÁZQUEZ, C.A. FENTE, A. CEPEDA u. C.M. FRANCO (2009b): Influence of farming methods on microbiological contamination and prevalence of resistance to antimicrobial drugs in isolates from beef. *Meat Sci.* 82, 284-288.
- MIRANDA, J.M., B.I. VÁZQUEZ, C.A. FENTE, P. CALO-MATA, A. CEPEDA u. C.M. FRANCO (2008): Comparison of Antimicrobial resistance in *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Listeria monocytogenes* strains isolated from organic and conventional poultry meat. *J. Food Prot.* 71, 2537-2542.

- MORA, A., C. LÓPEZ, G. DHABI, A.M. LÓPEZ-BECEIRO, L.E. FIDALGO, E.A. DÍAZ, C. MARTÍNEZ-CARRASCO, R. MAMANI, A. HERRERA, J.E. BLANCO, M. BLANCO u. J. BLANCO (2012): Seropathotypes, phylogroups, stx subtypes, and intimin types of wildlife-carried, shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains with the same characteristics as human-pathogenic isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 2578-2585.
- MOYAERT, H., A. DE JONG, S. SIMJEE u. V. THOMAS (2014): Antimicrobial resistance monitoring projects for zoonotic and indicator bacteria of animal origin: Common aspects and differences between EASSA and EFSA. *Vet. Microbiol.* 171, 279-283.
- MOORHEAD, S.M u. G.A. DYKES (2002): Survival of *Campylobacter jejuni* on beef trimmings during freezing and frozen storage. *Lett. Appl. Microbiol.* 34, 72-76.
- NATARO, J.P. u. J.B. KAPER (1998): Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 11, 142-201.
- NAVARRO-GONZALEZ, N., G. MENTABERRE, C.M. PORRERO, E. SERRANO, A. MATEOS, J.M. LÓPEZ-MARTÍN, S. LAVÍN u. L. DOMÍNGUEZ (2012): Effect of cattle on *Salmonella* carriage, diversity, and antimicrobial resistance in free-ranging wild boar (*Sus scrofa*) in northeastern Spain. *Plos One.* 7, e51614.
- O'BRIEN, T.F. (2002): Emergence, spread, and environmental effect of antimicrobial resistance: how use of antimicrobial anywhere can increase resistance to any antimicrobial anywhere else. *Clin. Infect. Dis.* 34 (S3), S78-84.
- OBWEGESER, T., R. STEPHAN, E. HOFER u. C. ZWEIFEL (2012): Shedding of foodborne pathogens and microbial carcass contamination of hunted wild ruminants. *Vet. Microbiol.* 159, 149-154.
- PATERSON, D.L. u. R.A. BONOMO (2005): Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases: a clinical update. *Clin. Microbiol. Rev.* 18, 657-688.
- PAULSEN, P. (2005): Zu erwartenden Keimzahlen bei Fleisch von Wildhuftieren aus freier Wildbahn. *Ernährung/Nutrition.* 29, 310-315.
- PAULSEN, P. (2011): Hygiene and microbiology of meat from wild game: An Austrian view. In: P. PAULSEN S, A. BAUER, M. VODNANSKY, R. WINKELMAYER u. F.J.M. SMULDERS: Game meat hygiene in focus: Microbiology, epidemiology, risk analysis and quality assurance. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, the Netherlands, S. 19-37.

- PAULSEN, P., F. BAUER, R. WINKELMAYER, F.J.M. SUMLDERS u. P. HOFBAUER (2005): Zu Qualitätsparametern von vakuumverpacktem Rehfleisch. *Fleischwirtsch.* 85, 114-117.
- PAULSEN, P., F. HILBERT, R. WINKELMAYER, S. MAYRHOFER, P. HOFBAUER u. F.J.M. SMULDERS (2003): Zur tierärztlichen Fleischuntersuchung von Wild, dargestellt an der Untersuchung von Rehen in Wildfleischbearbeitungsbetrieben. *Arch. Lebensmittelhyg.* 54, 137-140.
- PAULSEN, P., F.J.M. SMULDERS u. F. HILBERT (2011): *Salmonella* in meat from hunted game: A central European perspective. *Food Res. Int.* 45, 609-616.
- PAULSEN, P. u. R. WINKELMAYER (2004): Seasonal variation in the microbial contamination of game carcasses in an Austrian hunting area. *Eur. J. Wildl. Res.* 50, 157-159.
- PECCIO, A., T. AUTIO, H. KORKEALA, R. ROSMINI u. M. TREVISANI (2003): *Listeria monocytogenes* occurrence and characterization in meat-producing plants. *Lett. Appl. Microbiol.* 37, 234-238.
- PIÉRARD, D., L. VAN DAMME, L. MORIAU, D. STEVENS u. S. LAUWERS (1997): Virulence factors of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* isolated from raw meats. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 4585-4587.
- PHILLIPS, D., D. JORDAN, S. MORRIS, I. JENSON u. J. SUMNER (2008): A national survey of the microbiological quality of retail raw meats in Australia. *J. Food Prot.* 71, 1232-1236.
- POETA, P., H. RADHOUANI, L. PINTO, A. MARTINHO, V. REGO, R. RODRIGUES, A. GONÇALVES, J. RODRIGUES, V. ESTEPA, C. TORRES u. G. IGREJAS (2009): Wild boars as reservoirs of extended-spectrum beta-lactamases (ESBL) producing *Escherichia coli* of different phylogenetic groups. *J. Basic Microbiol.* 49, 584-588.
- PRADOS, F., A. PINO, F. RINCÓN, M. VIOQUE u. J. FERNÁNDEZ-SALGUERO (2006): Influence of the frozen storage on some characteristics of ripened Manchego-type cheese manufactured with a powdered vegetable coagulant and rennet. *Food Chem.* 95, 677-682.
- PRENDERGAST, D.M., S.J. DUGGAN, U. GONZALES-BARRON, S. FANNING, F. BUTLER, M. CORMICAN u. G. DUFFY (2009): Prevalence, numbers and characteristics of *Salmonella* spp. on Irish retail pork. *Int. J. Food Microbiol.* 131, 233-239.



- RABATSKY-EHR, T., D. DINGMAN, R. MARCUS, R. HOWARD, A. KINNEY u. P. MSHAR (2002): Deer meat as the source for a sporadic case of *Escherichia coli* O157:H7 infection, Connecticut. *Emerg. Infect. Dis.* 8, 525-527.
- REINARZT, M. (2011): Einfluss des Tiefgefrierens und der Tiefkühlagerung auf die Mikroflora von vier handelsüblichen Tiefkühlprodukten. Berlin, Freie Universität, Diss.
- RENTER, D.G., D.P. GNAD, J.M. SARGEANT u. S.E. HYGSTROM (2006): Prevalence and serovars of *Salmonella* in the faeces of free-ranging white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) in Nebraska. *J. Wildl. Dis.* 42, 699-703.
- REUTER, G. (1984): Die Problematik mikrobiologischer Normen bei Fleisch. *Arch. Lebensmittelhyg.* 35, 106-109.
- REUTER, G. (2008): Mikrobiologie des Fleisches. In: H. WEBER: Mikrobiologie der Lebensmittel- Fleisch – Fisch – Feinkost. 2. Aufl., Behr's Verlag, Hamburg, S. 1-111.
- ROBINS-BROWNE, R.M. u. E.L. HARTLAND (2002): *Escherichia coli* as a cause of diarrhea. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 17, 467-475.
- ROUNDS, J.M., C.E. RIGDON, L.J. MUHL, M. FORSTNER, G.T. DANZEISEN, B.S. KOZIOL, C. TAYLOR, B.T. SHAW, G.L. SHORT u. K.E. SMITH (2012): Non-O157 shiga toxin-producing *Escherichia coli* associated with venison. *Emerg. Infect. Dis.* 18, 279-282.
- RUSSO T.A. u. J.R. JOHNSON (2000): Proposal for an inclusive designation for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: ExPEC. *J. Infect. Dis.* 181, 1753-1754.
- RWEGO, I.B., G. ISABIRYE-BASUTA, T.R. GILLESPIE u. T.L. GOLDBERG (2008): Gastrointestinal bacterial transmission among humans, mountain gorillas, and livestock in Bwindi impenetrable national park, Uganda. *Conserv. Biol.* 22, 1600-1607.
- SÁNCHEZ, S., A. GARCÍA-SÁNCHEZ, R. MARTÍNEZ, J. BLANCO, J.E. BLANCO, M. BLANCO, G. DAHBI, A. MORA, J. HERMOSO DE MENDOZA, J.M. ALONSO u. J. REY (2009): Detection and characterisation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* other than *Escherichia coli* O157:H7 in wild ruminants. *Vet. J.* 180, 384-388.
- SÁNCHEZ, S., R. MARTÍNEZ, A. GARCÍA, D. VIDAL, J. BLANCO, M. BLANCO, J.E. BLANCO, A. MORA, S. HERRERA-LEÓN, A. ECHEITA, J.M. ALONSO u. J. REY (2010): Detection and characterisation of O157:H7 and non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in wild boars. *Vet. Microbiol.* 143, 420-423.

- SANNÖ, A., A. ASPÁN, G. HESTVIK u. M. JACOBSON (2014): Presence of *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis* and *Escherichia coli* O157:H7 in wild boars. *Epidemiol. Infect.* 6, 1-6.
- SARKIS, F., G.V. BARANCELLI u. C.-R. GALLO (2003): Avaliação das condições microbiológicas de carnes de animais silvestres no município de São Paulo. *Higiene Alimentar.* 17, 60-67.
- SASAKI, Y., T. GOSHIMA, T. MORI, M. MURAKAMI, M. HARUNA, K. ITO u. Y. YAMADA (2013): Prevalence and antimicrobial susceptibility of foodborne bacteria in wild boars (*Sus scrofa*) and wild deer (*Cervus nippon*) in Japan. *Foodborne Pathog. Dis.* 10, 985-991.
- SCHIERACK, P., A. RÖMER, J. JORES, H. KASPAR, S. GUENTHER, M. FILTER, J. EICHBERG u. L.H. WIELER (2009): Isolation and characterization of intestinal *Escherichia coli* clones from wild boars in Germany. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 695-702.
- SCHÜPPEL, H., K. FEHLHABER u. E. STRYCZEK (1994): Endogene Kontamination bei Schlachttieren (Literaturübersicht). *Berl. Munch. Tierarztl Wochenschr.* 107, 23-29.
- SCHWAIGER, K., C. HÖLZEL u. J. BAUER (2010): Resistance gene patterns of tetracycline resistant *Escherichia coli* of human and porcine origin. *Vet. Microbiol.* 142, 329-336.
- SCHWAIGER, K., S. HUTHER, C. HÖLZEL, P. KÄMPF u. J. BAUER (2012): Prevalence of antibiotic-resistant *Enterobacteriaceae* isolated from chicken and pork meat purchased at the slaughterhouse and at retail in Bavaria, Germany. *Int. J. Food Microbiol.* 154, 206-211.
- SCHWARZ, S. u. E. CHASLUS-DANCLA (2001): Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance. *Vet. Res.* 32, 201-225.
- SCHWARZ, S., C. KEHRENBERG, B. DOUBLET u. A. CLOECKAERT (2004): Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. *FEMS Microbiol. Rev.* 28, 519-542.
- SJÖLUND, M., J. BONNEDAHL, J. HERNANDEZ, S. BENGTSSON, G. CEDERBRANT, J. PINHASSI, G. KAHLMETER u. B. OLSEN (2008): Dissemination of multidrug-resistant bacteria into the arctic. *Emerg. Infect. Dis.* 14, 70-72.
- SHEIKH, A.A., S. CHECKLEY, B. AVERY, G. CHALMERS, V. BOHAYCHUK, P. BOERLIN, R. REID-SMITH u. M. ASLAM (2012): Antimicrobial resistance and resistance genes in *Escherichia coli* isolated from retail meat purchased in Alberta, Canada. *Foodborne Pathog. Dis.* 9, 625-631.

- SOFOS, J.N., S.L. KOCHEVAR, G.R. BELLINGER, D.R. BUEGE, D.D. HANCOCK, S.C. INGHAM, J.B. MORGAN, J.O. REAGAN u. G.C. SMITH (1999): Sources and extent of microbiological contamination of beef carcasses in seven United States slaughtering plants. *J. Food Prot.* 62, 140-145.
- STEPHAN, R. u. H. HÄCHLER (2012): Discovery of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase producing *Escherichia coli* among hunted deer, chamois and ibex. *Schweiz. Arch. Tierh.* 154, 475-478.
- STRALEY, S.C. u. R.D. PERRY (1995): Environmental modulation of gene expression and pathogenesis of *Yersinia*. *Trends Microbiol.* 3, 310-317.
- STÜBER, K., (2012): Reihenuntersuchung zur Fleischreifung und zum mikrobiologischen Status von Wildschweinfleisch und Hirschfleisch. Hannover, Tierärztliche Hochschule, Diss.
- SU, L.H. u. C.H. CHIU (2007): Salmonella: clinical importance and evolution of nomenclature. *Chang Gung Med. J.* 30, 210-219.
- SILVA, R.M., M.R.F. TOLEDO u. L.R. TRABULSI (1980): Biochemical and cultural characteristics of invasive *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 11, 441-444.
- TRAVIS, R.M., C.L. GYLES, R. REID-SMITH, C. POPPE, S.A. MCEWEN, R. FRIENDSHIP, N. JANECKO u. P. BOERLIN (2006): Chloramphenicol and kanamycin resistance among porcine *Escherichia coli* in Ontario. *J. Antimicrob. Chemother.* 58, 173-177.
- TRAVIS, D.A., R.P. WATSON u. A. TAUER (2011): The spread of pathogens through trade in wildlife. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 30, 219-239.
- TÜRCK, N.C. (2008): Sensorische und mikrobiologische Untersuchungen zur Beurteilung von Wildfleisch. Hannover, Tierärztliche Hochschule, Diss.
- VAARALA, A.M. u. H.J. KORKEALA (1999): Microbiological contamination of reindeer carcasses in different reindeer slaughterhouses. *J. Food Prot.* 62, 152-155.
- VANDAMME, P. u. H. GOOSSENS (1992): Taxonomy of *Campylobacter*, *Arcobacter*, and *Helicobacter*. A review. *Zentralbl. Bakteriol.* 276, 447-472.
- VAN den BOGAARD, A.E. u. E.E. STOBBERINGH (2000): Epidemiology of resistance to antibiotics links between animals and humans. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 14, 327-335.

- VAN der MERWE, M., L.C. HOFFMAN, P.J. JOOSTE u. F.J. CALITZ (2013): The hygiene practices of three systems of game meat production in South Africa in terms of animal class and health compliance. *Meat Sci.* 94, 145-152.
- VAN HOEK, A.H.A.M., D. MEVIUS, B. GUERRA, P. MULLANY, A.P. ROBERTS u. H.J.M. AARTS (2011): Acquired antibiotic resistance genes: an overview. *Front. Microbiol.* 2, 203. doi: 10.3389/fmicb.2011.00203.
- VIEIRA, A.R., P. COLLIGNON, F.M. AARESTRUP, S.A. MCEWEN, R.S. HENDRIKSEN, T. HALD u. H.C. WEGENER (2011): Association between antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolates from food animals and blood stream isolates from humans in Europe: An ecological study. *Foodborne Pathog. Dis.* 8, 1295-1301
- VIEIRA-PINTO, M., L. MORAIS, C. CALEJA, P. THEMUDO, C. TORRES, G. IGREJAS, P. POETA u. C. MARTINS (2011): Salmonella sp. in game (*Sus scrofa* and *Oryctogalus cuniculus*). *Foodborne Pathog. Dis.* 8, 739-740.
- VIPHAM, J.L., M.M. BRASHEARS, G.H. LONERAGAN, A. ECHEVERRY, J.C. BROOKS, W.E. CHANEY u. M.F. MILLER (2012): Salmonella and Campylobacter baseline in retail ground beef and whole-muscle cuts purchased during 2010 in the United States. *J. Food Prot.* 75, 2110-2115.
- WACHECK, S. (2008): Mikrobiologische und sensorische Untersuchung tiefgefrorenen Wildbrets im Hinblick auf die Festlegung mikrobiologischer Richtwerte. München, Ludwig-Maximilians-Universität, Diss.
- WACHECK, S., M. FREDRIKSSON-AHOMAA, M. KÖNIG, A. STOLLE u. R. STEPHAN (2010): Wild boars an important reservoir for foodborne pathogens. *Foodborne Pathog. Dis.* 7, 307-312.
- WAHLSTRÖM, H., E. TYSÉN, E. OLSSON ENGVALL, B. BRÄNDSTRÖM, E. ERIKSSON, T. MÖRNER u. I. VÅGSHOLM (2003): Survey of *Campylobacter* species, VTEC O157 and *Salmonella* species in Swedish wildlife. *Vet. Rec.* 153, 74-80.
- WALEY, S.G. (1987): An explicit model for bacterial resistance: application to  $\beta$ -lactam antibiotics. *Microbiol. Sci.* 4, 143-146.
- WANG, H.H., M. MANUZON, M. LEHMAN, K. WAN, H. LUO, T.E. WITTUM, A. YOUSEF u. L.O. BAKALETZ (2006): Food commensal microbes as a potentially important avenue in transmitting antibiotic resistance genes. *FEMS Microbiol. Lett.* 254, 226-231.

- WHEELER, E., P.-Y. HONG, L.C. BEDON u. R.I. MACKIE (2012): Carriage of antibiotic-resistant enteric bacteria varies among sites in galápagos reptiles. *J. Wildl. Dis.* 48, 56-67.
- WHO (2011): World Health Organization: Tackling antibiotic resistance from a food perspective. (zuletzt besucht am: 31. Juli 2013). [http://www.euro.who.int/\\_data/assets/pdf\\_file/0005/136454/e94889.pdf](http://www.euro.who.int/_data/assets/pdf_file/0005/136454/e94889.pdf).
- XIA X., J. MENG, S. ZHAO, S. BODEIS-JONES, S.A. GAINES, S.L. AYERS u. P.F. MCDERMOTT (2011): Identification and antimicrobial resistance of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* from retail meats. *J. Food. Prot.* 74, 38-44.
- ZHAO, C., B. GE, J. DE VILLENA, R. SUDLER, E. YEH, S. ZHAO, D.G. WHITE, D. WAGNER u. J. MENG (2001): Prevalence of *Campylobacter* spp., *Escherichia coli*, and *Salmonella* serovars in retail chicken, turkey, pork, and beef from the greater Washington, D.C., area. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 5431-5436.
- ZHAO, S., K. BLICKENSTAFF, S. BODEIS-JONES, S.A. GAINES, E. TONG u. P.F. MCDERMOTT (2012): Comparison of the prevalences and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolates from different retail meats in the United States, 2002 to 2008. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 1701-1707.
- ZIEGENFUSS, J. (2003): Hygienestatus von erlegtem Schwarzwild (*Sus scrofa scrofa*) im Wartburgkreis. Hannover, Tierärztliche Hochschule, Diss.
- ZOTTOLA, T., S. MONTAGNARO, C. MAGNAPERÀ, S. SASSO, L. DE MARTINO, A. BRAGAGNOLO, L. D'AMICI, R. CONDOLEO, G. PISANELLI, G. IOVANE u. U. PAGNINI (2012): Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Salmonella* in European wild boar (*Sus scrofa*); Latium Region – Italy. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 36, 161-168.
- ZWEIFEL, C., T. OBWEGESER u. R. STEPHAN (2012): Mikrobiologischer Status von Rotwild-, Rehwild-, und Gamswild-Schlachttierkörpern. *Fleischwirtsch.* 8, 99-102.

**Rechtstexte**

Richtlinie 92/117/EWG des Rates vom 17. Dezember 1992 über Maßnahmen zum Schutz gegen bestimmte Zoonosen bzw. ihre Erreger bei Tieren und Erzeugnissen tierischen Ursprungs zur Verhütung lebensmittelbedingter Infektionen und Vergiftungen (ABI. L 062, 15.03.1993, S. 0038-0048)

Verordnung (EG) Nr. 178/2002 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 28. Januar 2002 zur Festlegung der allgemeinen Grundsätze und Anforderungen des Lebensmittelrechts, zur Errichtung der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit und zur Festlegung von Verfahren zur Lebensmittelsicherheit. (ABI. EG Nr. L 31, 01.02.2002, S. 1)

Verordnung (EG) Nr. 852/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 29. April 2004 über Lebensmittelhygiene. (ABI. EG Nr. L 139, 30.04.2004, S. 1)

Verordnung (EG) Nr. 853/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 29. April 2004 mit spezifischen Hygienevorschriften für Lebensmittel tierischen Ursprungs. (ABI. EG Nr. L 139, 30.04.2004, S. 22)

Verordnung (EG) Nr. 854/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 29. April 2004 mit besonderen Verfahrensvorschriften für die amtliche Überwachung von zum menschlichen Verzehr bestimmten Erzeugnissen tierischen Ursprungs. (ABI. EG Nr. L 139, 30.04.2004, S. 83)

Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 der Kommission vom 15. November 2005 über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel. (ABI. EG Nr. L 338, 22.12.2005, S. 1)

## 12. ANHANG

**Anhangstabelle 1: Kennwerte zum Aufbau des Box-Whisker-Plots für die graphische Darstellung der aerob wachsenden Gesamtkeimzahl beim verpackten Rehwild, Rotwild und Wildschweinfleisch**

Tierart	Kennwerte in $\text{Log}_{10} \text{KbE}/\text{cm}^2$				
	Medianwert	Minimalwert	Maximalwert	Unteres Quartil	Oberes Quartil
Rehwild	4,70	2,35	6,65	4,19	5,44
Rotwild	4,86	1,65	6,98	4,28	5,42
Wildschwein	4,51	1,65	6,97	3,51	5,12

**Anhangstabelle 2: Kennwerte zum Aufbau des Box-Whisker-Plots für die graphische Darstellung der Zahl der *Enterobacteriaceae* beim verpackten Rehwild, Rotwild und Wildschweinfleisch**

Tierart	Kennwerte in $\text{Log}_{10} \text{KbE}/\text{cm}^2$				
	Medianwert	Minimalwert	Maximalwert	Unteres Quartil	Oberes Quartil
Rehwild	4,28	1,65	6,48	3,02	4,84
Rotwild	4,18	1,65	6,98	3,22	4,70
Wildschwein	3,82	1,65	6,14	2,65	4,58

**Anhangstabelle 3: Kennwerte zum Aufbau des Box-Whisker-Plots für die graphische Darstellung der Zahl der *E. coli* beim verpackten Rehwild, Rotwild und Wildschweinfleisch**

Tierart	Kennwerte in $\text{Log}_{10} \text{KbE}/\text{cm}^2$				
	Medianwert	Minimalwert	Maximalwert	Unteres Quartil	Oberes Quartil
Rehwild	1,31	0,65	3,40	0,95	1,95
Rotwild	1,84	0,65	3,18	1,50	2,31
Wildschwein	2,53	0,65	4,06	1,42	3,34

**Anhangstabelle 4: Prozentuale Einteilung der untersuchten Wildfleischproben anhand der aeroben mesophilen Gesamtkeimzahl gemäß VO (EG) 2073/2005 in befriedigend, akzeptabel und unbefriedigend**

Tierart	Prozentuale Einteilung (%)		
	befriedigend	akzeptabel	unbefriedigend
Rehwild	85,3	14,7	0,0
Rotwild	82,4	11,8	5,9
Wildschwein	88,4	8,7	2,9

**Anhangstabelle 5: Prozentuale Einteilung der untersuchten Wildfleischproben anhand des Gehalts an *E. coli* gemäß VO (EG) 2073/2005 in befriedigend, akzeptabel und unbefriedigend**

Tierart	Prozentuale Einteilung (%)		
	befriedigend	akzeptabel	unbefriedigend
Rehwild	77,9	16,2	5,9
Rotwild	56,9	37,3	5,9
Wildschwein	59,4	13,0	27,5

**Anhangstabelle 6: Darstellung der erhobenen MHK<sub>50</sub> und MHK<sub>90</sub>-Werte von *E. coli*-Isolaten aus Wildfleisch**

Wirkstoff	Rehwild (n=78)		Rotwild (n=75)		Wildschwein (n=76)	
	MHK <sub>50</sub>	MHK <sub>90</sub>	MHK <sub>50</sub>	MHK <sub>90</sub>	MHK <sub>50</sub>	MHK <sub>90</sub>
Ampicillin	4	8	4	8	4	8
Ampicilin/Sulbactam	≤2	≤2	≤2	≤2	≤2	≤2
Azlocilin	32	32	32	64	32	32
Mezlocillin	≤4	≤4	≤4	≤4	≤4	≤4
Piperacillin	≤4	≤4	≤4	8	≤4	8
Piperacilin/Tazobactam	≤4	8	≤4	8	≤4	8
Ticarcillin	≤8	≤8	≤8	≤8	≤8	≤8
Cefaclor	4	>4	4	>4	4	>4
Cefixim	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1
Cefuroxim	4	>4	4	>4	4	>4
Cefazolin	≤4	≤4	≤4	≤4	≤4	≤4
Cefotaxim	≤2	≤2	≤2	≤2	≤2	≤2
Cefoxitin	≤4	8	≤4	8	≤4	8
Cefoperazone	≤4	≤4	≤4	≤4	≤4	≤4
Cefotiam	≤4	≤4	≤4	≤4	≤4	≤4
Ceftazidim	≤4	≤4	≤4	≤4	≤4	≤4
Cefepim	≤4	≤4	≤4	≤4	≤4	≤4
Aztreonam	≤2	≤2	≤2	≤2	≤2	≤2
Gentamicin	≤1	2	≤1	2	≤1	2
Amikacin	≤4	8	≤4	8	≤4	8
Tobramycin	2	4	2	4	2	4
Doxycyclin	2	4	4	4	4	4
Chloramphenicol	≤8	≤8	≤8	≤8	≤8	≤8
Ofloxacin	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1
Ciprofloxacin	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1
Nitrofurantoin	≤64	≤64	≤64	≤64	≤64	≤64
Cotrimoxazol	≤16	≤16	≤16	≤16	≤16	≤16



**Anhangstabelle 7. Phänotypische Stoffwechseleigenschaften, die Mittels des API 20E-Systems bei *E. coli*-Isolaten aus Wildfleisch nachgewiesen wurden, und entsprechende API 20E-Zahlenprofile**

API 20E- Profil	Biochemische Reaktionen											
	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H <sub>2</sub> S	URE	TDA	IND	VP	GEL	OX
5144572	pos.*	-	pos.	pos.	-	-	-	-	pos.	-	-	-
5044572	pos.	-	pos.	-	-	-	-	-	pos.	-	-	-
5044552	pos.	-	pos.	-	-	-	-	-	pos.	-	-	-
5144552	pos.	-	pos.	pos.	-	-	-	-	pos.	-	-	-
4144512	-	-	pos.	pos.	-	-	-	-	pos.	-	-	-
5144562	pos.	-	pos.	pos.	-	-	-	-	pos.	-	-	-
5144752	pos.	-	pos.	pos.	-	-	-	-	pos.	-	-	-
1144512	pos.	-	-	pos.	-	-	-	-	pos.	-	-	-
5044772	pos.	-	pos.	-	-	-	-	-	pos.	-	-	-
5104572	pos.	-	pos.	pos.	-	-	-	-	-	-	-	-
5144772	pos.	-	pos.	pos.	-	-	-	-	pos.	-	-	-
7044552	pos.	pos.	pos.	-	-	-	-	-	pos.	-	-	-
5044542	pos.	-	pos.	-	-	-	-	-	pos.	-	-	-
5044573	pos.	-	pos.	-	-	-	-	-	pos.	-	-	-
5144532	pos.	-	pos.	pos.	-	-	-	-	pos.	-	-	-
5144762	pos.	-	pos.	pos.	-	-	-	-	pos.	-	-	-
7144572	pos.	pos.	pos.	pos.	-	-	-	-	pos.	-	-	-
1044552	pos.	-	-	-	-	-	-	-	pos.	-	-	-
1044572	pos.	-	-	-	-	-	-	-	pos.	-	-	-
1144572	pos.	-	-	pos.	-	-	-	-	pos.	-	-	-
1144762	pos.	-	-	pos.	-	-	-	-	pos.	-	-	-
4144572	-	-	pos.	pos.	-	-	-	-	pos.	-	-	-
5044153	pos.	-	pos.	-	-	-	-	-	pos.	-	-	-
5044753	pos.	-	pos.	-	-	-	-	-	pos.	-	-	-
5144172	pos.	-	pos.	pos.	-	-	-	-	pos.	-	-	-
5144512	pos.	-	pos.	pos.	-	-	-	-	pos.	-	-	-
5144542	pos.	-	pos.	pos.	-	-	-	-	pos.	-	-	-
5144553	pos.	-	pos.	pos.	-	-	-	-	pos.	-	-	-
7144562	pos.	pos.	pos.	pos.	-	-	-	-	pos.	-	-	-

ONPG:  $\beta$ -galactosidase, ADH: Arginin Dihydrolase, LDC: Lysin Decarboxylase, ODC: Ornithin Decarboxylase, CIT: Citratverwertung, H<sub>2</sub>S: H<sub>2</sub>S-Bildung, URE: Urease, TDA: Tryptophan Deaminase, IND: Indol-Bildung, VP: Acetoinbildung, GEL: Gelatinase, OX: Cythocrom-Oxidase

\*pos.: Positive Reaktion

**Anhangstabelle 8. Phänotypische Stoffwechseleigenschaften von *E. coli*-Isolaten aus Wildfleisch, in Bezug auf die Fähigkeit bestimmte Kohlehydrate abzubauen, und entsprechende API 20E-Zahlenprofile**

API 20E-Profil	Fermentation/Oxidation von Kohlehydraten								
	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA
5144572	pos.*	pos.	-	pos.	pos.	pos.	pos.	-	pos.
5044572	pos.	pos.	-	pos.	pos.	pos.	pos.	-	pos.
5044552	pos.	pos.	-	pos.	pos.	-	pos.	-	pos.
5144552	pos.	pos.	-	pos.	pos.	-	pos.	-	pos.
4144512	pos.	pos.	-	pos.	pos.	-	-	-	pos.
5144562	pos.	pos.	-	pos.	-	pos.	pos.	-	pos.
5144752	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	-	pos.	-	pos.
1144512	pos.	pos.	-	pos.	pos.	-	-	-	pos.
5044772	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	-	pos.
5104572	pos.	pos.	-	pos.	pos.	pos.	pos.	-	pos.
5144772	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	-	pos.
7044552	pos.	pos.	-	pos.	pos.	-	pos.	-	pos.
5044542	pos.	pos.	-	pos.	-	-	pos.	-	pos.
5044573	pos.	pos.	-	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.
5144532	pos.	pos.	-	pos.	pos.	pos.	-	-	pos.
5144762	pos.	pos.	pos.	pos.	-	pos.	pos.	-	pos.
7144572	pos.	pos.	-	pos.	pos.	pos.	pos.	-	pos.
1044552	pos.	pos.	-	pos.	pos.	-	pos.	-	pos.
1044572	pos.	pos.	-	pos.	pos.	pos.	pos.	-	pos.
1144572	pos.	pos.	-	pos.	pos.	pos.	pos.	-	pos.
1144762	pos.	pos.	pos.	pos.	-	pos.	pos.	-	pos.
4144572	pos.	pos.	-	pos.	pos.	pos.	pos.	-	pos.
5044153	pos.	pos.	-	-	pos.	-	pos.	pos.	pos.
5044753	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	-	pos.	pos.	pos.
5144172	pos.	pos.	-	-	pos.	pos.	pos.	-	pos.
5144512	pos.	pos.	-	pos.	pos.	-	-	-	pos.
5144542	pos.	pos.	-	pos.	-	-	pos.	-	pos.
5144553	pos.	pos.	-	pos.	pos.	-	pos.	pos.	pos.
7144562	pos.	pos.	-	pos.	-	pos.	pos.	-	pos.

GLU: Glukose, MAN: Mannit, INO: Inosit, SOR: Sorbit, RHA: Rhamnose, SAC Saccharose, MEL: Melibiose, AMY: Amygdalin, ARA: Arabinose

\*pos.: Positive Reaktion

### 13. DANKSAGUNG

Frau Prof. Dr. V. Atanassova, Institut für Lebensmittelqualität und –sicherheit des Zentrums für Lebensmittelwissenschaften der Tierärztlichen Hochschule Hannover, danke ich für die Überlassung des interessanten Themas, die fachliche Betreuung, die konstruktive Durchsicht und wissenschaftliche Anleitung der Dissertation, sowie für die freundliche Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Herrn Univ. –Prof. Dr. G. Klein, Institut für Lebensmittelqualität und –sicherheit des Zentrums für Lebensmittelwissenschaften der Tierärztlichen Hochschule Hannover, danke ich ebenfalls für die konstruktive Durchsicht der Dissertation und freundliche Unterstützung für die Durchführung der wissenschaftlichen Arbeit.

Ein besonderer Dank gilt den Angestellten des mikrobiologischen Labors des Instituts für Lebensmittelqualität und –sicherheit des Zentrums für Lebensmittelwissenschaften der Tierärztlichen Hochschule Hannover. Ich danke für die Unterstützung bei der Durchführung der mikrobiologischen Analyse, bei der Erstellung der Nährmedien, sowie für die Hilfsbereitschaft bei „alltäglichen“ Laborschwierigkeiten, aber insbesondere für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre, insbesondere: Birgit Führung, Andreas Schridde, Rouwen Stucke, Ina Vasen und Silke Schlote-Kohne. Des Weiteren danke ich Herrn Dr. Felix Reich für die Unterstützung bei der Durchführung der molekularbiologischen Untersuchungen sowie für den wissenschaftlichen Austausch.

Herzlich danke ich meinen Mitdoktoranden: Tatjana Wegener, Britta Werner, Dr. Kirsten Stüber, Dr. Meike Stüber und Franziska Schill für ihre Kollegialität, Hilfsbereitschaft, sowie Unterstützung bei Probenbearbeitung. Den Doktoranden und Angestellter anderer Abteilungen bin ich ebenfalls dankbar für die freundliche Arbeitsatmosphäre.

Des Weiteren bedanke ich mich bei dem Deutschen Akademischen Austausch Dienst (DAAD) für die finanzielle Förderung sowie bei allen Leuten, die direkt oder indirekt die Arbeit des DAAD unterstützen.

Meinen Freunden in Hannover und Costa Rica, besonders an Adriano, danke ich für den Rückhalt und Beistand, sowie Fröhlichkeit, mit der viele Momente unvergesslich geworden sind. Meiner neuen Familie, besonders: Heike, Johann und Ben Schustek, möchte ich ebenfalls für die moralische Unterstützung und hilfreiche Ratschläge bedanken.

Amada Lena, te agradezco de todo corazón el apoyo que me brindaste durante este tiempo. Te agradezco la paciencia, el servicio, la amistad, el entendimiento, la ayuda y tus consejos, los cuales fueron esenciales para poder finalizar de manera exitosa este periodo de mi vida. A ti también te agradezco amado hijo Theodor Rafael por la motivación y felicidad con la que me llenas todos los días.

Además de agradecerle a Dios por su compañía y bendiciones, les doy el más especial de mis agradecimientos a mis padres, Nubia y Rafael, no solo por el apoyo en muchos aspectos durante mi estadía en Alemania, sino también porque sin el grandioso ejemplo, los valores enseñados y el amor de hogar, no hubiera tenido las bases suficientes para alcanzar el termino satisfactorio de este reto. A mis hermanos: Julián, Angie, y Ana Lucía, a mis tíos, abuelos y primos agradezco también el apoyo incondicional, así como el ejemplo de persistencia y tenacidad necesarios para salir adelante. A todos ustedes les dedico esta tesis.