

2. Literaturübersicht

2.1. Gesetzliche Anforderungen an die Milchqualität

Zuständig für die Kontrolle von Lebensmitteln in Gambia ist der Direktor des *Department for Health Services* unter dem *Ministry for Health*. Genaue Pflichten des *Director of Health Services* werden im *Public Health Act* von 1989 beschrieben, wonach dieser unter anderem verantwortlich ist für Lebensmittelkontrolle im Sinne des öffentlichen Gesundheitswesens, für die Beschlagnahmung und Vernichtung von Lebensmitteln, die nicht dem *Public Health Act* entsprechen und für den Schutz der Öffentlichkeit vor Betrug in Zusammenhang mit Lebensmitteln. Der *Minister for Health* hingegen erlässt Vorschriften, die unter anderem die Produktion und den Verkauf von Lebensmitteln regeln und definiert Standards zur Produktidentifizierung, Zusammensetzung und Qualität von Lebensmitteln, die zum Verkauf angeboten werden. Im *Public Health Act* ist auch festgelegt, dass jede Person, die ein Geschäft hat oder Handel betreibt, ein gültiges Gesundheitszeugnis besitzen muss. Außerdem ist in diesem Gesetz vorgeschrieben, dass keine Person ungesunde oder für den menschlichen Verzehr ungeeignete Lebensmittel verteilen oder verkaufen darf. *Health Officers* sind befugt, Kontrollen durchzuführen und gegebenenfalls Lebensmittel zu beschlagnahmen oder zu vernichten. Ein Lebensmittelgesetz wurde dem Parlament vorgelegt und ist seit Februar 2006 ratifiziert. In diesem Gesetz werden Produkteigenschaften festgesetzt, die weitgehend den Standards der Codex Alimentarius Kommission entsprechen, welche auch in der EU gelten.

In Deutschland galten bis Ende 2005 das Lebensmittel- und Bedarfsgegenstände-Gesetz (LMBG) und die Milchverordnung. Die Untersuchungen, welche im Rahmen dieser Arbeit angestellt wurden stützen sich auf diese rechtlichen Vorgaben. Seit Januar 2006 hat sich allerdings die rechtliche Grundlage in Deutschland und der EU geändert. Anstelle des LMBG ist nun das Gesetz zur Neuordnung des Lebensmittel- und des Futtermittelrechts (LFGB) in Kraft getreten. Zweck dieses Gesetzes ist es „bei Lebensmitteln [...] den Schutz der Verbraucherinnen und Verbraucher durch Vorbeugung gegen eine oder Abwehr einer Gefahr für die menschliche Gesundheit sicherzustellen“ (LFGB Abschnitt 1 §1). Zu Fragen des Lebensmittelrechts und der Lebensmittelsicherheit in Ländern der EU wurden vom Europäischen Parlament und dem Rat der Europäischen Union mehrere Verordnungen erlassen. Darunter die Verordnung zur Festlegung der allgemeinen Grundsätze und Anforderungen des Lebensmittelrechts, zur Errichtung der Europäischen Behörde für

Lebensmittelsicherheit und zur Festlegung von Verfahren zur Lebensmittelsicherheit (Verordnung (EG) Nr. 178/2002), die Verordnung (EG) über Lebensmittelhygiene Nr. 852/2004 und über spezifische Hygienevorschriften für Lebensmittel tierischen Ursprungs Nr. 853/2004. Diese Verordnungen schaffen die Grundlage für ein hohes Schutzniveau für die Gesundheit des Menschen und die Verbraucherinteressen bei Lebensmitteln auf gemeinschaftlicher und einzelstaatlicher Ebene. Eine weitere Verordnung, (EG) Nr. 2073/2005, gestützt auf der Verordnung (EG) Nr. 852/2004, legt die mikrobiologischen Kriterien für bestimmte Mikroorganismen sowie die Durchführungsbestimmungen für Lebensmittelunternehmen fest. In dieser Verordnung werden Lebensmittelsicherheitskriterien festgelegt sowie Prozesshygienekriterien für Fleisch- und Fleischerzeugnisse, Milch- und Milcherzeugnisse, Eierzeugnisse, Fischerzeugnisse und Gemüse und Obst und daraus hergestellte Erzeugnisse. Im Unterschied zur ehemals gültigen Milchverordnung beziehen sich die mikrobiellen Kriterien dieser Verordnung auf Staphylokokken-Enterotoxine anstelle *Staphylococcus aureus* und bewerten eine Probe aus Milcherzeugnissen als unbefriedigend, sofern die Enterotoxine in einer Probeneinheit nachgewiesen werden. Für Käse aus Rohmilch gilt, dass, falls eine Probe zu einem Zeitpunkt während der Herstellung mehr als 10^5 koloniebildende Einheiten pro ml (KbE/ml) Koagulase-positive Staphylokokken enthält, die Partie Käse auf Staphylokokken-Enterotoxine untersucht werden muss. Für Milch, die einer Wärmebehandlung unterhalb der Pasteurisierungstemperatur unterzogen wurde, wird *E. coli* als Hygieneindikator herangezogen. Demnach darf Milch dieser Verarbeitungsmethode nicht mehr als 100 KbE/ml *E. coli* am Ende des Verfahrensprozesses enthalten.

Zur Bewertung der Untersuchungsergebnisse wurde für diese Arbeit die deutsche Milchverordnung respektive die EU-Milchhygiene Richtlinie 92/46/EWG herangezogen.

2.2. Aerobe Gesamtkeimzahl und Coliforme Keime

2.2.1. *Aerobe Gesamtkeimzahl*

Die aerobe Gesamtkeimzahl stellt neben dem Gehalt an somatischen Zellen einen wesentlichen Parameter zur Bewertung der hygienischen Beschaffenheit und Qualität von Milch dar. In vielen rechtlichen Vorschriften (EU-Richtlinie, Milchverordnung) wird demgemäß die Qualität der Milch auch an der Einhaltung eines bestimmten Grenzwertes

für die aerobe Gesamtkeimzahl gemessen. Tabelle 1 zeigt Ergebnisse verschiedener Untersuchungen zur Gesamtkeimzahl.

Tabelle 1: Untersuchungen zur Keimzahl von Rohmilch

Land	Zeitraum	Probenanzahl	Keimgehalt (KbE/ml)		Referenz
			£ 100 000	³ 100 000	
Deutschland	1986-1990	4563	2079 (45,6 %)	2484 (54,4%)	Suhren und Heeschen, 1992
Irland	1989-1990	386	273 (70,7%)	113 (29,3 %)	Rea <i>et al.</i> , 1992
Deutschland	1993-1994	415	241 (58,1 %)	174 (41,9%)	Specker, 1996

In tropischen Regionen liegen die durchschnittlichen Gesamtkeimzahlen in Rohmilch wesentlich höher, was hauptsächlich auf die hohen Außentemperaturen bei fehlender Kühlmöglichkeit und die allgemein ungünstigen hygienischen Umweltbedingungen zurückzuführen ist.

Für Afrika untersuchten GODEFAY und MOLLA (2000) 60 Sammelproben aus vier milchproduzierenden Betrieben und einer zentralen Milchsammelstelle im Einzugsbereich von Addis Abeba, Äthiopien. Um die bakteriologische Qualität der Rohmilch zu bestimmen, wurden die mesophile aerobe Gesamtkeimzahl und der Coliformen-Gehalt ermittelt. Die durchschnittliche mesophile aerobe Gesamtkeimzahl der vier Farmen lag bei $3,4 \times 10^6$ KbE/ml, die der Milchsammelstelle lag bei $1,3 \times 10^7$ KbE/ml. KARIMURIBO *et al.* (2005) untersuchten 89 Rohmilchproben in zwei Distrikten von Tansania, Dodoma und Mvomero. Die durchschnittliche aerobe Gesamtkeimzahl lag bei 1×10^7 KbE/ml in Dodoma und bei $8,9 \times 10^5$ KbE/ml in Mvomero. Ähnliche Ergebnisse wurden aus Kenia berichtet. MWANGI *et al.* (2000) untersuchten Rohmilchproben von 162 Milchverkäufern in Nairobi und Kiambu, um kritische Kontrollpunkte zu identifizieren. Die Gesamtkeimzahl von 82 % der Proben lag über dem nationalen Standard von 2×10^6 KbE/ml.

Im Rahmen einer Studie über Risiken für den Endverbraucher von Milch, die ebenfalls in Kenia durchgeführt wurde (OMORE *et al.*, 2002), wurde die Milchqualität an verschiedenen Verkaufsstellen und in Haushalten verglichen. Das geometrische Mittel der Gesamtkeimzahl der Milch, die direkt von den Farmern verkauft wurde, lag bei 8×10^6 KbE/ml, was 3-5 mal unter dem Durchschnitt aller Werte lag. Milch von ländlichen Haushalten (Nakuru) hatte eine durchschnittliche Gesamtkeimzahl von $1,3 \times 10^6$ KbE/ml, 25 mal weniger als in Milch städtischer Haushalte. Die Keimzahlen an den verschiedenen

Milchverkaufsstellen lagen zwischen 4×10^7 KbE/ml bei mobilen Händlern und 8×10^7 KbE/ml bei sogenannten *milkbars*. Ähnliche Ergebnisse fanden auch BONFOH *et al.* (2003a), die 490 Milchproben von lokalen Märkten in Mali untersuchten, deren durchschnittliche Gesamtkeimzahl bei $4,9 \times 10^7$ KbE/ml lag. Wesentlich höher allerdings waren die durchschnittlichen Gesamtkeimzahlen bei einer Studie in Äthiopien. SCHÖNE (1996) untersuchte in Debre Zeit 55 Rohmilchproben, deren durchschnittliche Gesamtkeimzahl bei $8,7 \times 10^9$ KbE/ml ($5,3 \times 10^4$ - $4,5 \times 10^{14}$) lag. Ähnlich hohe Zahlen fanden PANDEY *et al.* (1996), die Rohmilchproben von 95 Farmen in Zambia untersuchten. Deren durchschnittliche Gesamtkeimzahl lag zwischen $4,6 \times 10^7$ KbE/ml und $1,4 \times 10^9$ KbE/ml. Auch aus Trinidad wurden ähnliche Ergebnisse berichtet. Durchschnittliche Gesamtkeimzahlen von 507 Rohmilchproben lagen zwischen $5,8 \times 10^5$ KbE/ml und $5,7 \times 10^8$ KbE/ml (ADESIYUN, 1994).

2.2.2. Coliforme Keime

Die coliformen Bakterien sind eine heterogene Bakteriengruppe: Es sind gram-negative, aerobe, fakultativ anaerobe Stäbchen, die Laktose unter Gas- und Säurebildung innerhalb von 48 Stunden bei Temperaturen zwischen 30°C und 37°C fermentieren. Zur Gruppe der Coliformen gehören folgende Genera der Familie *Enterobacteriaceae*: *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella* und *Citrobacter*. Coliforme Keime, die bei 44°C beziehungsweise $45,5^\circ\text{C}$ Gas aus Laktose bilden, werden auch als Fäkal-Coliforme, thermotrophe Coliforme oder präsumptive *E.coli* bezeichnet (HITCHINS *et al.*, 1995). Während der Aussagewert der Coliformen als Indikatororganismen für zahlreiche Lebensmittel umstritten ist, steht der Wert von *Escherichia coli* als Markerorganismus außer Frage (SCHMIDT-LORENZ und SPILLMANN, 1988).

Coliforme Bakterien sind Kontaminanten in Milchprodukten aus pasteurisierter Milch. Ihre Präsenz ist ein Indikator für unhygienische Herstellungsverfahren oder für ungenügende Pasteurisierung oder Kontamination nach der Pasteurisierung (VECCHIONACCE *et al.*, 1978). Eine Kontamination nach der Pasteurisierung durch verunreinigte Ausrüstungsgegenstände oder unhygienische Praktiken kann zu Kontaminationen von 10^1 - 10^2 coliformen Keimen pro ml pasteurisierter Milch führen.

Im Rahmen der bereits erwähnten Studie in Deutschland von SUHREN und HEESCHEN (1992) wurden bei 1.211 Proben auch Untersuchungen auf den Gehalt an coliformen Keimen durchgeführt. Ihr mittlerer Gehalt betrug 347 pro ml Rohmilch.

Ähnlich niedrige Keimzahlen stellte SPECKER (1996) fest. Er fand in 374 Rohmilchproben einen durchschnittlichen Gehalt an coliformen Keimen in Höhe von $9,3 \times 10^2$ KbE/ml.

REA *et al.* (1992) isolierten bei ihren Untersuchungen in Irland aus allen 386 Rohmilchproben coliforme Keime. Allerdings enthielten ungefähr 70% der Proben weniger als 100 coliforme Keime pro ml Milch. Auch JAYARAO *et al.* (2004) fanden bei der Untersuchung von 1.077 Sammelmilchproben in den USA einen durchschnittlichen Gehalt von nur 70 KbE coliformer Keime pro ml.

Eine höhere Keimzahl fanden TORRAR und TEGER (2004) bei einer mikrobiologischen Studie zur Käseherstellung in Slowenien. Sie fanden durchschnittlich $3,4 \times 10^5$ KbE/ml coliforme Keime.

Die bereits erwähnte Studie in Zambia (PANDEY *et al.*, 1996) untersuchte auch den Gehalt an coliformen Keimen und fand durchschnittliche Keimzahlen zwischen $1,1 \times 10^6$ KbE/ml und $1,6 \times 10^7$ KbE/ml. Ähnlich hohe Keimzahlen ($1,4 \times 10^6$ KbE/ml) fanden BONFOH *et al.* (2003a) bei der Untersuchung von 490 Milchproben von Märkten in Mali. KARIMURIBO *et al.* (2005) untersuchten 89 Rohmilchproben in Tansania auf coliforme Keime. Der durchschnittliche Gehalt lag zwischen $1,3 \times 10^6$ KbE/ml in Dodoma und 1×10^6 KbE/ml in Mvomero.

Geringere durchschnittliche Keimzahlen ($2,5 \times 10^4$ KbE/ml) fanden HASSAN und AL-SANJARI (1999) bei der Untersuchung von 95 Milchproben im Irak.

Ähnliche Ergebnisse wurden auch von GODEFAY und MOLLA (2000) für Äthiopien berichtet, deren Milchproben durchschnittlich zwischen $1,3 \times 10^4$ und $7,1 \times 10^4$ coliforme Keime/ml enthielten.

MWANGI *et al.* (2000) untersuchten Rohmilchproben von 162 Marktverkäufern in Kenia und fanden durchschnittliche Konzentrationen von 1×10^2 und $1,5 \times 10^3$ KbE/ml.

Bei der bereits erwähnten Studie in Mali (BONFOH *et al.*, 2003a) wurden auch Proben natürlich fermentierter Milch untersucht, die durchschnittlich $7,8 \times 10^3$ KbE/ml coliforme Keime enthielt.

2.3. Escherichia coli

2.3.1. Taxonomie

Escherichia (E.) coli gehört zur Familie der *Enterobacteriaceae* und ist die wichtigste Spezies des Genus *Escherichia* (ØRSKOV, 1984). *E. coli* gilt als Indikatorkeim, der auf die mögliche Anwesenheit von Pathogenen fäkaler Herkunft hinweist.

2.3.2. Morphologie, Kultur und biochemische Eigenschaften

Nach ØRSKOV (1984) sind *E. coli* gramnegative, nicht sporenbildende Stäbchen, 1,1-1,5 x 2,0-6,0 µm groß. Viele Stämme sind durch peritriche Begeißelung beweglich, auch liegt oft Kapselbildung vor.

Mehrere Kolonieförmigkeiten werden unterschieden:

1. S (smooth)- Form: leicht konvex, grauweiß mit feuchter, glänzender Oberfläche und glattem Rand
2. R (rough)-Form: trocken mit rauer Oberfläche und gezähntem Rand
3. schleimproduzierende Formen

E. coli ist Oxidase-negativ und Katalase-positiv. Die meisten Isolate wachsen optimal bei 37°C, die niedrigste Wasseraktivität (a_w -Wert) liegt bei 0.95.

Zur Differenzierung der Coliformen untereinander kann neben der IMViC-Reihe (Indolbildung, Methylrot-Reaktion, Voges-Proskauer-Reaktion und Citratverwertung) ein Nachweisverfahren für das Enzym β -Glucuronidase, über welches *E. coli* verfügt, genutzt werden (FENG und HARTMANN, 1982; WATKINS *et al.*, 1988).

Die Serotypisierung ist die wichtigste Form der Klassifizierung von *E. coli*-Stämmen (ØRSKOV *et al.*, 1977; ØRSKOV, 1984; ØRSKOV *et al.*, 1991).

2.3.3. Darmpathogene *E. coli*

Außer den apathogenen *E. coli*, die physiologisch im Darm von Mensch und Tier vorkommen (10^5 - 10^9 /g Stuhl), existieren mehrere Typen Diarrhöe-auslösender *E. coli*. Sämtliche Stämme von *E. coli*, die das Potenzial haben, eine solche Durchfallerkrankung auszulösen, werden als enteropathogene *E. coli* definiert (KORNACKI und MARTH, 1982). Unterschieden werden enteropathogene *E. coli* (EPEC), enteroinvasive *E. coli* (EIEC), enterotoxinbildende *E. coli* (ETEC), enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC),

enteroaggregative *E. coli* (EAggEC) und diffus adhäsive *E. coli* (DAEC) (SCALETSKI *et al.*, 1984; LEVINE, 1987; DONNENBERG und KAPER, 1992; LEVINE *et al.*, 1993).

ETEC produzieren hitzelabile (LT) und hitzestabile (ST) Toxine. Die hitzelabilen Toxine sind oligomere Proteine. LT 1 ist dem Cholera-Toxin sehr ähnlich (CLEMENTS und FINCKELSTEIN, 1978; GILL *et al.*, 1981; PICKETT *et al.*, 1986). Bei den hitzestabilen Toxinen hingegen handelt es sich um Haptene (MADSEN und KNOOP, 1980; PICKEN *et al.*, 1983). Eine Vielzahl von Serotypen ist bekannt (LEVINE, 1987).

Erste Voraussetzung für die Pathogenität von EHEC ist die Fähigkeit zur Bildung von Verotoxin. Verotoxin 1 (VT1) und Verotoxin 2 (VT2) werden als Hauptgruppen unterschieden. VT1 ist mit Shiga-Toxin-Antiserum neutralisierbar. Aus diesem Grunde wurde auch der Begriff Shiga-like Toxin (SLT) verwendet (O'BRIEN *et al.*, 1982; SCOTLAND *et al.*, 1983; SMITH *et al.*, 1983; SMITH *et al.*, 1984; O'BRIEN *et al.*, 1984; STROCKBINE *et al.*, 1986; MARQUES *et al.*, 1987; GYLES, 1992). Inzwischen ist die Bezeichnung shigatoxinbildende *E. coli* (STEC) verbreitet.

Außer durch das Verotoxinbildungsvermögen wird die Pathogenität durch weitere Virulenzfaktoren bedingt. Dazu zählen u.a. das Vorhandensein des *eae*-Gens (*E. coli attaching and effacing*) und die Fähigkeit zur Bildung von Enterohämolysin (KARCH *et al.*, 1987; LEVINE *et al.*, 1987; YU und KAPER, 1992; SCHMIDT *et al.*, 1995; BEUTIN, 1998; BOCKEMÜHL *et al.*, 1998; GALLIEN *et al.*, 1998; DE VINNEY *et al.*, 1999). Viele dieser Virulenzfaktoren werden durch mobile genetische Elemente codiert. Da diese unterschiedlich kombinierbar sind, ist eine Vielzahl von verotoxinbildenden *E. coli*-Varianten entstanden (BOCKEMÜHL und KARCH, 1996; BOCKEMÜHL *et al.*, 1997).

Aus Sicht der Lebensmittelhygiene sind verotoxinbildende *E. coli* (VTEC) pathogene Erreger mit unterschiedlicher Virulenz. Entsprechend einer Empfehlung des ehemaligen Bundesinstituts für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV), jetzt Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR), sind derzeit alle VTEC, die aus Lebensmitteln oder Tieren isoliert werden, als potentielle EHEC zu betrachten (RICHTER *et al.*, 1998). Welche Virulenzfaktoren entscheidend sind, ist noch nicht ausreichend erklärt (GALLIEN *et al.*, 1998). Allerdings ist die Wahrscheinlichkeit, dass es sich um EHEC handelt, bei Vorliegen des Verotoxinbildungsvermögens, des *eae*-Gens sowie der Fähigkeit zur Bildung von Enterohämolysin bereits sehr groß.

2.3.4. Erkrankungen bei Mensch und Tier

Klassische enteropathogene *E. coli* (EPEC) verursachen v.a. Durchfallerkrankungen bei Kleinkindern. Laut CLARKE *et al.* (2002) gibt es bei Kindern unter fünf Jahren in Entwicklungsländern (China ausgenommen) jährlich 117 Millionen Durchfallerkrankungen, die durch EPEC hervorgerufen wurden und mit hohen Mortalitätsraten verbunden sind. Die Infektion erfolgt meist fäkal-oral über kontaminierte Hände und Lebensmittel. Im Dünndarm heften sich die Organismen an die Epithelzellen an und injizieren ihre Virulenzfaktoren in die Zellen (VALLANCE *et al.*, 2002). Eine Erkrankung erfolgt, wenn die injizierten Virulenzfaktoren mit den Zellbestandteilen der Epithelzellen interagieren und die Signalwege der Wirtszelle ändern (VALLANCE und FINLAY, 2000). Das EAF Plasmid (EPEC *adherence factor*) kodiert BFP (*bundle-forming pilus*), welches für die Anheftung und Virulenz verantwortlich ist. Anschließend produzieren EPEC Proteine, welche Läsionen hervorrufen, die als A/E-Läsionen (*attaching and effacing*) bezeichnet werden. Manche EPEC Stämme produzieren außerdem Lymphostatin, ein Toxin, das die Proliferation und Aktivierung von Lymphozyten hemmt und die Immunreaktion unterdrückt, was zu einer verlängerten Infektion führt (KLAPPROTH *et al.*, 2000).

Bei Kleinkindern entwickeln sich Fieber, Erbrechen, abdominale Schmerzen und Durchfall, der über mehrere Wochen anhalten kann (LEVINE, 1987). Bei Erwachsenen sind die Symptome weniger stark. Nach 17-72 Stunden zeigt sich ein starker, wässriger Durchfall mit Schleim, häufig begleitet von Übelkeit, Erbrechen, abdominalen Krämpfen, Kopfschmerzen, Fieber und Schüttelfrost. Sehr ernste Erkrankungen können auch tödlich enden (VALLANCE und FINLAY, 2000; WILLSHAW *et al.*, 2000; CLARKE *et al.*, 2002). Die Symptome verschwinden nach 6-72 Stunden. Als infektiöse Dosis werden 10^8 – 10^{10} Keime angegeben, doch ist sie bei Kindern vermutlich geringer (CLARKE *et al.*, 2002).

Enterotoxigene *E. coli* (ETEC) sind Stämme, die entweder ein hitzestabiles (ST) oder ein hitzelabiles (LT) oder beide Enterotoxine bilden. LT-Toxin ähnelt immunologisch dem Enterotoxin von *Vibrio cholera* und hat ein Molekulargewicht von etwa 95kD (CLEMENTS und FINKELSTEIN, 1979). ST-Toxin hat ein Molekulargewicht von etwa 10 kD (BURGESS *et al.*, 1978). SACK (1978) beschreibt drei klinische Krankheitsbilder, die von ETEC induziert werden können. Das schwerste Krankheitsbild ähnelt stark der durch *Vibrio cholera* verursachten Cholera und kann ebenso tödlich verlaufen. Es tritt auch

meistens in Gebieten auf, in denen Cholera endemisch ist. Eine mildere Verlaufsform ist der sogenannte Reisedurchfall. Reisende aus Industrieländern entwickeln diese Durchfallerkrankung sehr häufig (30-60%) in den ersten drei Wochen ihres Aufenthaltes in Entwicklungsländern. Das dritte Krankheitsbild ist Durchfall bei Kleinkindern, meist in Entwicklungsländern.

DUPONT *et al.* (1971) untersuchten die Pathogenität von ETEC und fanden eine inzwischen allgemein akzeptierte minimale Infektionsdosis von 10^8 – 10^{10} ETEC.

Enteroinvasive *E. coli* (EIEC) sind *Shigella*-ähnliche Organismen, die in die Epithelzellen des Kolons eindringen und sich dort vermehren. Dabei zerstören sie angrenzende Zellen und bewirken eine Erosion oder Ulzeration des Epitheliums, was eine Erkrankung ähnlich der Shigellose verursacht (GRAY, 1995). EIEC-Infektionen ähneln dem oben genannten Reisedurchfall: Sie treten meistens bei Erwachsenen auf Reisen auf, die sich schnell ohne medizinische Behandlung erholen. Symptome entwickeln sich 8-24 Stunden nach der Aufnahme von 10^6 - 10^8 EIEC (WILLIAMS *et al.*, 1988) mit starkem Durchfall, begleitet von Schüttelfrost, Fieber, Kopfschmerzen, Muskelschmerzen und abdominalen Krämpfen. Weniger häufig sind im Stuhl Blut, Schleim und Leukozyten enthalten.

Die Virulenz von enterohämorrhagischen *E. coli* (EHEC) basiert auf der Produktion von mehreren Shiga-Toxinen (Stx 1, Stx 2 und Varianten), intestinaler Kolonisierung, Produktion von Läsionen (ähnlich EPEC) und der Präsenz des Plasmids pO157 (LEBLANC, 2003). Shiga-Toxine tragen zu entzündlichen Reaktionen und der Pathologie von EHEC-Erkrankungen bei, da die Toxine die Bildung von Chemokinen und Cytokinen durch Epi- und Endothelzellen bewirken können (CHERLA *et al.*, 2003; MATUSSEK *et al.*, 2003). Die Entwicklung einer hämorrhagischen Kolitis oder eines hämolytisch-urämisches Syndroms könnte mit der durch die Shiga-Toxin induzierten Produktion einer Apoptosis zusammenhängen (CHERLA *et al.*, 2003). Verschiedene EHEC Serogruppen (O26, O111, O103, O118, O145 mit verschiedenen H-Antigenen und H157:H7) wurden in Zusammenhang mit Erkrankungen beim Menschen gebracht. Der wichtigste Serotyp in Lebensmitteln ist O157:H7, welcher für zahlreiche lebensmittel- und wasserbedingte Ausbrüche verantwortlich ist. Dieser Serotyp ähnelt den meisten anderen *E. coli* mit wenigen wichtigen Ausnahmen: Er wächst optimal zwischen 30°C und 42°C und nur sehr schlecht bei 44°C bis 45,5°C (DOYLE und SCHOENI, 1984; BUCHANAN und

KLAWITTER, 1992), weshalb er bei Routineuntersuchungen auf fäkale coliforme Keime meist nicht entdeckt wird. Außerdem fehlt ihm das Enzym Glukuronidase, das 92-96% der anderen *E. coli*-Stämme besitzen und im Gegensatz zu 80-93% der anderen *E. coli* kann O157:H7 D-Sorbitol nicht innerhalb von 24 Stunden spalten (RYSER, 2001). Diese beiden biochemischen Unterschiede sind wichtig bei der Untersuchung von Proben auf *E. coli* O157:H7

Verglichen mit anderen Lebensmittelinfektionen oder -intoxikationen sind die Infektionen mit EHEC besonders schwerwiegend. Das klinische Bild reicht von milden, unblutigen Durchfällen zu hämorrhagischer Kolitis und hämolytisch-urämischem Syndrom (HUS). HUS ist gekennzeichnet durch eine Trias von Symptomen: akutes Nierenversagen, Thrombozytopenie und mikroangiopathische hämolytische Anämie, die alle im Zusammenhang mit der Fähigkeit des Keims stehen, sich im Verdauungskanal anzuheften und ein oder zwei Verotoxine zu produzieren (RILEY *et al.*, 1983; GRIFFIN *et al.*, 1988; GRIFFIN und TAUXE, 1991; PADHYE und DOYLE, 1992; GRAY, 1995). Die Infektionsdosis für EHEC mit weniger als 50 Organismen ist außerdem sehr gering (TILDEN *et al.*, 1996; TUTTLE *et al.*, 1999).

Hämorrhagische Kolitis ist gekennzeichnet von plötzlich auftretenden abdominalen Schmerzen, gefolgt von erst wässrigem, schließlich blutigem Durchfall. Erbrechen kann ebenfalls auftreten, jedoch Fieber meistens nicht. Die Inkubationszeit liegt zwischen drei und fünf Tagen, Symptome halten zwei bis neun Tage an und verschwinden danach auch ohne Behandlung.

Das hämolytisch-urämische Syndrom entwickelt sich in 2-7% der Fälle aus einer hämorrhagischen Kolitis und ist die häufigste Ursache für akutes Nierenversagen bei Kindern (KARMALI *et al.*, 1983). Dieses Syndrom zeichnet sich durch hämolytische Anämie, Thrombozytopenie und Nierenversagen aus, die in ansonsten gesunden Individuen auftreten. Patienten benötigen häufig Dialyse und Bluttransfusionen. Komplikationen wie Herzversagen, Krampfanfälle und Koma, aus dem 3-10% der Patienten nicht mehr aufwachen, können auftreten (GRAY, 1995).

Das dritte Erscheinungsbild, die thrombotisch-thrombozytopenische Purpura (TTP), ähnelt dem hämolytisch-urämischem Syndrom mit dem Unterschied, dass sich Fieber und zentralnervöse Störungen entwickeln. Patienten können auch an Thrombosen im Gehirn sterben.

Laut Jahresstatistik des Robert-Koch-Instituts (RKI) für das Jahr 2005 wurden in Deutschland 5.881 Erkrankungen durch darmpathogene *E. coli* (ohne EHEC) und 1.162 EHEC-Erkrankungen (außer HUS) gemeldet (RKI, 2006). Für 17 Mitgliedsstaaten der EU, wurden von der EFSA (European Food Safety Authority) für das Jahr 2004 4.143 Fälle von VTEC-Infektionen berichtet, mit einer Inzidenz von 1,3 Fällen pro 100.000 Einwohnern (EFSA, 2006).

Tabelle 2 gibt einen Überblick über Berichte von Erkrankungen durch den Konsum von Milchprodukten, die mit enteropathogenen *E. coli* kontaminiert waren.

Tabelle 2: Lebensmittelinfektionen durch enteropathogene *E. coli*

Land	Jahr	Anzahl Patienten	Isolierter Keim	Infektionsquelle	Referenz
USA	1971	387	EIEC	Käse	Barnard und Callahan., 1971; Marier <i>et al.</i> , 1973; Schnurrenberger und Pate, 1971; Tulloch <i>et al.</i> , 1973
USA, Dänemark, Schweden, Niederlande	1983	169	ETEC	Käse	Francis und Davis, 1984; Levy, 1983; MacDonald <i>et al.</i> , 1985
Kanada	1986	60	<i>E. coli</i> O157:H7	Rohmilch	Borczyk <i>et al.</i> , 1987
USA	1986	2	<i>E. coli</i> O157:H7	Rohmilch	Martin <i>et al.</i> , 1986
England	1991	16	<i>E. coli</i> O157:H7	Joghurt	Morgan <i>et al.</i> , 1993
USA	1992	9	<i>E. coli</i> O157:H7	Rohmilch	Bleem, 1994
USA	1993	5	<i>E. coli</i> O157:H7	Rohmilch	Bleem, 1994
USA	1994	18	<i>E. coli</i> O104:H21	Pasteurisierte Milch	Moore <i>et al.</i> , 1995; CDC, 1995
England	2000	6	<i>E. coli</i> O157 VTEC	Rohmilch	PHLS Communicable Diseases Surveillance Centre, 2000
England	2001	114	<i>E. coli</i> O157 VTEC	Pasteurisierte Milch	Goh <i>et al.</i> , 2002
Slovakei	2002	9	<i>E. coli</i> O157 VTEC	Rohmilch	Liptakova <i>et al.</i> , 2004

Kanada	2002	13	<i>E. coli</i> O157:H7	Rohmilchkäse	Anonym, 2003a; Honish <i>et al.</i> , 2005
Dänemark	2004	25	<i>E. coli</i> O157:H-	Milch	Jensen <i>et al.</i> , 2006
USA	2005	18	<i>E. coli</i> O157:H7	Rohmilch	Anderberg und Smith, 2005; Anonym, 2006
Frankreich	2005	6	<i>E. coli</i> O26	Rohmilchkäse	Mercer, 2005

Das wichtigste Reservoir für VTEC sind Fleisch- und Milchrinder. Obwohl eine frühe Studie angab, dass 2-6% der Milchkühe *Escherichia coli* O157:H7 mit dem Kot ausscheiden (WELLS *et al.*, 1991), wird inzwischen davon ausgegangen, dass diese Rate viel höher ist, insbesondere während der Sommermonate.

BEUTIN *et al.* (1993) und GALLIEN *et al.* (1994) stellten fest, dass in Deutschland neben Rindern und Schweinen auch andere Haustiere wie Schafe, Ziegen, Hunde und Katzen als Überträger von VTEC in Betracht kommen.

Auch kontaminierte pflanzliche Produkte sind potentielle Infektionsquellen (BESSER *et al.*, 1993; WHO, 1996).

Von zunehmender Bedeutung ist die Übertragung von Person-zu-Person (PAI *et al.*, 1984; KARCH *et al.*, 1995; BEUTIN, 1998). Im Verlauf des bisher größten in Deutschland bekannt gewordenen Ausbruchs wurden vier asymptomatische Ausscheider von *E. coli* O157:H7 ermittelt (REIDA *et al.*, 1994). Auch Ingestion von oder Kontakt mit Wasser, wie das Baden in kontaminierten Seen, können eine Infektion auslösen (FELDMAN *et al.*, 2002; HOLME *et al.*, 2003).

Escherichia coli lösen bei neugeborenen Ferkeln, Kälbern und Lämmern einen enterotoxischen Durchfall aus (HOLLAND, 1990). Es wird auch von Fällen bei Pferden und Hunden berichtet. EPEC und EHEC können Durchfall bei allen Tierarten verursachen. Einige Serotypen von *E. coli* (z.B. O141:K85, O138:K81) sind verantwortlich für die bei Schweinen vorkommende Ödemkrankheit, eine akute, häufig tödlich verlaufende Enterotoxämie bei abgesetzten Ferkeln (MARQUES *et al.*, 1987).

Die Colibazillose der Hühner ist eine ökonomisch bedeutende Erkrankung. Über die kontaminierte Eioberfläche können invasive *E. coli* eindringen und den Embryo abtöten. Ausgewachsene Hühner werden häufig über den Atmungstrakt infiziert und entwickeln eine respiratorische oder septikämische Erkrankung (HOLLAND, 1990).

Außerdem kann *E. coli* Mastitis bei Kühen verursachen (HEESCHEN und REICHMUTH, 1995).

2.3.5. Verhalten in Rohmilch und Rohmilchprodukten

E. coli können sich in der Regel bei Temperaturen von 2°C bis 45°C vermehren. Sie tolerieren einen pH von 4,4 bis 8,8. Im Lebensmittel benötigen sie einen minimalen a_w -Wert von 0,932 (SPAHR und URL, 1994). Einige *E. coli*-Stämme können, wenn auch in geringer Zahl, viele Wochen in Hartkäse persistieren (KORNACKI und MARTH, 1982).

In Rohmilch können sich ETEC innerhalb einiger Tage sowohl bei 4°C als auch bei 22°C vermehren und die Infektionsdosis erreichen (OLSVIK und KAPPERUD, 1982). Dies ist ebenfalls in Weichkäse möglich (MACDONALD *et al.*, 1985).

O157:H7 gilt als besonders säuretolerant. Unter bestimmten Bedingungen wurde noch bei einem pH-Wert von 4,0 eine Vermehrung dieses Serotyps und bis zu einem pH-Wert von 3,5 Überlebensfähigkeit festgestellt (CONNER und KOTROLA, 1995; GARREN *et al.*, 1997). In Milch kann O157:H7 persistieren und sich bei Temperaturen über 8°C vermehren, weshalb WANG *et al.* (1997) empfehlen, Milch bei = 5°C zu lagern.

In Frischkäse wurde experimentell die Möglichkeit der Vermehrung von O157:H7 festgestellt (AROCHA *et al.*, 1992). Auch in Cheddarkäse kann O157:H7 sowohl bei der Herstellung als auch bei der Lagerung von mehr als 60 Tagen überleben (REITSMA und HENNING, 1996).

2.3.6. Vorkommen in Milch

EPEC, ETEC und EIEC gehören aufgrund ihres primären Reservoirs im Verdauungskanal zu den fäkalen coliformen Bakterien von Menschen und Tieren. Diese Organismen werden auch in Milch von gesunden oder an Mastitis erkrankten Kühen gefunden. In früheren Studien wurden diese Keime in weniger als 2% der Rohmilchproben gefunden (BRYAN, 1983). Bei Untersuchungen in Iowa wurden EPEC-Serotypen in 3 von 47 (6,4%) Rohmilchproben gefunden (GLATZ und BRUDVIG, 1980). Außerdem wurden 78 Käseproben untersucht, die alle negativ waren. FRANK *et al.* (1978) untersuchten 106 Käseproben in Wisconsin, die ebenfalls alle negativ ausfielen. Die Kontaminationsraten sind in Entwicklungsländern sehr viel höher, wo akute *E. coli*-Gastroenteritis bei Kindern sehr häufig vorkommt. ABBAR und KADDAR (1991) untersuchten 400 traditionell fermentierte Milchprodukte von Märkten auf *E. coli* und fanden in 30,5% der Proben Keimzahlen über 10^5 Kbe/ml. Von 430 *E. coli*-Isolaten (durchschnittlich 1-2 pro Probe) wurden 138 (34,5%) EPEC isoliert. In Indien fanden SINGH und RANGANATHAN (1974) 30 von 128 Rohmilchproben, die mit *E. coli* kontaminiert waren.

Eine neuere Studie aus Ägypten (SAYED und HUSEIN, 2003) ergab geringe Kontaminationsraten mit verotoxin-produzierenden *E. coli* (VTEC) in Milch. 40 Milchkühe wurden untersucht und VTEC konnten aus 12 Fäkalproben (30%), aber nur einer Milchprobe (2,4%) isoliert werden. Außerdem wurden 30 Milchproben, die in der Assiut Provinz zum Verkauf angeboten wurden, untersucht; VTEC konnte nur in einer Probe (3,3%) nachgewiesen werden.

In Zimbabwe fanden GRAN *et al.* (2003) *E. coli* in durchschnittlichen Konzentrationen von $3,2 \times 10^4$ KbE/ml in Rohmilch und $6,3 \times 10^7$ KbE/ml in unkontrolliert fermentierter Milch.

In Trinidad untersuchte ADESIYUN (1994) 507 Rohmilchproben von 16 Milchsammelstellen. Dabei wurde *E. coli* aus 105 (20,7%) Proben isoliert mit einer durchschnittlichen Keimzahl zwischen $6,6 \times 10^2$ KbE/ml und 4×10^5 KbE/ml. 25 (23,6%) dieser Isolate produzierten Verotoxin. In einer Folgestudie untersuchten ADESIYUN *et al.* (1995) 287 Rohmilchproben in acht Milchsammelstellen in Trinidad. 200 (70%) dieser Proben enthielten mehr als 10^5 KbE (*E. coli*)/ ml. Die hohe Kontaminationsrate führen die Autoren auf eine fäkale Kontamination zurück. In einer weiteren Studie untersuchten ADESIYUN *et al.* (1997) 175 Sammelmilchproben (20-30 Minuten nach Melken) von Milchviehbetrieben in Trinidad. Sie fanden in 77 (44%) Sammelmilchproben Kontaminationen mit *E. coli* über 10^5 KbE/ml.

O'FERRALL-BERNDT (2003) untersuchte in Pretoria, Südafrika, Milchproben aus sogenannten *milkshops* und verglich sie mit Milch vom nationalen Verteiler (*national distributor*). Dabei fand er *E. coli* in 17% der Proben aus *milkshops*. Diese Milch war zwar als pasteurisierte Milch deklariert, der Phosphatsetest fiel dennoch bei 95% positiv aus, d.h. die Pasteurisierung war vermutlich unzureichend.

D'AOUST (1989a) fand *Escherichia coli* O157:H7 in nur 4,2% und 2,0% von Rohmilchproben in den U.S.A., respektive Kanada. Jedoch berichteten PADHYE und DOYLE (1991) von höheren Kontaminationsraten. Sie fanden *Escherichia coli* O157:H7 in 10% der untersuchten Tankmilchproben von 69 Farmen in Wisconsin. Niedrigere Kontaminationsraten wurden von HARTUNG (2004) für Deutschland berichtet. Von 1.383 Proben aus Rohmilch bzw. Milchprodukten aus Rohmilch, die im Jahr 2003 in Deutschland untersucht wurden, enthielten 21 (1,5%) VTEC.

2.4. *Listeria monocytogenes*

2.4.1. *Taxonomie*

Nach SEELIGER und JONES in BERGEY'S Manual of Systematic Bacteriology (1984) gehören Listerien zu den sporenlösen, grampositiven Stäbchen der Familie *Micrococcaceae*.

Zum Genus *Listeria* gehören 6 Arten: *Listeria (L.) monocytogenes*, *L. innocua*., *L. gray*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri* und *L. welshimeri*. Gesicherte humanpathogene Eigenschaften besitzt jedoch nur *L. monocytogenes*. Aber auch *L. ivanovii* wird als möglicher Krankheitserreger beim Menschen angesehen (WHO, 1988).

2.4.2. *Morphologie, Kultur und biochemische Eigenschaften*

Listerien sind nicht-sporenbildende, etwa 0,4-0,5 x 0,5-2 µm große Stäbchen, die aufgrund peritricher Begeißelung Beweglichkeit besitzen. Sie wachsen aerob und fakultativ anaerob. Listerien sind Oxidase-negativ, produzieren Katalase und können Aeskulin hydrolisieren. Auf Nähragar bilden sie 0,5x1,5 mm große, durchscheinende, leicht konvexe, blaugraue Kolonien mit leicht rauer Oberfläche und glattem Rand. Je älter die Kolonie ist, desto rauer wird die Oberfläche, der Rand erhabener und das Zentrum erniedrigt.

Listeria monocytogenes wächst auf Blutagar unter Ausbildung einer β-Hämolyse. Mit *Staphylococcus aureus*, nicht aber mit *Rhodococcus equi* zeigen die Bakterien ein CAMP-Phänomen.

Listeria seeligeri entwickelt nur eine schwache Hämolyse, allerdings verhält auch dieser Keim sich CAMP-positiv mit *Staphylococcus aureus* und nicht mit *Rhodococcus equi*. Die β-Hämolyse von *Listeria ivanovii* prägt sich deutlich mit mehreren Zonen aus. Diese Spezies weist mit *Rhodococcus equi*, nicht jedoch mit *Staphylococcus aureus* eine positive CAMP-Reaktion auf.

2.4.3. *Erkrankungen bei Mensch und Tier*

HYSLOP und OSBORNE (1959) beschrieben die Listeriose als eine sporadische oder eher seltene, epidemische Erkrankung, die bei Menschen und größeren Tieren hauptsächlich Symptome zentralnervösen Ursprungs hervorruft und bei Geflügel oder Kleintieren (Nagern) meist septikämisch verläuft.

Die Erregeraufnahme erfolgt beim Menschen in der Regel oral durch kontaminierte Nahrungsmittel oder durch Schmutz- und Schmierinfektion (MAYR *et al.*, 1993).

Bei gesunden Erwachsenen läuft die Erkrankung als latente Infektion ab, die unter bestimmten Umständen, wie z.B. Immunsuppression oder Schwangerschaft, mit grippeähnlichen Symptomen ausbrechen kann. Weiterhin kommt es oft zur Ausbildung von Meningoenzephalitiden (FERNANDEZ GARAYZABAL *et al.*, 1987). Bei Schwangeren ist eine diaplazentare Übertragung der Listerien möglich, die Früh-, Totgeburten oder Meningoenzephalitiden bei Neugeborenen zur Folge haben kann (FLEMING *et al.*, 1985).

Es wird angenommen, dass schwangere Frauen 17-mal mehr gefährdet sind, an Listeriose zu erkranken, als die durchschnittliche Bevölkerung (MYLONAKIS *et al.*, 2002). Die Erkrankung verläuft meist mit milden grippeähnlichen Symptomen, jedoch führt eine Infektion während der Schwangerschaft in 50% der Fälle zu Aborten, Todgeburten oder Infektion des Neugeborenen. Personen mit geschwächtem Immunsystem, eingeschlossen Krebskranke, Diabetiker oder Nierenkranke, erkranken bedeutend häufiger an Listeriose. An AIDS erkrankte Personen infizieren sich 300-mal häufiger mit *Listeria monocytogenes* als gesunde Menschen. Auch sehr junge und alte Menschen sind empfänglicher als die durchschnittliche Bevölkerung.

Für Infektionen mit *Listeria monocytogenes* wird eine Mortalitätsrate von 20-30% beschrieben (World Health Organization (WHO), 1988; MEAD *et al.*, 1999). Von der WHO wurde die Erkrankungsrate aufgrund von Daten eines Überwachungssystems in den USA auf 10 bis 50 Fälle Listeriose pro eine Million Personen geschätzt. Die Infektionsdosis für den Menschen ist nicht genau bekannt (LOVETT, 1989; FARBER und PETERKIN, 1991). Die Konzentration von *L. monocytogenes* in Lebensmitteln, die mit Ausbrüchen in Zusammenhang gebracht wurden, lag meist bei mindestens 10^3 KbE/g. Bei besonders gefährdeten Individuen lag die Infektionsdosis jedoch bereits bei 1 KbE/g (HUBBARD und BILLY, 2001). Das Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR, ehemals BgVV) empfiehlt Lebensmittelsicherheitsbehörden, den Höchstwert auf 100 KbE/g *L. monocytogenes* festzusetzen (BgVV, 2000). Mittlerweile wurde dieser Grenzwert in der neuen Verordnung über mikrobiologische Kriterien (VO Nr. 2073/ 2005) für einige Lebensmittelkategorien übernommen. In Deutschland besteht für die Listeriose beim Menschen nach dem Infektionsschutzgesetz Meldepflicht. Im Jahre 2005 wurden insgesamt 510 Fälle von Listeriose gemeldet (RKI, 2006). Für 21 Mitgliedsstaaten der EU

wurden von der EFSA (European Food Safety Authority) für das Jahr 2004 1.267 Fälle von Listeriose berichtet, mit einer Inzidenz von 0,3 Fällen pro 100.000 Einwohnern (EFSA, 2006).

L. monocytogenes-Ausbrüche sind oft mit kontaminierten Lebensmitteln assoziiert (LOVETT, 1989; FARBER und PETERKIN, 1991). Milch und Milchprodukte wurden mehrfach als Verursacher von Ausbrüchen und Einzelerkrankungen angesehen (ORTEL, 1968; FLEMING *et al.*, 1985; BANNISTER, 1987; LINNAN *et al.*, 1988; SCHÖNBERG, 1988; GOULET *et al.*, 1995).

Tabelle 3 bietet eine Übersicht zu diesen Untersuchungen.

Tabelle 3: *L. monocytogenes*-Erkrankungen durch Milch und Milchprodukte

Land	Jahr	Anzahl der Patienten	Infektionsquelle	Referenz
Deutschland	1949-1957	ca. 100	Rohmilch, Sauermilch, Sahne, Weichkäse	Gray und Killinger, 1966; Ryser, 1999
USA	1983	49	Pasteurisierte Milch	Fleming <i>et al.</i> , 1985; Ryser, 1999
USA	1985	ca. 300	Mexican-style Käse	Linnan <i>et al.</i> , 1988; Ryser, 1999
Schweiz	1983-1987	122	Weichkäse	Bula <i>et al.</i> , 1995; Ryser 1999
USA	1994	54	Pasteurisierte Milch	Dalton <i>et al.</i> , 1997; Ryser 1999
Frankreich	1995	20	Brie Käse	Goulet <i>et al.</i> , 1995
Frankreich	1997	20	Rohmilchweichkäse	Ryser, 1999
Finnland	1988-1999	25	Butter	Lyytikainen <i>et al.</i> , 2000
USA	2000-2001	12	Käse	CDC (2000)
USA	2000	13	Mexican-style Käse	MacDonald <i>et al.</i> , 2005
Kanada	2002	17	Käse	Gaulin <i>et al.</i> , 2003

L. monocytogenes ist ein ubiquitär verbreiteter Bodenkeim. Bis zu 50% aller Rinder und bis zu 10% der Menschen scheiden *L. monocytogenes* mit dem Kot bzw. Stuhl aus, ohne erkrankt zu sein (HUSU, 1990; FARBER und PETERKIN, 1991).

Die Listeriose tritt bei Wiederkäuern vorwiegend in zerebraler Form auf, in geringerem Umfang als Erkrankung tragender Tiere mit Abort oder Septikämie der Neugeborenen. Mastitis durch Listerien kommt relativ selten vor (PRENTICE, 1994).

2.4.4. Verhalten in Rohmilch und Rohmilchprodukten

L. monocytogenes vermehrt sich bei Temperaturen zwischen 1°C und 45°C, bei einem Optimum von 37°C. Die Generationszeit in Milch liegt zwischen 1,2 und 1,7 Tagen bei 4°C und zwischen 8,7 und 14,6 Tagen bei 8°C. Das pH-Spektrum reicht von pH 4,5 bis pH 9. Die Bakterien tolerieren einen a_w -Wert von bis zu 0,93 (PRENTICE, 1994).

L. monocytogenes vermag sich bei Temperaturen von 4°C-35°C in Rohmilch sowie in flüssigen Milchprodukten zu vermehren. Dieser Keim hat die Fähigkeit, die Herstellung und die Verarbeitung verschiedener Käsesorten zu überstehen. In natürlich kontaminiertem Käse wurden bis zu 10^7 KBE/g gefunden (FARBER und PETERKIN, 1991). Als problemlos gelten Hart- und Schnittkäse insofern, dass sie durch meist trockene Rinden und geringere Wasseraktivität bei langen Reifungszeiten mit wenig Waschvorgängen kaum Gelegenheit zur Kontamination und zum Überleben bieten. Wird aber kontaminierte Rohmilch verwendet, so kann *L. monocytogenes* die Käsureifung bis zu 90 Tagen überleben (BACHMANN und SPAHR, 1995). Ausnahmen sind Schnittkäse, die während der Reifung geschmiert und feucht gehalten werden. Hierbei kann es ähnliche Probleme wie bei Weichkäse geben (HAMMER *et al.*, 1989). Bei Schmierkäse steigt im Laufe der Reifung in der Rinde der pH-Wert. Durch die Alkalisierung der Rinde wird die Haftung und Vermehrung der Keime begünstigt (TERPLAN, 1986).

PAK *et al.* (2002) untersuchten Risikofaktoren bei der Herstellung von Käse in der Schweiz und fanden, dass die Kontamination mit *Listeria monocytogenes* auf der Oberfläche von Hart- und Semi-Hart-Käse höher ist als bei Weichkäse. Außerdem konnten sie beweisen, dass *L. monocytogenes* im Inneren von halbfesten Schnittkäsen die Reifung überleben kann, nicht aber in Hartkäse.

Durch Pasteurisierung wird *L. monocytogenes* abgetötet (BRADSHAW *et al.*, 1985; BECKERS *et al.*, 1987).

ASHENAFI (1994) analysierte das Verhalten von *Listeria monocytogenes* während der traditionellen äthiopischen Fermentierung von Rohmilch zu Ergo, einem natürlich fermentierten, Joghurt-ähnlichen Milchprodukt. Dabei wurde auch der Einfluss der Räucherung der Milchbehälter mit Olivenholz auf das Wachstum der Listerien untersucht.

Pasteurisierte Milch wurde mit *Listeria monocytogenes*-Stämmen (10^3 KbE/ml) und Milchsäurebakterien (10^6 KbE/ml) beimpft und alle 12 Stunden wurden Proben genommen. In den ersten 24 Stunden war das Wachstum in den geräucherten Behältern um ca. 10^1 KbE/ml geringer als in den ungeräucherten. Nach 36 Stunden erreichten die Keimzahlen jedoch dieselben Werte wie in den ungeräucherten Behältern. Kein Wachstum erfolgte mehr bei einem pH-Wert unter 5, entgegen den Ergebnissen anderer Arbeiten, in denen ein Wachstum bis 4,4 und 4,5 festgestellt werden konnte (SORRELS *et al.*, 1989).

In Zimbabwe untersuchten DALU und FERESU (1996) das Verhalten von *L. monocytogenes* in fermentierter Milch aus Rohmilch (traditionell ohne Starterkultur) und pasteurisierter Milch (mit mesophiler Starterkultur). Sie inokulierten beide Milchsorten mit *L. monocytogenes* mit 10^4 KbE/ml vor der Fermentierung und bestimmten die Keimzahl für *L. monocytogenes* nach 24 Stunden. Die Anzahl hatte sich in allen Milchprodukten verzehnfacht. Nach 5-tägiger Lagerung bei 5°C und 20°C nahm die Anzahl zehnfach, respektive 100-fach, ab. Sie schlussfolgerten, dass traditionell fermentierte Milch nach 3-5 Tagen Haltbarkeit ein Risiko für die öffentliche Gesundheit darstellt.

Die infektiöse Dosis von *L. monocytogenes* für den Menschen ist unbekannt (GRANUM *et al.*, 1995). Käse, dessen Verzehr zu Erkrankungen führte, enthielt pro Gramm 10^3 - 10^4 *L. monocytogenes*. Für empfindliche Personen wird als Minimale Infektiöse Dosis (MIL) 10^5 - 10^7 angegeben (FARBER *et al.*, 1996).

2.4.5. Vorkommen in Milch

Über das Vorkommen von Listerien in Milch liegt eine Vielzahl von Erhebungen vor. So wiesen HYSLOP und OSBORNE schon 1959 darauf hin, dass sowohl Rohmilch von klinisch an Listeriose erkrankten Tieren als auch von unauffälligen Keimträgern eine Gefahr für Menschen darstellt. Sie beschrieben den Nachweis von *Listeria monocytogenes* bei einem Krankheitsausbruch unter Rindern in Nordwest-Sommerset (Großbritannien) im Jahre 1958. Dabei gelang es, den Erreger aus der Milch einer Kuh zu isolieren, die als klinische Symptome geringgradigen Torticollis, Schwellung der Augenlider und Strabismus zeigte. Eine Mastitis war nicht festzustellen. Die Isolierung von *Listeria monocytogenes* aus unverdächtig erscheinender Milch oder Eutern wurde auch von anderen Autoren beschrieben (SCHULZ, 1967).

Andererseits gelang es STAJNER (1971) nur bei sechs von zehn experimentell infizierten Kühen *Listeria monocytogenes* aus der Milch zu isolieren, wobei sich in den

ausscheidenden Eutervierteln zwar Sekretionsstörungen entwickelten, die Tiere aber keine weiteren klinischen Symptome zeigten. Die Ausscheidung von Listerien erfolgte mit Unterbrechung über den gesamten Untersuchungszeitraum von 12 Monaten.

Als hauptsächliche Infektionsquelle für Rinder (und auch andere Nutztiere) wird verdorbene Silage angesehen. FENLON (1986) fand bei der Untersuchung von natürlich kontaminierter Silage *Listeria monocytogenes*-Gehalte von über 12.000 Keimen pro Gramm, was bei der dort angewandten MPN (Most Probable Number)-Methode der obersten Nachweisgrenze entsprach. Allerdings erwies sich die Silage in den Partien mit diesen hohen Keimgehalten bereits grobsinnlich verändert. Die Silage war vorher an 25 Kälber verfüttert worden, von denen drei mit Listeriose-Symptomen erkrankten und eines sogar starb.

FARBER *et al.* (1988) sowie FENLON und WILSON (1989) stellten bei ihren epidemiologischen Studien aber fest, dass der Anteil der *Listeria monocytogenes*-positiven Rohmilchproben während der Winterzeit, also während der hauptsächlichen Silagefütterungsperiode, nicht höher, sondern geringer ausfiel. Aus 98 Rohmilchproben, die während Februar und März 1986 untersucht wurden, konnten FARBER *et al.* (1988) *Listeria monocytogenes* nicht isolieren, während in den übrigen drei Jahreszeiten jeweils zwei positive Resultate in 100, 123 beziehungsweise 124 Rohmilchproben auftraten.

Bei der Erhebung von FENLON und WILSON (1989) verteilten sich die insgesamt 14 positiven Proben auf den Sommer mit sieben (3,9% der im Sommer untersuchten Proben), den Herbst mit zwei (1,1%) und den Winter mit fünf (2,8%) positiven Proben.

Dagegen war bei den 1989 bis 1990 in Irland untersuchten Rohmilchproben (REA *et al.*, 1992) ein signifikanter Anstieg der Listerien-Isolate in den Wintermonaten zu beobachten. Während bei 0 bis 5% der Proben in den Monaten Juni bis November Listerien vorkamen, stieg die Isolationsrate während der Monate Dezember bis April auf ungefähr 35% an, um dann wieder auf 0 bis 5% zu fallen.

FEDIO und JACKSON (1992) überprüften vier Milcherzeugerbetriebe, bei denen *Listeria monocytogenes* in der Milch vorkam, auf mögliche Kontaminationsquellen. Während nur eine von 262 unter aseptischen Bedingungen gezogene Viertelgemelksproben (0,4%) *Listeria monocytogenes* enthielt, wurde aus zehn von 69 (14,5%) Kotproben *Listeria monocytogenes* isoliert. Eine vergleichende Untersuchung von drei anderen Betrieben, bei denen *Listeria monocytogenes* in der Milch nicht auftrat, ergab allerdings, dass auch hier 15 von 114 Kotproben (13,2%) positiv ausfielen.

SANAA *et al.* (1993) erarbeiteten Risikofaktoren, die mit der Kontamination von Rohmilch in Verbindung gebracht werden. Schlechte Qualität der Silage, verschmutzte Kühe und Einstreu, mangelhafte Beleuchtung und ungenügende Hygiene beim Melken waren mit der Kontamination von Rohmilch mit *Listeria monocytogenes* signifikant assoziiert.

Tabelle 4 fasst in der Literatur angegebene Untersuchungsergebnisse bezüglich des Vorkommens von *Listeria monocytogenes* in Rohmilch zusammen.

Tabelle 4: Zusammenfassung von Untersuchungsergebnissen über das Vorkommen von *Listeria monocytogenes* in Rohmilch

Land	Anzahl Rohmilchproben	<i>Listeria monocytogenes</i>	Referenz
Spanien	95	43 (45,3%)	Dominguez Rodriguez <i>et al.</i> , 1985
USA	124	15 (12%)	Fleming <i>et al.</i> , 1985
USA	121	15 (12%)	Hayes <i>et al.</i> , 1986
USA	650	27 (4,2%)	Lovett <i>et al.</i> , 1987
Niederlande	137	6 (4,4%)	Beckers <i>et al.</i> , 1987
Spanien	67	30 (44,5%)	Fernandez Garayzabal <i>et al.</i> , 1987
Kanada	445	6 (1,3%)	Farber <i>et al.</i> , 1988
Schottland	540	14 (2,6%)	Fenlon und Wilson, 1989
Kanada	315	≥13 (4,1%)	Slade <i>et al.</i> , 1989
Italien	40	0	Massa <i>et al.</i> , 1990
England/Wales	361	13 (13,6%)	Greenwood <i>et al.</i> , 1991
Nordirland	176	27 (15,3%)	Harvey und Gilmour, 1992
Südafrika	982	67 (6,8%)	Wnorowski, 1990
Irland	589	29 (4,9%)	Rea <i>et al.</i> , 1992
Brasilien	220	21 (9,5%)	Moura <i>et al.</i> , 1993

Marokko	30	3 (10%)	El Marrakchi <i>et al.</i> , 1993
Großbritannien	2009	102 (5,4%)	O'Donnell, 1995
Deutschland	415	23 (5,5%)	Specker, 1996
Frankreich	69	4 (5,8%)	Desmaures <i>et al.</i> , 1997
Österreich	133	2 (1,5%)	Deutz <i>et al.</i> , 1997
Kanada	1720	47 (2,7%)	Steele <i>et al.</i> , 1997
Türkei	150	3 (2%)	Aslantas und Yildiz, 2003
Brasilien	30	8 (26,7%)	Padilha Da Silva <i>et al.</i> , 2004
Deutschland	898	17 (1,9%)	Hartung, 2004

2.5. *Salmonella* species

2.5.1. *Taxonomie*

Die Gattung *Salmonella* zählt zur Familie der *Enterobacteriaceae* (LE MINOR, 1984). Sie wird untergliedert in die Spezies *Salmonella enterica* mit sechs Subspezies und die Spezies *Salmonella bongori*. Weitere Unterteilungen in weit über 2000 Serovare erfolgen nach dem KAUFFMANN-WHITE-Schema anhand von O- und H-Antigenen (VLAEMYNCK, 1994).

2.5.2. *Morphologie, Kultur und biochemische Eigenschaften*

Salmonella (*S.*) spp. sind gramnegative, sporenlose Stäbchen und 0,7-1,5 µm x 2,0-5,0 µm groß. Sie sind in der Regel beweglich und fakultativ anaerob.

Die Kolonien sind meistens 2-4 mm groß. Einige Salmonellen bilden Kolonien von nur 1 mm Durchmesser. Die Bakterien sind Oxidase-negativ und Katalase positiv (LE MINOR, 1984).

Von anderen Mitgliedern der Familie der *Enterobacteriaceae* werden *Salmonella* spp. durch biochemische Reaktionen unterschieden. Ein wichtiges Merkmal ist die Nichtverwertung von Laktose. Auch bei *Salmonella* spp. wird zur Differenzierung die IMViC-Reihe verwendet.

2.5.3. *Erkrankungen bei Mensch und Tier*

Die meisten *Salmonella*-Serovarietäten können sowohl den Menschen als auch Tiere infizieren (GRAU, 1989). Einige Serovare wie *Salmonella* Typhi und *S. Paratyphi* sind nur für den Menschen und andere Serovare nur für bestimmte Tierarten pathogen (MAYR *et al.*, 1993). Bei der Salmonellen-Erkrankung des Menschen werden – in Abhängigkeit von der Infektionsdosis und dem klinischen Bild – zwei Verlaufsformen unterschieden. Die typhöse Form (Typhus und typhusähnliche Erkrankungen) wird vorwiegend durch die Serovare *Salmonella* Typhi, *S. Paratyphi* A, B und C übertragen. Die Übertragung kann von Mensch zu Mensch erfolgen. Die Erreger werden mit dem Mund aufgenommen und über das Blut verbreitet. Die Infektionsdosis ist gering mit 10^2 - 10^3 KBE/ml. Nach der Inkubationszeit (wenige Tage bis 3 Wochen) kommt es zu einer schweren, zyklisch verlaufenden Allgemeininfektion mit Durchfall und hohem Fieber. Es kann auch zu Organschäden an Darm, Herz, Leber, Niere und Galle kommen. Die meisten anderen *Salmonella*-Serovare lösen beim Menschen die enteritische Verlaufsform aus. Die minimale Infektionsdosis (10^2 - 10^6 KBE/ml) und die Inkubationszeit (1-5 Tage) variieren je nach Gesundheitszustand des Betroffenen und nach verzehrtem Lebensmittel und Zeitpunkt der letzten Nahrungsaufnahme. Durch eine Entzündung der Darmschleimhaut tritt Durchfall und gelegentlich mäßiges Fieber auf. Krankheitszeichen können aber auch völlig fehlen. Eine akute Entzündung mit hauptsächlich polymorphonuklearen Leukozyten (PMN) im Ileum und Kolon bewirken eine Nekrose der Schleimhaut (ZHANG *et al.*, 2003). Normalerweise setzt bei immunkompetenten Personen innerhalb von wenigen Tagen die Erholung ein (D'AOUST, 1989b; VLAEMYNCK, 1994). Bei abwehrgeschwächten Personen werden zunehmend schwere Krankheitszustände mit septikämischem Verlauf und z.T. mit Todesfolge beobachtet (SANDER, 1993). Nach Überstehen der Erkrankung ist in seltenen Fällen eine Ausscheidung bis zu mehreren Jahren beobachtet worden (SANDER, 1993; VLAEMYNCK, 1994).

Die Pathogenese der nicht-typhoiden Salmonellosen wurde an Zellkulturen mit *S. Typhimurium* studiert. Für die Entwicklung einer systemischen oder lokalisierten Infektion sind unterschiedliche Virulenzfaktoren ausschlaggebend. Für die Enterokolitis ist die Produktion von TTSS-1 (*invasion-associated type III secretion system*) entscheidend, welches Durchfall und eine Infiltration der Darmschleimhaut mit PMN auslöst (AHMER *et al.*, 1999; TSOLIS *et al.*, 1999). Die Fähigkeit von *S. Typhimurium* in Makrophagen zu

überleben und sich zu vermehren, ist ein wichtiger Faktor für die Entwicklung einer systemischen Salmonellose (FIELDS, *et al.*, 1986; GULIG *et al.*, 1987).

Im Jahr 2005 wurden in Deutschland 52.245 Salmonellen-Erkrankungen gemeldet (RKI, 2006), 63,3 Erkrankungen pro 100.000 Einwohner. EFSA (European Food Safety Authority) berichtet 192.703 Salmonellosen im Jahr 2004 für 24 EU-Mitgliedsstaaten mit einer Inzidenz von 42,2 pro 100.000 Einwohnern (EFSA, 2006). Infektionen durch *Salmonella* spp. sind besonders bei Erwachsenen die häufigste erfasste Ursache von Durchfallerkrankungen und werden überwiegend durch den Verzehr von kontaminierten Lebensmitteln tierischen Ursprungs ausgelöst. Am häufigsten sind die Lebensmittel Eier und Fleischwaren involviert. Übertragungen von Mensch zu Mensch spielen nur eine untergeordnete Rolle.

Die Bedeutung von Milch und Milchprodukten für die Entstehung von Salmonellosen beim Menschen ist gering. Dies ist u.a. darauf zurückzuführen, dass über 95% der konsumierten Milch (in Industrieländern) einem technologischen Verarbeitungsprozess mit umfassender Hygiene unterliegen. Dieser schließt durch Kühlung und anerkannte Wärmebehandlungsverfahren die Vermehrung von *Salmonella* spp. normalerweise aus. Trotzdem kam es durch den Verzehr von Rohmilch, Rohmilchprodukten oder durch Rekontamination nach der Erhitzung wiederholt zu Einzelerkrankungen und zu Ausbrüchen. In den USA und in Schottland kam es in den achtziger Jahren zu einer Reihe von Epidemien, die auf den Konsum von Milch und Milchprodukten zurückzuführen waren (BRYAN, 1983; REILLY *et al.*, 1983; LECOS, 1986). In Tabelle 5 sind einige Ausbrüche zusammengefasst.

Tabelle 5: Salmonellosen durch Milch und Milchprodukte

Land	Jahr	Anzahl Patienten	Serotyp	Infektionsquelle	Referenz
USA	1967	40	S. Typhimurium	Rohmilch	Francis und Allard, 1967
USA	1971-1975	44	S. Dublin	Rohmilch	Werner <i>et al.</i> , 1979
England	1972-1973	316	S. Typhimurium	Rohmilch	MacLachlan, 1974
USA	1975	43	S. Newport	Pasteurisierte Milch	Blouse <i>et al.</i> , 1975
Deutschland	1976	8		Rohmilch	Wuthe und Witt, 1980

Schottland	1976	700	S. Dublin	Rohmilch	Small und Sharp, 1979
Polen	1978	890	S. Enteritidis	Pasteurisierte Milch	Suchowiak und Haiat, 1980
USA	1978	23	S. Typhimurium	Pasteurisierte Milch	Dominguez <i>et al.</i> , 1979
USA	1980-1981	125	S. Derby	Rohmilch	Nolan <i>et al.</i> , 1981
USA	1981	59	S. Typhimurium	Rohmilch	Day <i>et al.</i> , 1981
Schottland	1981	654	S. Typhimurium	Rohmilch	Cohen <i>et al.</i> , 1983
USA	1985	16284	S. Typhimurium	Pasteurisierte Milch	Lecos, 1986
Kanada	1984	2000	S. Typhimurium	Cheddar-Käse	Benzanson <i>et al.</i> , 1985
Schweden	1985	153	S. Saintpaul	Pasteurisierte Milch	Andersson <i>et al.</i> , 1986
England	1989	42	S. Dublin	Rohmilchweichkäse	Maguire <i>et al.</i> , 1992
Frankreich	1993	237	S. Paratyphi B	Rohmilchziegenkäse	Desenclos <i>et al.</i> , 1996
USA	1994	82	S. Berta	Rohmilchweichkäse	Ellis <i>et al.</i> , 1998
USA	1997	17	S. Typhimurium DT104	Rohmilchweichkäse	Villar <i>et al.</i> , 1999
USA	2000	93	S. Typhimurium	Pasteurisierte Milch	Olsen <i>et al.</i> , 2004
USA	2003	62	S. Typhimurium	Rohmilch	Anonym, 2003b; Holt <i>et al.</i> , 2003
EU	2004	95	Nicht benannt	Milchprodukte	EFSA, 2006
Frankreich	2005	49	S. Worthington	Milchpulver	Lepoutre <i>et al.</i> , 2005

Salmonella spp. bewohnen den Darmtrakt sowohl von Wild- als auch von Haustieren und werden mit dem Kot ausgeschieden. Bei Tieren verläuft die Infektion mit diesen Erregern oft ohne Symptome. Allerdings ist eine Dauerausscheidung über viele Jahre möglich, weshalb die Bedeutung der Salmonellose als Lebensmittelinfektion so bedeutend ist. Neben den häufig vorkommenden latenten Infektionen tritt die Salmonellose klinisch in

Erscheinung als Enteritis verschieden starker Ausprägung, als Septikämie (vor allem bei Jungtieren), als Abort und als Organerkrankung (MAYR *et al.*, 1993).

Die Salmonellose des Rindes ist seit 06.01.1972 in Deutschland anzeigepflichtig. Ist bei einem Rind oder einem sonstigen mit Rindern zusammengehaltenen Tier Salmonellose oder der Verdacht auf Salmonellose amtlich festgestellt, so ordnet die zuständige Behörde die Untersuchung aller Rinder des Bestandes und, soweit zur Seuchenbekämpfung erforderlich, auch der sonstigen mit diesen Rindern zusammengehaltenen Tiere an. Die zuständige Behörde kann die Tötung von Rindern und sonstigen mit Rindern zusammengehaltenen Tieren anordnen, bei denen Salmonellose festgestellt ist oder bei denen Verdacht auf Salmonellose vorliegt. Außerdem gilt für die Mitgliedsstaaten der Europäischen Gemeinschaft die Verordnung (EG) Nr. 2160/2003 zur Bekämpfung von Salmonellen und bestimmten anderen durch Lebensmittel übertragbaren Zoonoseerregern. Diese Verordnung soll gewährleisten, dass angemessene und wirksame Maßnahmen zur Feststellung und Bekämpfung von Salmonellen und anderen Zoonoseerregern auf allen relevanten Herstellungs-, Verarbeitungs-, und Vertriebsstufen, insbesondere auf der Ebene der Primärproduktion, auch in Futtermitteln, getroffen werden, um die Prävalenz dieser Erreger und das von ihnen ausgehende Risiko für die öffentliche Gesundheit zu senken. In Deutschland wurden im Jahr 2003 insgesamt 232 Ausbrüche an Salmonellose der Rinder gemeldet. Diese Anzahl lag im Bereich der gemeldeten Ausbrüche vorhergehender Jahre (HARTUNG, 2004).

Salmonella spp. können in seltenen Fällen Mastitiden beim Rind hervorrufen. Eine Kontamination der Rohmilch kann folglich direkt mit der Milchausscheidung aus dem Euter erfolgen oder später durch Ausscheidungen eines erkrankten oder klinisch inapparent mit Salmonellen infizierten Tieres. Auch die Umgebung bei der Rohmilchgewinnung und -verarbeitung bietet vielfältige Kontaminationsmöglichkeiten (VLAEMYNCK, 1994).

2.5.4. Verhalten in Rohmilch und Rohmilchprodukten

Die Vermehrung ist innerhalb eines Temperaturbereiches von 5°C-47°C und eines pH-Spektrums von pH 4,0 bis pH 9,0 möglich. *Salmonella* spp. sind relativ empfindlich gegenüber niedrigen a_w -Werten (< 0,94) und hohen Salzkonzentrationen (9%) (VLAEMYNCK, 1994).

Rohmilch bietet *Salmonella* spp. gute Überlebens- und Vermehrungsmöglichkeiten.

Die Überlebenswahrscheinlichkeit von *Salmonella* spp. in den verschiedenen Käsesorten ist sehr unterschiedlich und abhängig von verschiedenen Faktoren, wie z.B. pH-Wert, Starterkultur und Dauer der Reifungsperiode (STECCHINI *et al.*, 1991). *Salmonella* spp. können sich in Cheddarkäse vermehren und bis zu 40 Wochen bei Kühlschranktemperaturen überleben (HARGROVE *et al.*, 1969; PARK *et al.*, 1970; WHITE und CUSTER, 1976).

Die Bakterien überleben die herkömmlichen Pasteurisierungsverfahren nicht (ECKNER *et al.*, 1990).

2.5.5. Vorkommen in Milch

In Tabelle 6 findet sich eine Auswahl aktueller Erhebungen zu Vorkommen von *Salmonella* spp. in Rohmilch.

Tabelle 6: Vorkommen von *Salmonella* spp. in Rohmilch

Probenherkunft	Probenanzahl	Positive Proben (Prozent)	Referenz
USA	678	32 (4,7%)	McManus und Lanier, 1987
Großbritannien	1138	2 (0,2%)	Humphrey und Hart, 1988
Irland	589	1 (0,16%)	Rea <i>et al.</i> , 1992
England/Wales	1673	6 (0,4%)	O'Donnell, 1995
Deutschland	415	0 (0%)	Specker, 1996
USA	1720	3 (0,2%)	Steele <i>et al.</i> , 1997
Frankreich	69	2 (2,9%)	Desmaures <i>et al.</i> , 1997
Österreich	133	0 (0%)	Deutz <i>et al.</i> , 1997
Deutschland	50	0 (0%)	Klopfert <i>et al.</i> , 1997
Deutschland	5893	0 (0%)	Hartung, 1998
Ägypten	100	3 (3%)	El Kosi, 2001

In Tabelle 7 findet sich eine Auswahl von Untersuchungen zum Vorkommen von *Salmonella* spp. in Rohmilchprodukten.

Tabelle 7: Vorkommen von *Salmonella* spp. in Rohmilchprodukten

Probe	Probenherkunft	Probenanzahl	Positive Proben (Prozent)	Referenz
Rohmilchcheddarkäse	USA	181	1 (0,5%)	Wood <i>et al.</i> , 1984
Rohmilchfrischkäse	Schweiz	22	0 (0%)	Jermini <i>et al.</i> , 1990
Rohmilcherzeugnisse	Deutschland	504	0 (0%)	Hartung, 1998
Rohmilcherzeugnisse	Deutschland	1776	0 (0%)	Hartung, 2004

2.6. Staphylokokken

2.6.1. Taxonomie

Die Spezies *Staphylococcus (S.) aureus* gehört dem Genus *Staphylococcus* an, das in die Familie der *Micrococcaceae* eingeordnet ist. Neben *S. aureus* als dem wichtigsten pathogenen Keim werden noch weit über 20 weitere Arten unterschieden (BLOBEL und SCHLIESSER, 1994).

S. aureus wird nach der Milchverordnung aber auch nach der Verordnung über mikrobiologische Kriterien (VO Nr. 2073/ 2005) als Nachweiskeim für mangelnde Hygiene bewertet.

2.6.2. Morphologie, Kultur und biochemische Eigenschaften

S. aureus sind grampositive, unbewegliche Haufenkokken und 0,5-1,0 µm groß. Kapsel- oder Pseudokapselbildung sowie zellwanddefekte Formen kommen vor (L-Form). Die runden Kolonien sind glatt, erhaben, glänzend, unterschiedlich pigmentiert und 1-3 mm groß, in Einzelfällen 6-8 mm. *S. aureus* zeigt aerobes, fakultativ anaerobes Wachstum. Es kommen meist hämolysierende, aber auch nicht-hämolysierende Stämme vor. Der Keim zeigt unterschiedliche Hämolyseformen, da von ihm verschiedene Hämolysine gebildet werden (KLOOS und SCHLEIFER, 1986)

S. aureus ist Katalase-positiv und Oxidase-negativ. Als Hauptkriterium zur Identifizierung dient das extrazellulär gebildete Enzym Koagulase. Dieses Enzym führt durch Aktivierung von Prothrombin zu einer Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin und damit zur Gerinnung von Blutplasma. Es wird vermutet, dass bei einem Infektionsprozess dadurch eine Barriere

aus Fibrin entsteht, die den Koagulase-produzierenden Keimen einen Schutz vor Phagozytose bietet (BLOBEL und SCHLIESSER, 1994).

Ein weiteres Kriterium zur Diagnose ist die extrazelluläre Bildung des hitzestabilen Enzyms Thernonuklease (TNase), das sowohl DNA als auch RNA abbauen kann. Die Fähigkeit zur Koagulase- und/oder TNase-Bildung ist auch für andere Staphylokokken-Spezies beschrieben (KLOOS und SCHLEIFER, 1986; DE LA FUENTE *et al.*, 1985; IGIMI *et al.*, 1990).

S. aureus wird noch aufgrund biochemischer Eigenschaften in sieben Biotypen unterteilt. Ein großer Teil der *S. aureus*-Stämme verfügt über den *clumping factor*, der ohne Aktivierung von Prothrombin eine direkte Bindung von Fibrinogen an zellwandständige Rezeptoren verursacht (BRÜCKLER *et al.*, 1974). Nach anderen Untersuchungen entspricht der *clumping factor* einem Teil der extrazellulären Koagulase, der eng mit der Zellwandoberfläche assoziiert ist (BODEN und FLOCK, 1989).

2.6.3. *Enterotoxine*

Staphylokokken-Enterotoxine (SE) haben folgende Eigenschaften: (1) sie wirken emetisch, (2) sie sind polyklonale Aktivatoren von T-Zellen, (3) sie sind relativ hitzeresistent und (4) sie sind relativ proteaseresistent. Die definierende Eigenschaft von Enterotoxinen ist die Induktion von Emesis und Gastroenteritis nach oraler Gabe an Primaten. Auf serologischer Basis werden verschiedene SE unterschieden und alphabetisch von SEA bis SEU benannt. Von SEC wurden noch Varianten beschrieben: SEC1, SEC2, SEC3, SEC_{bovine}, SEC_{ovine}, SEC_{canine}, (MARR *et al.*, 1999). ABE *et al.* (2001) identifizierten eine Variante von SEG, SEG_v. TSST-1 (*toxic shock syndrome toxin*) wurde früher als SEF bezeichnet (BERGDOLL *et al.*, 1981). Spätere Studien zeigten jedoch, dass TSST-1 keine Emesis bewirkt, wonach die Bezeichnung SEF widerrufen wurde. Frühere Studien ergaben, dass SEA das am häufigsten identifizierte Enterotoxin bei Lebensmittelinfektionen durch Staphylokokken war, gefolgt von SED und SEC (HOLMBERG und BLAKE, 1984). In neueren Ausbrüchen spielen hauptsächlich SEB und SEC eine wichtige Rolle.

Alle Enterotoxine sind Polypeptide, die gegenüber proteolytischen Enzymen resistent sind und daher nicht von Enzymen des Verdauungstraktes aufgelöst werden (ASPERGER, 1991). Außerdem sind diese Toxine hitzestabil, d.h. selbst wenn im Endprodukt die Bakterien durch Erhitzungsprozesse abgetötet werden, können die Toxine immer noch

enthalten und wirksam sein. Temperaturen, wie sie zur Pasteurisierung von Milch benutzt werden, haben keinen Effekt auf die Aktivität der Enterotoxine. Voraussetzung für die Toxinbildung ist, dass sich die Bakterien im rohen Ausgangsmaterial entsprechend vermehren konnten, um genügend Toxin zu produzieren (TRANTER, 1990). Eine Toxinmenge von weniger als 1µg in einem kontaminierten Lebensmittel ist ausreichend, um Symptome einer Lebensmittelvergiftung auszulösen. Diese Menge wird erreicht, wenn die Bakterienpopulation im Lebensmittel über 10⁵ KbE liegt (FDA, 2003).

SEA wird von *S. aureus*-Toxinbildnern produziert, die vom Menschen stammen, wohingegen Stämme, die beim Rind vorkommen, hauptsächlich SEC und SED produzieren (WIENEKE, 1974; HARVEY und GILMOUR, 1985; BERGDOLL, 1989).

2.6.4. *Erkrankungen bei Mensch und Tier*

Tabelle 8: Lebensmittelintoxikationen durch *S. aureus* in Milch und Milchprodukten

Land	Jahr	Anzahl der Patienten	Lebensmittel	Referenz
Kanada	1977	15	Emmental Käse	Todd <i>et al.</i> , 1981
USA	1981	16	Käse	Altekruse <i>et al.</i> , 1998
Ägypten	1986	>21	Milchpulver	El-Dairouty, 1989
Brasilien	1987	Keine Angabe	Minas Käse	Sabioni <i>et al.</i> , 1988
Schweiz	1989	5	Rohmilchfrischkäse	Jermini <i>et al.</i> , 1990
Brasilien	1994	7	Minas Käse	Pereira <i>et al.</i> , 1996
Japan	2000	13420	Milchpulver	Asao <i>et al.</i> , 2003; Ikeda <i>et al.</i> , 2005
Norwegen	2003	8	Rohmilch	Jørgensen <i>et al.</i> , 2005a
Slovenien	2004	7	Hüttenkäse	EFSA, 2006

2.6.5. *Verhalten in Rohmilch und Rohmilchprodukten*

S. aureus vermehrt sich bei Temperaturen von 6,5-50°C, wobei das Optimum bei 30°C-40°C liegt. Der optimale pH-Wert für *S. aureus* liegt bei pH 7,0-7,5. Wachstum ist noch möglich bei einem pH-Wert von 4,2-9,3. *S. aureus* vermag sich in Lebensmitteln mit 15%

Salz zu vermehren (BAIRD-PARKER, 1965). Auch bei geringer Wasseraktivität (a_w -Wert) können sich Staphylokokken noch vermehren. Ein a_w -Wert von 0,93 ist die Grenze für die meisten im Lebensmittel vorkommenden Mikroorganismen. Staphylokokken können sich hingegen noch bei einem a_w -Wert von 0,86 vermehren, wodurch sie in Lebensmitteln mit einem bestimmten a_w -Bereich einen Selektionsvorteil haben (TROLLER, 1976).

Zusammensetzung, pH-Wert und a_w -Wert von Milch ermöglichen *S. aureus* sowohl Wachstum als auch Toxinbildung (TATINI, 1973). Allerdings kann eine intakte Begleitflora in der Rohmilch Vermehrung und Enterotoxinbildung von *S. aureus* verhindern, zumindest solange nicht spezielle Bedingungen (Zugabe von Salz, inhibitorische Substanzen) ein selektives Wachstum von *S. aureus* erlauben (TATINI und JEZESKI, 1971; ASPERGER, 1994).

Auch Rohmilchkäse bietet *S. aureus*, abhängig von den Produktionsmethoden, gute Bedingungen für die Vermehrung und Enterotoxinbildung (OLSON und MOCQUOT, 1980; GENIGEORGIS, 1989; OTERO *et al.*, 1993). Während der Reifung und Lagerung ist je nach Käsetyp ein unterschiedlicher Keimzahlverlauf festzustellen. Für Hartkäse wird insgesamt über eine Abnahme der *S. aureus*-Zahl während Reifung und Lagerung berichtet (TUCKEY *et al.*, 1964; GAYA *et al.*, 1988; GOMEZ-LUCIA *et al.*, 1986; NUNEZ *et al.*, 1988; OTERO *et al.*, 1993). *S. aureus* kann aber mehr als 60 Tage lang während der Reifung von Hartkäse persistieren (IBRAHIM *et al.*, 1981; GOMEZ-LUCIA *et al.*, 1986; GAYA *et al.*, 1988; ECKNER und ZOTTOLA, 1991). Dabei kann noch Toxin nachgewiesen werden, wenn *S. aureus* nicht mehr festgestellt werden kann (VERNOZY-ROZAND *et al.*, 1998). In Käse mit höheren Wassergehalten wurden auch gegen Ende der Lagerungszeit noch Keimzahlen von 10^6 - 10^7 KBE/g festgestellt (DOS SANTOS und GENIGEORGIS, 1981; STECCHINI *et al.*, 1991).

Bei Temperaturen unter 7°C werden Vermehrung und Enterotoxinbildung fast vollständig verhindert, so dass die Kühlung von Lebensmitteln in diesem Temperaturbereich eine wirksame Präventionsmaßnahme darstellt (MOSEL und VAN NETTEN, 1990). Nach ASPERGER (1991) müssen zur Produktion von Toxinmengen, die zu einer Lebensmittelvergiftung führen, bei der Herstellung von Käse neben ungenügender Kühlung weitere Fehler vorgekommen sein, wie lange Lagerungszeiten und Bedingungen, die das Wachstum der obligaten Reifungsmikroflora beeinträchtigen. Bei Rohmilchweichkäse ist allerdings nach den Untersuchungen von MÜLLER (1993) davon auszugehen, dass es auch unter optimalen Bedingungen zur Enterotoxinbildung kommen

kann, vorausgesetzt, die verwendete Rohmilch ist mit Enterotoxinbildnern mit einer Ausgangskeimzahl von 10^3 KbE/ml kontaminiert. Weichkäse ist durch seinen hohen Wassergehalt und die kurze Reifungszeit ein sehr risikoreiches Produkt (ZANGERL und OSL, 1992).

Für Rohmilchfrischkäse konnten JERMINI *et al.* (1990) nachweisen, dass unter produktionsüblichen Bedingungen Keimzahlen innerhalb weniger Stunden erreicht werden können, die zur Toxinbildung führen.

Pasteurisierungsverfahren töten *S. aureus* zuverlässig ab, inaktivieren aber nicht die Toxine.

2.6.6. Vorkommen in Milch

Tabelle 9: Vorkommen und durchschnittliche Keimzahlen von *S. aureus* in Rohmilch in Afrika

Land	Gesamtprobenzahl	<i>S. aureus</i> positiv	Durchschnittliche Keimzahl	Referenz
Zimbabwe	12	7 (58,3%)	$1,6 \times 10^5$ KbE/ml bis $6,3 \times 10^7$ KbE/ml	Gran <i>et al.</i> , 2003
Südafrika		40%	Keine Angabe	O’Ferrall-Berndt, 2003
Mali	490	15%	$6,8 \times 10^2$ KbE/ml	Bonfoh <i>et al.</i> , 2003a
Kenia	54	9 (16,7%)	Keine Angabe	Shitandi und Gathoni, 2003
Zambia	76	17 (22,4%)	1×10^5 bis $2,4 \times 10^6$ KbE/ml	Pandey <i>et al.</i> , 1996
Nigeria	100	77 (77%)	$4,2 \times 10^3$ KbE/ml bis 1×10^4	Umoh <i>et al.</i> , 1990
Kenia	201	83 (41%)	Keine Angabe	Kayihura <i>et al.</i> , 1987

Angaben über den Anteil Enterotoxin-bildender *S. aureus*, isoliert aus Rohmilch, variieren von 5-74%. Vor allem SEC- und SED-Produzenten werden aus Milch von an Mastitis erkrankten Kühen isoliert (TAKESHIGE *et al.*, 1983; BECKER *et al.*, 1989; JERMINI *et al.*, 1990; GILMOUR und HARVEY, 1990;). JØRGENSEN *et al.* (2005b) isolierten 163 *S. aureus*-Stämme aus 220 Rohmilchproben und 36 (22,1%) davon produzierten Enterotoxine (17,2% SEC, 2,5% SED und je 1,2% SEB und SEA+SEC).

BONFOH *et al.* (2003a) untersuchten auch fermentierte Milch von Märkten in Mali und fanden *S. aureus* in 3% der Proben mit einem durchschnittlichen Gehalt von $1,7 \times 10^2$ KBE/ml.

Mehrere Studien untersuchten das Vorkommen von Koagulase-positiven Staphylokokken in Rohmilchkäse. GARCIA *et al.* (1987) isolierten Koagulase-positive Staphylokokken aus drei von 36 Proben Manchega Käse, von denen nur ein Stamm Enterotoxin bildete. ABBAR und MOHAMMED (1986) isolierten 24 Koagulase-positive Staphylokokken-Stämme aus 23 Proben, sechs davon produzierten Enterotoxine. Deutlich weniger Enterotoxin-produzierende Staphylokokken fanden CASTRO *et al.*, (1986) in 103 *S. aureus*-Isolaten aus 73 Käseproben. KUPLULU *et al.* (2004) untersuchten 214 Käseproben von Märkten in Ankara. 56 (26,2%) der Proben enthielten Koagulase-positive Staphylokokken, 35 (16,4%) Isolate produzierten Enterotoxine.

2.7. Clostridien

2.7.1. Taxonomie

Das Genus *Clostridium* gehört zur Familie der *Clostridiaceae*. Sie können weiter unterteilt werden in zwei Gruppen: nicht-invasive Clostridien, dazu gehören *Clostridium (C.) tetani* und *C. botulinum*, und invasive Clostridien wie *C. perfringens*, *C. novy*, *C. haemolyticum*, *C. septicum*, *C. chauvoei* und *C. difficile*.

2.7.2. Morphologie, Kultur und biochemische Eigenschaften

Clostridium perfringens ist ein gram-positives, sporenbildendes, unbewegliches, Katalase-negatives, anaerobes Stäbchen. Die Bakterien vermehren sich bei Temperaturen zwischen 12°C und 50°C, mit einem Optimum bei 43°C bis 47°C. Der optimale pH-Wert für die Vermehrung liegt bei pH 6,0-7,5, Vermehrung ist jedoch möglich bis zu pH 5,0-5,5. Der minimale a_w -Wert für Vermehrung ist 0,95 (ANDERSSON *et al.*, 1995; McCLANE, 1997; RHODEHAMEL und HARMON, 1998).

2.7.3. Erkrankungen bei Mensch und Tier

C. perfringens wird entsprechend der verschiedenen Exotoxine (alpha, beta, epsilon und tau), die es produziert, in fünf Gruppen (A-E) eingeteilt (OAKLEY und WARRACK, 1953). Exotoxine A, C und D sind humanpathogen, während B, C, D und E, vermutlich auch A, tierpathogen sind. Das Enterotoxin, das von den Typen A und C produziert wird,

unterscheidet sich von den Exotoxinen und ist verantwortlich für die akute Diarrhöe, die das vorherrschende Symptom einer Lebensmittelintoxikation durch *C. perfringens* ist. Stämme des Typs A sind verantwortlich für Gasgangrän, nekrotisierende Kolitis, periphere Pyrexie, Septikämie und lebensmittelbedingte Infektionen. Typ C produziert β -Toxin, das verantwortlich ist für eine nekrotisierende Enteritis (McDONEL, 1986).

Das von den Typen A und C produzierte Enterotoxin wird hauptsächlich im Darm gebildet und in Verbindung mit einer Sporulation durch Lysis der Sporangia freigesetzt (GRANUM, 1990). Dies bedingt eine erhöhte kapillare Permeabilität, Vasodilatation und exzessive Flüssigkeitsansammlung im Verdauungstrakt (KATSARAS und HILDEBRANDT, 1979). Geringe Menge können auch schon im Lebensmittel gebildet werden, was zu einem beschleunigten Auftreten der Symptome führt (NAIK und DUNCAN, 1977).

Abgesehen von der Toxinproduktion zeigt *C. perfringens* weitere Eigenschaften, die Lebensmittelintoxikationen durch diesen Keim begünstigen. Die vegetativen Zellen haben die Fähigkeit, sich unter optimalen Bedingungen in nur 10 Minuten zu verdoppeln, was es dem Bakterium erlaubt, sich im Lebensmittel in kürzester Zeit zu vermehren. Außerdem bildet *C. perfringens* Sporen, die sehr resistent gegen Bestrahlung, Trocknung und Hitze sind. Sporen überstehen nicht nur eine Hitzebehandlung (z.B. 70°C-80°C für 20 min.), sie werden im Gegenteil dadurch noch zur Keimung aktiviert (LABBE, 1989). Dementsprechend überstehen die Sporen eine Pasteurisierung. Durch die Erhitzung werden sie zur Vermehrung angeregt, welche durch die nun fehlende Begleitflora begünstigt wird (BRYAN, 1983). *C. perfringens* ist in der natürlichen Umgebung ubiquitär (HOBBS, 1979), z.B. im Boden (bis 10^3 - 10^4 KBE/g), aber auch in Lebensmitteln, in Staub und im Darmtrakt von Menschen (typischerweise 10^3 - 10^6 KBE/g) und Tieren verbreitet.

Diese Verbreitung wurde lange als die Ursache für das häufige Vorkommen von *C. perfringens* Typ A-Intoxikationen angenommen. Doch zwei unabhängige Studien (VAN DAMME-JONGSTEN *et al.*, 1989; KOKAI-KUN *et al.*, 1994) fanden heraus, dass weniger als 5% aller *Clostridium perfringens*-Isolate das *cpe*-Gen (*C. perfringens enterotoxin*) aufweisen, welches entscheidend ist für die Entwicklung der Symptome einer *C. perfringens* Typ A-Intoxikation. Das Reservoir dieser Stämme ist noch nicht eindeutig geklärt. *C. perfringens* Typ A-Intoxikationen zählen zu den häufigsten lebensmittelbedingten Erkrankungen in Europa und den Vereinigten Staaten. Das CDC (Center for Disease Control and Prevention) berichtete, dass zwischen 1973 und 1987 in

den USA 190 Ausbrüche von *C. perfringens* Typ A-Intoxikationen auftraten. Das entspricht 10,2% aller bakteriellen lebensmittelbedingten Erkrankungen, mit 12.234 Patienten, darunter 12 Todesfälle (BEAN und GRIFFIN, 1990). Die Zahl nicht-dokumentierter Fälle ist sicherlich größer. Solche Ausbrüche involvieren meist eine große Anzahl an Patienten (Median=25 nach BEAN und GRIFFIN, 1990) und passieren meist in Einrichtungen der Gemeinschaftsverpflegung. Dieses epidemiologische Muster resultiert aus mindestens zwei Faktoren: Erstens werden in Großküchen auch größere Mengen Lebensmittel vorgekocht und warm gehalten, was *C. perfringens* das Wachstum ermöglicht. Zweitens scheinen Lebensmittelinspektoren wegen der unspezifischen Symptome nur dann eine Untersuchung einzuleiten, wenn viele Menschen gleichzeitig an Diarrhöe erkranken. Die Symptome einer *C. perfringens* Typ A-Intoxikation treten 8 bis 24 Stunden nach dem Verzehr des kontaminierten Lebensmittels auf und verschwinden meist nach 12 bis 24 Stunden. Sie gehen einher mit Diarrhöe und schweren abdominalen Krämpfen. Erbrechen und Fieber treten in der Regel nicht auf (LABBE, 1989; McDONEL, 1986). Todesfälle treten nur sehr selten auf und betreffen dann besonders anfällige Personengruppen wie Kleinkinder, Kranke und ältere Menschen.

Da die meisten *C. perfringens* nach der Aufnahme im Magen durch die Magensäure zerstört werden (HOBBS, 1979), treten Symptome einer Intoxikation nur nach Verzehr von stark kontaminierten Lebensmitteln auf ($>10^6$ - 10^7 KbE/g) (McCLANE, 1992). Fleisch und Geflügel sind die wichtigsten Vehikel für die Übertragung von *C. perfringens* mit Typ A-Symptomatik (LABBE, 1989). Sporen von *C. perfringens* sind häufig in Milch vorhanden, doch haben sie milchhygienisch wegen der niedrigen Keimzahlen nur eine geringe Bedeutung. Lebensmittelvergiftungen mit den Toxinen von *C. perfringens* treten mit Milch und Erzeugnissen aus Milch im Gegensatz zu anderen Lebensmitteln nur selten auf. Allerdings wurde 1933 von einem Ausbruch von Fieber und flatulenter Diarrhöe bei Kleinkindern berichtet, der auf mit *C. perfringens* kontaminierte Milch zurückgeführt wurde (NELSON, 1933).

C. perfringens Typ B verursacht Dysenterie bei Lämmern und eine Enterotoxämie, *C. perfringens* Typ D ist verantwortlich für die Enterotoxämie der Schafe (Breinierenkrankheit) und *C. perfringens* Typ E führt zur Enteritis der Hasen.

Clostridium perfringens Typ A verursacht eine nekrotische Enteritis in Geflügel. Außerdem löst er Durchfall bei Hunden und Katzen aus. *Clostridium perfringens* kann in

seltenen Fällen Mastitis bei Kühen verursachen, entweder als alleiniger Auslöser oder in Kombinationen mit anderen Bakterien, insbesondere *Staphylococcus aureus*.

2.7.4. Vorkommen in Milch

In Argentinien untersuchte VARELA (1998) 608 Viertelgemelksproben in 1995 und 656 in 1996. Dabei wurden *C. perfringens* in 59 (9%) der Proben von 1995 und in 79 (12%) der Proben von 1996 isoliert.

TORRES-ANJEL *et al.* (1976) fanden bei Untersuchungen in Lateinamerika *C. perfringens* in 13 (3,5%) von 376 Viertelgemelksproben von Milchkühen. Etwas höhere Raten fanden MOUSTAPHA und MARTH (1993) in den USA, wo *C. perfringens* aus 29 (9,3%) von 312 Viertelgemelksproben isoliert werden konnte.

Clostridiensporen gelangen über Kot, aber auch durch unzureichend gereinigte Milchbehälter in die Milch, wie von SIVA und SANNABHATI (1994) beschrieben wird. Sie untersuchten sowohl Kotproben als auch gewaschene Milchkannen auf H₂S-reduzierende Clostridien und fanden durchschnittlich $5,2 \times 10^4$ respektive $5,5 \times 10^4$ KbE/ml.

2.8. Bacillus cereus

2.8.1. Taxonomie

Bacillus (B.) cereus als aerober endogener Sporenbildner gehören zum Genus *Bacillus* der Familie der *Bacillaceae* (GARRITY *et al.*, 2001). Zur *Bacillus cereus*-Gruppe gehören *B. cereus*, *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, *B. weihenstephanensis* und *B. pseudomycooides*.

2.8.2. Morphologie, Kultur und biochemische Eigenschaften

Bacillus spp. sind sporenbildende, aerobe, fakultativ anaerobe, gram-positive Stäbchen, die üblicherweise im Boden und im Wasser zu finden sind. Die ovalen Endosporen werden zentral oder subterminal ohne Anschwellen der Mutterzelle gebildet. Die Kolonien sind matt, flach und zeigen einen welligen Rand. Wachstum erfolgt zwischen 4°C und 50°C, bei einem Optimum von 28°C-37°C (DUFFRENNE *et al.*, 1995; JAQUETTE und BEUCHAT, 1998; VAN NETTEN *et al.*, 1990). DUFFRENNE *et al.* (1994) untersuchten die Eigenschaften von psychrotrophen Stämmen von *Bacillus cereus* und fanden, dass 17%

der Isolate bei Temperaturen unter 7°C wuchsen und dabei Enterotoxin produzierten. Das ist bedeutend für die Lebensmittelindustrie. Solche psychrotrophen Stämme wurden bereits bei Lebensmittelintoxikationen isoliert (VAN NETTEN *et al.*, 1990). *Bacillus* spp. wachsen zwischen pH 4,9 und pH 9,3 und einer Wasseraktivität (a_w) über 0,95 (NaCl, Glukose) (MURELL, 1989). Die Sporen sind relativ hitzebeständig und überstehen 6,7 bis 8,3 Minuten bei 100°C (GILBERT, 1979). Das Bakterium ist Katalase-positiv und Oxidase-negativ.

2.8.3. *Erkrankungen bei Mensch und Tier*

Bacillus cereus verursacht Lebensmittelvergiftungen durch die Bildung der Phospholipase C (Lecithinase) (auch vorhanden bei *B. mycoides*, *B. thuringiensis* und *B. anthracis*), eines Hämolytins und zweier Toxine, die zu Durchfall (*diarrhoeal toxin*) oder Erbrechen (*emetic toxin*) führen. Ein weiteres thermostabiles, Erbrechen-auslösendes Toxin, Cereulide, wurde erst 1996 von AGATA *et al.* identifiziert.

Das diarrhoeische Enterotoxin ist ein hitzelabiles Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 40 kDa, das vermutlich während des Wachstums von *B. cereus* im Darm gebildet wird (DONTA, 1986; DROBNIIEWSKI, 1993; KRAMER und GILBERT, 1989). Das emetische Toxin ist ein hitzestabiles Peptid mit einem Molekulargewicht von 5-7 kDa, das bereits im Lebensmittel gebildet wird und einer Proteolyse widersteht (TURNBULL, 1986; KRAMER und GILBERT, 1989; SHINAGAWA *et al.*, 1992).

Das Krankheitsbild mit Durchfall erscheint nach einer Inkubationszeit von 8-16 Stunden und ist begleitet von akutem Durchfall, Übelkeit und abdominalen Schmerzen. Fieber und Erbrechen treten in allgemeinen nicht auf. Die Symptome verschwinden ohne Behandlung nach 12 bis 24 Stunden.

Das Syndrom mit Erbrechen tritt nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten bis fünf Stunden auf. Es ist begleitet von akuter Übelkeit, Erbrechen, abdominalen Schmerzen, und seltener, Durchfall. Meist dauert die Erkrankung 6-24 Stunden.

Die häufigste Ursache einer Infektion ist die Aufnahme von Lebensmitteln, die nach dem Kochen bei Raumtemperatur gelagert wurden. Dies ermöglicht die Bildung von Sporen und Toxinen. Sehr viele Ausbrüche wurden in Zusammenhang mit gekochtem Reis, Gewürzen, Milch und Milchprodukten gebracht. GRANUM (2005) gibt für das Krankheitsbild mit Durchfall eine infektiöse Dosis von 10^5 - 10^7 *B. cereus* an und für das

emetische Syndrom 10^5 - 10^8 KbE/g. PAANEN *et al.* (2002) benennen für Cereulide eine Emesis-auslösende Dosis von $10\mu\text{g/kg}$ Körpergewicht.

Für das Auftreten von Krankheitsfällen scheinen auch individuelle Faktoren eine Rolle zu spielen. Kleinkinder, Senioren, immuninkompetente Personen und Menschen mit gastrointestinalen Störungen sind besonders erkrankungsgefährdet.

Massenerkrankungen nach Gemeinschaftsverpflegung traten infolge küchentechnischer Fehler auf, wie z.B. Aufbewahrung von Pudding in zu hoher Schicht, Warmhalten von Reis und mehlgebundenen Soßen sowie langfristige Aufbewahrung von zubereiteter Kindernahrung aus Trockenmilchprodukten. Hierbei führte die fehlende Auskühlung nach der Erhitzung zur Auskeimung vorhandener *Bacillus cereus*-Sporen. Wenn die Speise zusätzlich in großen Mengen hergestellt wurde, so sind in der Tiefe der Gefäße oft mikroaerobe Bedingungen gegeben, die die Enterotoxinbildung fördern können. Das Vorhandensein von Kohlenhydraten beschleunigt diesen Prozess (BEUTLING und BÖTTCHER, 1998).

Es sollte immer bedacht werden, dass Kühltemperaturen nur kurzfristigen Schutz vor einer Enterotoxinbildung bieten. Psychrotrophe Stämme können bei längeren Aufbewahrungszeiten von Speisen ebenfalls gefährliche Toxinmengen bilden.

Trotzdem gibt es wenige Berichte über Fälle von Intoxikationen durch Milchprodukte. Dafür gibt es verschiedene mögliche Erklärungen: Zum einen werden viele Lebensmittelinfektionen durch Milch gar nicht erst als Ausbruch bewertet, da nur ein oder zwei Familienmitglieder betroffen sind. Zum Anderen produziert *B. cereus* eine Protease, die den Geschmack der Milch beeinträchtigt, weshalb Milch mit hohen Konzentrationen an *B. cereus* nicht mehr konsumiert wird. Wahrscheinlicher ist jedoch, dass Milch hauptsächlich psychrophile Stämme der *B. cereus*-Gruppe, vor allem *B. weihenstephanensis*, enthält. STENFORS *et al.* (2001) fanden bei der Untersuchung von 50 Stämmen *B. weihenstephanensis* nur sechs, die genug Enterotoxine produzierten, um eine Lebensmittelvergiftung auszulösen. Größere Bedeutung haben Lebensmittel, die mit Milchpulver hergestellt werden, da die Sporen auch bei der Sprühtrocknung keimen und sich danach im rekonstituierten Produkt vermehren. Tabelle 10 gibt eine Übersicht über bekannte Ausbrüche von *Bacillus cereus*-Intoxikationen durch Milchprodukte.

Tabelle 10: *Bacillus cereus*-Lebensmittelvergiftungen durch Milchprodukte

Ort	Jahr	Fälle	Ursprung	Referenz
Niederlande	Ende 80-er	280	Pasteurisierte Milch	van Netten <i>et al.</i> , 1990
Chile	1981	35	Säuglingsnahrung	Cohen <i>et al.</i> , 1984
USA		8	Milchpulver	Holmes <i>et al.</i> , 1981
England	1976	1	Pasteurisierte Sahne	Galbraith <i>et al.</i> , 1982 ; Gilbert und Parry, 1977
Rumänien			Milch	Gilbert, 1979
England	1975	2	Milchpulver	Pinegar und Buxton, 1977
Niederlande	1976	1	Milchpulver	Gilbert und Parry, 1977
Kanada			Feta Käse	Schmitt <i>et al.</i> , 1976

Neben gastrointestinalen Störungen kann *B. cereus* auch Erkrankungen einzelner Organe, seltener Bakteriämien oder Septikämien verursachen. Er ist ein gefürchteter Erreger entzündlicher und geschwüriger Reaktionen an Hornhaut, Linse und Netzhaut des Auges (Panophthalmien) beim Menschen. Bei solchen Erkrankungen sind Permeabilitätsfaktoren und proteolytische Eigenschaften des Keimes von großer Bedeutung (DROBNIEWSKI, 1993). Wenn Lungeninfektionen durch *B. cereus* verursacht werden, entstehen therapeutisch schwierig zu beherrschende Pneumonieförmungen mit fatalem Ausgang.

Beim Rind kann *B. cereus* gelegentlich Mastitiden und Aborte verursachen (WOHLGEMUTH *et al.*, 1972).

Für Bienen und andere Insekten kann eine *B. cereus*-Infektion tödlich verlaufen, ähnlich einer *B. thuringensis*-Infektion (LYSENKO, 1972).

2.8.4. Verhalten in Rohmilch und Rohmilchprodukten

B. cereus ist als Lebensmittelverderbniserreger bekannt und verdirbt auch Milch und Milchprodukte (STONE, 1952; STONE und ROWLANDS, 1952; FRANKLIN, 1969; COX, 1975). Durch Sporenbildung ist *B. cereus* hitzeresistent, so dass auch Kontaminationen von hitzebehandelter Milch und Milchprodukten auftreten (WONG *et al.*, 1988b). Psychrotrophe *B. cereus* können sich auch bei 6°C Lagertemperatur noch

vermehren, mit Generationszeiten zwischen 12 und 23 Stunden (GRIFFITHS und PHILIPPS, 1990). Auch Toxinproduktion in Milch bei niedrigen Temperaturen ist möglich, wobei die Toxinbildung mit steigender Temperatur ebenfalls zunimmt (WONG *et al.*, 1988a; CHRISTIANSSON *et al.*, 1989; GRIFFITHS, 1990; VAN NETTEN *et al.*, 1990). Zur Produktion von Toxinmengen, die eine Erkrankung auslösen können, sind Keimzahlen in der Größenordnung von mindestens 10^6 - 10^7 pro Gramm bzw. Milliliter Lebensmittel erforderlich (MURELL, 1989; GRIFFITHS, 1990). Im Experiment konnte diese Keimzahl in pasteurisierter Milch innerhalb von zwei Wochen Lagerung bei 7,5°C erreicht werden (LANGEVELD *et al.*, 1996). Rohmilch kann nicht solange ohne Anzeichen von Verderbnis gelagert werden.

B. cereus übersteht in Weichkäse eine Lagerung bei 4°C, 8°C und 20°C. Bei Lagerung bei 20°C kommt es zur Vermehrung (LITTLE und KNOCHEL, 1994). In Frischkäse ist bei Lagerungstemperaturen von 10°C und 20°C eine Vermehrung möglich (SIMS *et al.*, 1989). Auch ist *B. cereus* nach mehrmonatigen Reifungsperioden noch aus Käse zu isolieren (MIKOLAJCIK *et al.*, 1973; EL-DAIROUTY *et al.*, 1990). Im Verlauf der Reifungsphase versport *B. cereus* zunehmend (MIKOLAJCIK *et al.*, 1973).

2.8.5. *Vorkommen in Milch*

Sporen von *Bacillus cereus* gelangen vom Boden, Kot, Einstreu, Futter, Melkausrüstung oder vom Euter beim Melken in die Milch (CRIELLY *et al.*, 1994; GIFFEL und BEUMER, 1998). *B. cereus* kann aber auch von an Mastitis erkrankten Kühen in die Milch ausgeschieden werden (HORVATH *et al.*, 1986; LOGAN, 1988). TORP *et al.* (2001) beschreiben außerdem, wie *B. cereus* den Pansen passieren kann und sich im Verdauungstrakt der Kuh vermehrt.

AHMED *et al.* (1983) untersuchten Rohmilch in Wisconsin und fanden in 9% der Proben *B. cereus* mit 100 Kbe/ml oder weniger. In Schottland fanden GRIFFITHS und PHILIPS (1990) psychrotrophe *Bacillus*-Species in 58% der Rohmilchproben, davon waren 39% *B. cereus*, von denen die meisten Enterotoxin produzierten (GRIFFITHS, 1990). Bei einer Untersuchung von 78 Milchproben (36 roh und 42 pasteurisiert) und 18 fermentierten Milchprodukten von Märkten in Nairobi fanden OMBUI und NDUHIU (2005) *B. cereus* in 57% der Proben. 81% der Isolate produzierten nicht-hämolyisierende Enterotoxine, während 53,2% Hämolyisin BL und 38,3% beide Enterotoxine produzierten. CRIELLY *et al.* (1994) fanden bei einer Studie in England, dass *B. cereus* in den Sommermonaten

häufiger aus Milch isoliert werden konnte, mit Konzentrationen bis zu 10^5 KbE/ml. Ähnliche Saisonalitäten wurden auch in anderen Arbeiten beobachtet (McKINNON und PETTIPHER, 1983). Da Sporen von *B. cereus* nicht in Rohmilch keimen, ist vermutlich ein schnelles Wachstum von vegetativen Zellen in ungekühlter Milch verantwortlich für das häufigere Vorkommen dieses Organismus während der Sommermonate (PHILIPS und GRIFFITHS, 1986; LARSON und JORGENSEN, 1996).

Bedenkt man das häufige Vorkommen von *B. cereus* in Milch und die Fähigkeit der Sporen die Pasteurisierung zu überstehen und danach zu keimen (STADHOUDERS *et al.*, 1980), ist es nicht überraschend, dass dieser Organismus auch häufig in pasteurisierter Milch zu finden ist. In der bereits erwähnten Studie in Wisconsin (AHMED *et al.*, 1983) enthielten 35% der pasteurisierten Milchproben *B. cereus* in Konzentrationen von bis zu 1000 KbE/ml. Andere Häufigkeiten wurden für China mit 2% (WONG *et al.*, 1988b), Kanada mit <10% (LIN *et al.*, 1998), Niederlande mit 25-40% (GIFFEL *et al.*, 1996) und Dänemark mit 56% (LARSEN und JORGENSEN, 1996) berichtet.

Pasteurisierte Milch ist eine häufige Quelle für die Isolierung von enterotoxinproduzierenden Stämmen mit 59% der Isolate aus Norwegen (GRANUM *et al.*, 1993), 76% aus den Niederlanden (GIFFEL *et al.*, 1996) und 100% aus Schottland (GRIFFITHS, 1990).

2.9. Hefen und Schimmelpilze

Hefen und Schimmelpilze sind in der Natur weit verbreitet. Die meisten Arten sind für die Milchwirtschaft ohne Bedeutung. Einige Arten werden aber gezielt in der Milchtechnologie eingesetzt, andere jedoch sind Schadmikroorganismen. *Penicillium camemberti* dient zur Herstellung von Camembert, Brie oder sonstigen Käsen mit Außenschimmel. *Penicillium roqueforti* wird zur Herstellung von Roquefortkäsen, Edelpilzkäsen und Gorgonzola verwendet.

Hefen und Schimmelpilze sind häufig für den Verderb von fermentierter Milch verantwortlich, da sie selbst bei niedrigen pH-Werten gut wachsen. Verderb durch Hefen äußert sich in einem hefigen oder fruchtigem Geruch und/oder Gasbildung. Hartkäse enthalten wenig Laktose, weshalb Hefen dort meist nicht wachsen. Joghurt, Buttermilch und Frischkäse hingegen enthalten ausreichend Laktose und bieten gute Bedingungen für das Wachstum von Hefen.

Zahlreiche Hefen (*Kluyveromyces*, *Saccharomyces*, *Debaromyces* u.a.) können in Joghurt, Sauermilch, Buttermilch und Frischkäse Geruchs- und Geschmacksveränderungen auslösen. Laktose-spaltende Hefen können Sauerrahmbutter verderben, wobei hefig-saure Geruchs- und Geschmacksveränderungen auftreten.

Starkes Wachstum von asporogenen *Candida*-Arten auf unreifem Harzerkäse und Camembertkäse kann das Wachstum der spezifischen Kulturen behindern.

Schimmelpilze siedeln sich häufig an den Wänden und Decken von Milchbehandlungsräumen an. Dadurch ist eine unerwünschte Kontamination von Milch, Milcherzeugnissen, Butter und Käse leicht möglich.

In Milch und besonders in fermentierten Milcherzeugnissen ist der „Weiße Milchsimmel“ (*Geotrichum candidum*) häufig anzutreffen, für den eine Bildung von Mykotoxinen nicht bekannt ist. Besonders Vertreter der Gattung *Penicillium*, aber auch andere ubiquitär vorkommende Schimmelpilze (*Aspergillus*, *Alternaria*, *Mucor*, *Fusarium*, *Cladosporium* und *Hormodendrum*) werden in verschimmelten Milcherzeugnissen und auf verschimmelten Käsen angetroffen.

Schimmelpilzsporen werden bei der Pasteurisierung zerstört (DOYLE und MARTH, 1975).

In Japan wurden 41 Milchproben auf Pilze untersucht und deren durchschnittliche Keimzahl mit 6×10^3 KbE/ml angegeben (NAKAE *et al.*, 1976). Höhere Keimzahlen wurden bei einer in Südafrika durchgeführten Studie (VILJOEN *et al.*, 2003) gefunden. Joghurt wurde bei verschiedenen Temperaturen gelagert und nach 30 Tagen wurde der Hefengehalt ausgezählt. Die höchsten Zahlen wurden bei den wärmeren Lagertemperaturen (25°C) mit 10^5 und 10^6 KbE/ml erreicht. Niedriger lagen die Zahlen bei 5°C mit 10^3 und 10^4 KbE/ml.

AREVALO *et al.* (1996) untersuchten Frischkäse aus (a) industrieller und (b) kleinbetrieblicher Herstellung auf den Kanarischen Inseln auf den Gehalt an Schimmelpilzen. Der durchschnittliche Gehalt der 112 Proben an Schimmelpilzen lag für (a) bei $3,9 \times 10^3$ KbE/ml und für (b) bei $4,4 \times 10^3$ KbE/ml. Isoliert wurde hauptsächlich *Geotrichum* und *Penicillium* (49,4% resp. 29,1%) aber auch Mykotoxin-produzierende *Aspergillus* (1,3%), *Fusarium* (5,1%), *Cephalosporium* (2,5%) und *Cladosporium* (5,1%).

Ähnliche Werte fand SCHÖNE (1996) in Ayib, einem äthiopischen Frischkäse, mit einem durchschnittlichen Gehalt an Hefen und Schimmelpilzen von $2,3 \times 10^3$ KbE/ml.

Eine höhere Kontamination mit Hefen und Schimmelpilzen fanden BONFOH *et al.* (2003a) in natürlich fermentierter Milch von Märkten in Mali. Die Proben enthielten durchschnittlich $6,7 \times 10^4$ KBE/ml Hefen und $1,4 \times 10^4$ KBE/ml Schimmelpilze.