

4. DISKUSSION

In der Milchverordnung vom 24.04.1995, bzw. in der EU-Milchhygienerichtlinie 92/46, finden sich in Bezug auf Milchprodukte Regelungen zum Vorkommen pathogener Keime (Anlage 6, Nr. 3.3.1.1). Dort heißt es u. a.: „Ferner dürfen Krankheitserreger und deren Toxine nicht in Mengen vorhanden sein, die die Gesundheit beeinträchtigen können“. Da *B. cereus* bei den mit Grenzwerten belegten pathogenen Keimen nicht genannt wird, fällt er unter diese allgemein gehaltene Anforderung. Aufgrund der Eigenschaften als Verderbniserreger ist eine Kontamination von Produkten auch aus Gründen der Qualitätssicherung unerwünscht.

Die Thermoresistenz der *B. cereus*-Sporen führt dazu, daß oftmals Trinkmilch und vor allem Milchpulver (Babynahrung) mit *B. cereus* kontaminiert sind, da die Sporen die Erhitzungsprozesse überleben (BECKER und TERPLAN 1987). Auch psychrotrophe toxinbildende Stämme sind beschrieben worden (CHRISTIANSSON et al. 1989).

Im Sinne der Unternehmen und des Verbrauchers ist daher für die bestehenden Produktionsanlagen ein Qualitätssicherungskonzept wünschenswert, mit dessen Hilfe eine Kontamination des Endproduktes bereits im Vorfeld unterbunden wird. Für die Beherrschung von Gefahren biologischer Natur (d. h. hier durch pathogene Mikroorganismen) ist das HACCP-Konzept (Hazard Analysis and Critical Control Point System) geeignet. Dies Konzept ist als Bestandteil eines allgemeinen Qualitätssicherungskonzeptes zu verstehen. Zum Aufbau eines solchen Systems fehlen jedoch noch eine Vielzahl von Informationen über Eigenschaften und Verhalten des Keimes, die in der vorliegenden Untersuchung zumindest teilweise erarbeitet worden sind. Folgende Daten wurden beispielhaft in einem großen Milchtrocknungsbetrieb erhoben:

1. Charakterisierung der isolierten *B. cereus*-Stämme mit Hilfe der konventionellen Bakteriologie, verschiedener Toxinnachweisverfahren und molekularbiologischer Methoden.
2. Umfelduntersuchung zum Auffinden des oder der möglichen Keimreservoirs und zur Aufklärung epidemiologischer Zusammenhänge.
3. Verwendung des erhaltenen Datenmaterials zur Erstellung einer Risikobewertung und eines Qualitätssicherungskonzeptes mit Hilfe von HACCP.

4.1 Charakterisierung von *B. cereus*-Stämmen

4.1.1 Vorkommen von *B. cereus* im Milchpulver

Im jahreszeitlichen Vergleich gibt es deutliche Unterschiede bei der Kontamination des Milchpulvers mit *B. cereus* (Tab. 6). Die stärkste Kontamination hat im Monat September stattgefunden, die geringste im Februar. Dieser Anstieg zum Frühsommer und das Abfallen zum Spätherbst deckt sich mit der Weidehaltung der Milchrinder zu dieser Jahreszeit. Häufig werden die Milchkühe auch auf der Weide gemolken, und die Milch muß von dort

zum Kühltank in den landwirtschaftlichen Betrieb gefahren werden. Eine schlechtere Melkhygiene und Unterbrechungen in der Kühlkette sind beim Melken auf der Weide im Gegensatz zur reinen Stallhaltung zu erwarten. Entsprechende saisonale Unterschiede bei der Kontamination der Milch sind auch von BECKER und TERPLAN (1987), CHAMPAGNE et al. (1994), SLAGHUIS et al. (1997) und TE GIFFEL et al. (1995) gefunden worden.

Bei den Milchpulvertypen des untersuchten Milchtrocknungsbetriebes handelt es sich um High heat-, Medium heat- und Low heat-Pulver. Für High heat-Pulver wird ein Milchkonzentrat bei einer feuchten Hitze von $> 100^{\circ}\text{C}$ hergestellt. Für Medium heat-Pulver wird das Konzentrat bei $90\text{-}100^{\circ}\text{C}$ produziert und für Low heat-Pulver wird die Milch für 15 sek. auf $72\text{-}73^{\circ}\text{C}$ erhitzt. Das Milchkonzentrat wird anschließend in einem Trocknungsturm unter trockener Hitze von $180\text{-}230^{\circ}\text{C}$ versprüht.

Die Kontaminationsrate im Milchpulver liegt für den untersuchten Betrieb bei 11 %, die zahlenmäßige Belastung positiver Chargen bei ca. 1-10 Sporen/g (Probengröße 750 g). Die Verteilung der isolierten *B. cereus*-Stämme nach der Herkunft aus den drei Milchpulvertypen stimmt größenordnungsmäßig mit dem Anteil des jeweiligen Milchpulvers an der Produktion überein (Tab. 5). Dies erklärt sich dadurch, daß selbst bei High heat-Pulver kein wirklich sporozider Erhitzungsprozeß stattfindet. FRANKLIN (1970) isolierte Sporen von *B. cereus*, die 135°C für vier Stunden überstanden. Erstaunlich ist jedoch, daß gerade bei High heat-Pulver signifikant (chi-Quadrat-Test) mehr Stämme isoliert wurden als bei den anderen Pulvertypen. Dies liegt vermutlich an der Isolierungsmethode. Da alle Stämme nach einer Voranreicherung in einem nicht-selektiven Medium isoliert wurden, ist davon auszugehen, daß bei Low heat- und Medium heat-Pulver die noch vorhandene Begleitflora zu einer Unterdrückung der Vermehrung von *B. cereus* führt. In High heat-Pulvern liegt nur noch eine Flora von Sporenbildnern mit einem geringeren Konkurrenzdruck vor.

4.1.2 Konventionelle Bakteriologie

Die Isolierung aus Milchpulver und Umfeldproben erfolgte für diese Arbeit in Anlehnung an die amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §35 LMBG (L 01.00/53). Das Ergebnis ermöglicht für das Milchpulver die Aussage, ob weniger oder mehr als 10 *B. cereus*/g enthalten sind. Kolonien, die sich auf PEMBA nicht eindeutig als *B. cereus* darstellten, sind mit Hilfe der Sudanschwarz-Färbung (mod. siehe Oxoid Handbuch S. 87) zur Darstellung der Lipidtröpfchen in vegetativen Zellen von *B. cereus* nach 1-tägiger Inkubation auf PEMBA-Platten identifiziert worden.

Der PEMBA-Nährboden hat inzwischen auch Eingang in den von der ISO übernommenen IDF-Standard zum Nachweis von *B. cereus* aus Milch und Milchprodukten (MPN-Verfahren) gefunden. Dort ist er als dem MYP-Agar gleichwertig, alternativ vorgesehen.

In der Morphologie sind alle hier untersuchten Stämme gleich. Bei den getesteten Bedingungen zum Vermehrungsverhalten reagieren die Stämme überwiegend einheitlich (Tab. 19). Diese Ergebnisse decken sich mit denen von SNEATH (1986) und JOHNSON (1984). Das Vermehrungsverhalten stimmt mit den bei GIBSON und GORDON (1974) und bei KRAMER und GILBERT (1989) zu findenden Ergebnissen überein. Das biochemische Leistungsspektrum der in dieser Arbeit untersuchten *B. cereus* Stämme ist nur in Teilen mit den Ergebnissen bei GIBSON und GORDON (1974) und bei SNEATH et al. (1996) identisch (Tab. 19). Es bestehen in der vorliegenden Untersuchung bei *B. cereus* hinsichtlich der Hydrolyse von Stärke und Gelatine, der Nitratreduktion und des Vermehrungsverhaltens bei 6 und 40° C und in 7 % NaCl stammspezifische Unterschiede. Auch ist die Verstoffwechslung von D-Xylose und L-Arabinose möglich, genauso wie in Ausnahmefällen die Lecithinase fehlen kann.

Tab. 19: <i>B. cereus</i>: Vergleich von eigenen Ergebnisse bei der konventionellen Bakteriologie mit Literaturdaten			
Parameter	eigene Untersuchungen n = 329	Nach SNEATH et al. (1996)	Nach GIBSON und GORDON (1974)
Gram-positiv	+	+	+
Sporangium aufgetrieben	-	-	-
Durchmesser der Zelle > 1,0 µm	+	+	+
ovale Spore	+	+	+
Beweglichkeit	+	+	d
β-Hämolyse	+	+	+
Oxidase	-*	-	k.a.
Katalase	+	+	+
PEMBA: Lecithinase-Bildung	d**	+	+
PEMBA: Blaufärbung (Mannit nicht verstoffwechselt)	+	k.a.	k.a.
Wachstum bei 6° C	d	***	-
Wachstum bei 40° C	d	d	d
Wachstum in 7 % NaCl	d	d	+
Verstoffwechslung von D-Mannit	-	-	-
Verstoffwechslung von D-Xylose	d	-	-
Verstoffwechslung von L-Arabinose	d	-	-
Nitratreduktion	d	+	+
Hydrolyse von Stärke	d	+	+
Hydrolyse von Gelatine	d	+	k.a.

* Stämme frisch aufgetaut, **1 negativer Stamm gefunden, ***bei 5° C getestet, d = differiert

In den durchgeführten Untersuchungen ist die Oxidasereaktion intensiver getestet worden. Die Versuchsreihen wurden mit BHI-Agar durchgeführt, um mögliche Verfälschungen durch Oxidase aus Erythrozyten in Blutagar zu vermeiden. Das Vorhandensein von Oxidase ist in der Literatur nicht beschrieben, in Bergeys Manual of Systematic Bacteriology (1986) wird Oxidase als nicht vorhanden aufgeführt. Die ersten Oxidasetests aller frisch aufgetauten 329 *B. cereus*-Stämme ergaben ein negatives Ergebnis (Tab. 19). Bei elf *B. cereus*-Stämmen wurde die Oxidasereaktion noch gesondert untersucht. Frisch aufgetaut konnte jeweils wieder eine negative Oxidasereaktion festgestellt werden. Neun Stämme reagierten aber nach dem ersten Überimpfen positiv, die beiden anderen nach dem vierten Überimpfen (Tab. 10). Es ist davon auszugehen, daß bei *B. cereus* die Fähigkeit zur Oxidase-Bildung durch das Tiefgefrieren zeitweilig unterdrückt, generell aber vorhanden ist.

Um mögliche Unterschiede zwischen den Stammpopulationen im Endprodukt und im Umfeld zu beurteilen, wurden die variablen Parameter des Vermehrungsverhaltens und des biochemischen Leistungsspektrums gesondert herangezogen. Unterschiede in den Eigenschaften lassen sich zwar zwischen Isolaten aus dem Milchpulver und dem Umfeld feststellen, diese sind jedoch nicht statistisch signifikant (Tab. 9). Die variablen Parameter lassen keine Schlußfolgerungen hinsichtlich des Ursprungs der Stämme aus dem Milchpulver zu. Sie geben keinen Hinweis auf eine Kontamination aus dem Umfeld der Produktionsanlage.

4.1.3 Molekularbiologie

Moderne molekularbiologische Methoden, wie z.B. die RAPD-PCR, erlauben nach BROUSSEAU et al. (1993) und JAYARAO und OLIVER (1994) bei einer Vielzahl von Bakterienspezies eine Identitätsbestimmung auf Stammebene. Sie bauen auf die Heterogenität des bakteriellen Chromosomensatzes, der durch Faktoren wie die Deletion oder die zufällige Verteilung von Insertionssequenzen zustande kommt. Die sogenannten "Primer" lagern sich in der PCR flankierend an entsprechende Genabschnitte an. Diese Genabschnitte werden mit Hilfe der Polymerase stark vervielfältigt. Dabei tragen sowohl die spezifische Anlagerung der Primer als auch die exponentielle Anreicherung von DNA zu einer hohen Spezifität (wenig falschpositive Ergebnisse) und Sensitivität (wenig falschnegative Ergebnisse) der Methode bei.

Die zur Differenzierung von *B. cereus*-Stämmen eingesetzte RAPD-PCR wurde im Rahmen dieser Arbeit neu entwickelt. Dieses Verfahren ist bekanntermaßen sehr empfindlich. Daher sind Stabilität in Bezug auf Kontaminationsanfälligkeit und Häufigkeit des Auftretens der einzelnen Banden bei Versuchswiederholungen zu prüfen. Die hier verwendeten Zufallsprimer sind sehr kurz, wodurch die Wahrscheinlichkeit, daß auch nicht von

B. cereus stammende DNA-Sequenzen amplifiziert werden, hoch ist. Aus diesen Gründen waren sorgfältiges und sauberes Arbeiten und ein häufiges Mitführen von Null-Kontrollen unabdingbar.

Diese Kontaminationsanfälligkeit wird auch von KWOK und HIGUCHI (1989) beschrieben. Danach ist die PCR als hochsensitives Verfahren sehr anfällig für falsch-positive Reaktionen. Eine besondere Gefahr besteht in der Kontamination fraglicher Proben durch PCR-Amplifikat, das bereits in kleinsten Mengen eine hohe Anzahl der gesuchten DNA-Kopien enthält. Zur Vermeidung solcher Kontaminationen sind eine Reihe von Vorsichtsmaßnahmen bekannt (KWOK und HIGUCHI 1989).

Nach CZAJKA und BATT (1994) erlauben stammspezifische Fingerprintmuster, die bei einer PCR nach entsprechender Primer-Auswahl entstehen, eine epidemiologische Aufklärung nicht nur innerhalb eines Betriebes sondern z.B. auch bei Krankheitsausbrüchen.

Für den Vergleich von Stämmen in der RAPD-PCR gilt als Standard, daß die Ergebnisse nur verwertbar sind bei Stämmen, deren DNA **gleichzeitig** in der PCR amplifiziert und die Amplifikate auf **einem** Gel aufgetragen wurden. Trotz dieser Vorgabe wurden hier mit einem Stamm und drei verschiedenen Primern Versuche vielfach wiederholt und das Auftreten der jeweils möglichen Banden erfaßt (Tabellen 11, 12, 13). Dadurch sollte gezeigt werden, daß eine Auswertung, wenn auch mit Einschränkungen, über mehrere Versuche möglich ist. Als Ergebnis zeigte sich, daß bei Primer 7 viele Banden im Auftreten sehr stabil waren, bei Primer 9 und 10 herrschte dagegen teilweise große Variabilität, die bei Primer 10 am stärksten war. Die Standardvorgabe wurde daher strikt eingehalten. Die Stämme für die epidemiologischen Verfolgsuntersuchungen wurden aus Gründen der Sicherheit immer im Doppelansatz getestet.

NILSSON et al. (1998) hatten die Untersuchungen von fünf *B. cereus*-Stämme in der RAPD-PCR fünf Mal wiederholt. Die fünf Bandenmuster von jedem einzelnen Stamm hatten eine Gemeinsamkeit von mindestens 93 %.

Für die epidemiologische Verfolgsuntersuchung wurden die Ergebnisse der RAPD-PCR von den 63 (davon 41 aus dem Milchpulver und 22 aus dem Umfeld) untersuchten *B. cereus*-Stämmen für eine Clusteranalyse (s. Kap. 3.2.2.2) zur Feststellung von Ähnlichkeiten herangezogen. Wenn mit der DNA-Hybridisierung Stämme für die taxonomische Einordnung verglichen werden, geht man von der Zugehörigkeit zu einer gemeinsamen Art bei > 90 % Ähnlichkeit aus. Verschiedene Stämme einer Art sind sich meist zu > 99 % ähnlich. Die hier eingesetzte RAPD-PCR arbeitet mit Sicherheit weniger präzise als die DNA-Hybridisierung, deshalb wurde die Auswertung auf Stämme bis zu ≥ 75 % Ähnlichkeit ausgedehnt.

Bei Anwendung dieser Methodik auf die mit allen drei Primern erzielten Ergebnisse ergaben sich sechs Paare mit Ähnlichkeiten zwischen 78,26 und 94,74 % (Tab. 14).

Da die mit Primer 10 erzeugten Banden in ihrer Häufigkeit des Auftretens bei Versuchswiederholungen weniger zuverlässig waren, wurde die Analyse nur mit den Ergebnissen der Primer 7 und 9 wiederholt. Dabei ergaben sich zwölf Stamm-Paare mit Ähnlichkeiten zwischen 76,92 und 100 % (Tab. 15).

Es zeigt sich, daß die Ähnlichkeit zwischen den Stämmen nichts mit den einzelnen Milchpulverchargen zu tun hat. Selbst Stämme, die am gleichen Produktionstag isoliert worden sind, wie die Stämme Nr. 287 bis 293, zeigten keine auffällige Ähnlichkeit. Es gibt nur eine Stammgruppe (29, 30, 37), die über drei Wochen im Milchpulver nachgewiesen wurde und eine Ähnlichkeit von 100 % besitzt. Aus dem Umfeld besitzt nur Stamm Nr. 937 eine 87,50 %ige Ähnlichkeit zu dieser Gruppe. Er wurde jedoch erst mehr als zwei Jahre später isoliert.

Die Ähnlichkeiten zwischen den beiden Gruppen Milchpulver und Umfeld sind insgesamt nicht signifikant. Außer dem Stamm Nr. 937 gibt es in dieser Untersuchung keine weiteren Ähnlichkeiten zwischen Stämmen aus dem Milchpulver und dem Umfeld.

Bezogen auf die Gesamtzahl analysierter Stämme sind insgesamt nur sehr wenige ähnliche Stämme gefunden worden. Die Hypothese, daß *B. cereus* möglicherweise als Bestandteil der sog. Hausflora auftritt und einzelne Stämme für eine kontinuierliche Kontamination des Endproduktes verantwortlich sein könnten, hat sich nach diesen Ergebnissen nicht bestätigt.

4.1.4 Toxintests

B. cereus kann eine ganze Reihe von verschiedenen Toxinen produzieren, auf die in Kapitel 2.3 genauer eingegangen wird.

Ob tatsächlich *B. cereus*-Toxine im Lebensmittel gebildet werden, ist neben der Vermehrung der Keime von der genetisch determinierten Fähigkeit zur Toxinbildung sowie von den geeigneten Bedingungen im Lebensmittel abhängig. Nicht jeder Stamm bildet unter allen Bedingungen Toxin. Außerdem müssen im Mittel 10^7 KBE von *B. cereus*/g vorhanden sein, damit Toxin überhaupt in nachweisbaren Mengen vorliegt (KRAMER und GILBERT 1989). Kompliziert wird die lebensmittelhygienische Bewertung noch dadurch, daß besondere Verbrauchergruppen wie Kinder, Kranke und Senioren schon bei Vorliegen von wesentlich geringeren Keimgehalten erkranken können (BECKER und TERPLAN 1987).

Für den direkten Nachweis von *B. cereus*-Toxinen stehen zur Zeit zwei kommerzielle Testkits zur Verfügung. Beide weisen jeweils eine Komponente eines Enterotoxin-Komplexes nach. Im Oxoid BCET-RPLA Kit wird nur die *per se* atoxische L₂-Komponente des von BEECHER et al. (1995) beschriebenen Hämolyisin BL nachgewiesen (BEECHER und

WONG 1994, GRANUM und NISSEN 1993). Der in dieser Arbeit eingesetzte Tecra[®]-ELISA detektiert die 45 kDa Komponente des nicht-hämolytischen Enterotoxins (LUND und GRANUM 1996). Beide Testkits weisen die jeweilige Komponente sowohl aus Lebensmitteln als auch aus *B. cereus*-Kulturfiltrat nach. Ihre höchste Toxizität erreichen beide Enterotoxin-Komplexe, wenn jeweils alle drei Komponenten des entsprechenden Toxin produziert werden.

Das emetische Toxin, welches im Lebensmittel präformiert wird (KRAMER und GILBERT 1989), wird zur Zeit hauptsächlich durch Fütterungsversuche an Rhesusaffen (GILBERT und KRAMER 1984, MELLING 1976, MELLING und CAPEL 1978, SHINAGAWA 1995) und an Moschusspitzmäusen (*Suncus murinus*) (TORII, SAITO und MATSUKI 1991) studiert. Ein neuartiges, empfindliches, günstiges und schnelles Verfahren zum Nachweis des emetischen Toxins ist von ANDERSSON (1998) beschrieben worden. Das Prinzip basiert auf dem Verlust der Beweglichkeit von Ebersperma in Anwesenheit des emetischen Toxins von *B. cereus*. Dabei entspricht die Nachweisgrenze aus dem Lebensmittel der von 10^6 bis 10^8 KBE *B. cereus*/g gebildeten Toxinmenge bei einer Probengröße von mindestens 3 g. Die Auswertung findet mit einem Phasen-Kontrast Mikroskop und dem Hamilton-Thorn Bewegungs-Analyzer statt.

Als weitere Methode für den Toxinnachweis werden vermehrt Zellkulturen eingesetzt (SEIDEL et al. 1996). In solchen Zellkulturverfahren werden Zelllinien, wie in dieser Arbeit die Vero-Zellen, zum Nachweis von Enterotoxin, oder genauer für den Nachweis der Zytotoxizität von *B. cereus*, verwendet. Dabei dient die Laktatdehydrogenase als Indikator für die Zellschädigung oder den Zelltod.

Mit Hilfe des Zytotoxizitätstests kann aber nur eine Aussage darüber getroffen werden, ob der untersuchte Stamm zytotoxisch wirkt oder nicht. Das Verfahren gibt keinen Hinweis auf ein spezielles Toxin von *B. cereus*.

4.1.4.1 ELISA für *B. cereus* diarrhoeisches Toxin

Der hier eingesetzte Tecra[®]-ELISA der Firma Bioenterprises Pty., Ltd., Roseville, NSW, Australien erlaubt in seiner Form als Fertigkit eine rein qualitative Auswertung der Proben. Mit diesem Kit kann nur eine Aussage über das Vorhandensein der 45 kDa Komponente des nicht-hämolytischen Toxins von *B. cereus* getroffen werden. Die Nachweisgrenze beträgt 1 ng dieser Komponente/g. Mit Hilfe einer Standard-Verdünnungsreihe zur Basis 2 mit bekanntem Toxingehalt gelang es zusätzlich eine quantitative Aussage zu treffen.

Die Ergebnisse der qualitativen und der quantitativen Untersuchungen stimmten grundsätzlich überein, d.h. qualitativ als positiv beurteilte Stämme bildeten auch immer mit dem quantitativen Test nachweisbare Toxinmengen. Bei der zusätzlichen Unterteilung der Toxin-positiven Stämme in drei Untergruppen bei der qualitativen Beurteilung gab es

Überschneidungen innerhalb dieser Gruppen bezüglich des quantitativen Toxingehaltes der *B. cereus*-Stämme (Tab. 17, Abb. 4). Dies ist anhand der unterschiedlichen Auswerteverfahren zu begründen. Die quantitative Auswertung fand mit Hilfe der mitgelieferten Farbskala statt, die qualitative photometrisch, wie in der mitgelieferten Anleitung beschrieben. Die Nachweisgrenze des Tecra[®]-ELISA von 1 ng Toxin/ml ist durch beide Auswerteverfahren bestätigt worden. Die produzierte Menge Toxin lag bei den einzelnen untersuchten Stämmen zwischen 0 ng und 320,5 ng/ml. 97,9 % der hier untersuchten *B. cereus*-Stämme wurden in diesem ELISA als positiv ermittelt.

CHRISTIANSSON (1993) hat den Tecra[®]-ELISA und den Oxoid RPLA Test mit den Ergebnissen von Zytotoxizitätsversuchen mit human embryonic lung cells (HEL) verglichen. Dabei stimmten die Resultate vom Tecra[®]-ELISA sehr gut mit denen des Zytotoxizitätstestes überein, die des Oxoid RPLA Testes hingegen nicht. DAY et al. (1994) kommen bei dem Vergleich der beiden Testkits zu dem Schluß, daß der Tecra[®]-ELISA der bessere Test ist. Bei dem Oxoid RPLA Test traten in den Untersuchungen sowohl falsch-negative als auch falsch-positive Ergebnisse auf.

4.1.4.2 Zytotoxizität

Für den Zytotoxizitätstest sind Vero-Zellen verwendet worden. Ihre morphologischen Veränderungen während des Versuches wurden mikroskopisch beurteilt. Häufig starben alle Zellen in dem Versuch ab. Eine objektive Bestätigung der Ergebnisse fand durch Bestimmung der Aktivität der von den Zellen freigesetzten LDH statt. Dabei wurde die Freisetzung der LDH gemessen und prozentual mit den Positivkontrollen verglichen (s. auch Kap. 3.2.3.2). Die untersuchten *B. cereus*-Stämme haben im Vergleich zu den Positivkontrollen zwischen 0,0 und 121,2 % LDH freigesetzt. Bei der morphologischen Beurteilung waren 48,3 % der *B. cereus*-Stämme positiv, bei der LDH-Messung 58,4 %. Alle bei der morphologischen Beurteilung positiven Stämme waren auch beim LDH-Test positiv. Der Unterschied ist durch die verschiedenen Methoden zu erklären, wobei die LDH-Messung als objektives Verfahren der mikroskopischen Beurteilung vorzuziehen ist.

Auffällig ist aber auch der deutliche Unterschied zwischen den als positiv beurteilten Stämmen bei der LDH-Messung (58,4 %) und denen im ELISA (97,9 %). Hierbei ist wieder festzustellen, daß alle bei der LDH-Messung positiven *B. cereus* Stämme auch im ELISA positiv reagiert haben. Bei einem Vergleich der beiden Nachweisverfahren für *B. cereus*-Toxine ist die Zytotoxizitätsmessung dem ELISA deutlich vorzuziehen, da bei diesem Verfahren ein direktes schädigendes Potential der Stämme nachgewiesen wird. Dem gegenüber weist der ELISA nur eine Komponente des nicht-hämolytischen Toxins von *B. cereus* nach. Diese Komponente läßt nicht einmal Rückschlüsse auf das Vorhandensein des gesamten Toxins zu und besitzt für sich alleine keine messbare Toxizität. Aus

dem Nachweis dieser Komponente darf folglich nicht direkt auf eine Toxizität des untersuchten Stammes geschlossen werden.

4.2 Umfelduntersuchung

Die Umfelduntersuchungen in dem Milchtrocknungsbetrieb wurden rein qualitativ durchgeführt. Dabei ergab sich eine Kontaminationsrate des Umfeldes der Produktionsanlage von 85,1 %. Damit scheint *B. cereus* durchgängig in dem Betrieb vorzukommen.

Die durchgeführten Charakterisierungen der hier isolierten *B. cereus*-Stämme lassen keinen Schluß zu, der auf einen typischen Hauskeim hindeutet. Insbesondere die Auswertung der RAPD-PCR, bei der alle 22 aus dem geprüften Umfeld gewonnenen Stämme unterschiedliche Bandenmuster besitzen, zeigt, daß es keine Ähnlichkeiten der Stämme auf molekulargenetischer Ebene gibt.

Die landwirtschaftlichen Betriebe und die Anlieferungsmilch sind im Rahmen dieser Arbeit nicht erfaßt worden. Doch die Untersuchungen des Milchpulvers und des Umfeldes des Milchtrocknungsbetriebes speziell mit Hilfe der RAPD-PCR zeigen ganz deutlich, daß es keine signifikante Clusterbildung mit *B. cereus*-Isolaten aus dem Milchpulver und dem Umfeld der Produktionsanlage gibt. Die Stämme müssen somit einen anderen Ursprung haben. Dabei kann es sich nur um die Anlieferungsmilch handeln.

Dieser Pfad müßte weiterverfolgt werden, um festzustellen, ob die Keime direkt aus dem Euter der Milchkuh stammen oder während des Melkprozesses die Rohmilch kontaminieren. In Untersuchungen von CHRISTIANSSON (1997) wird gezeigt, daß *B. cereus* während des Melkprozesses von außen in die Milch gelangt. Er kommt daher zu dem Schluß, daß sich die Kontamination der Milch durch gute Euterhygiene verringern läßt.

Aber auch die Kontamination aus dem Euter ist möglich. JONES und TURNBULL (1981) beschreiben 28 Mastitiden, bei denen *B. cereus* die Ursache war. Schon Jahrzehnte früher sind von BROWN und SCHERER (1957) zwei vergleichbare Fälle geschildert worden.

Daß die Milchprodukte durch Sporen in der Rohmilch kontaminiert werden, wird von LIN, SCHRAFT und GRIFFITHS (1997) bestätigt. Ebenso betrachten CHRISTIANSSON et al. (1998) und STADHOUDERS, HUP und HASSING (1982) die Sporen in der Anlieferungsmilch als primäre Ursache für die Kontamination von Milchprodukten. Sie weisen aber außerdem darauf hin, daß eine Kontamination zusätzlich überall während der Verarbeitung möglich ist.

Letzteres konnte in dem hier beschriebenen Betrieb jedoch nicht nachgewiesen werden.

4.3 Risikoanalyse

Nach den in der Literatur beschriebenen Daten und unter Einbeziehung der eigenen Untersuchungen soll der Versuch einer Risikoanalyse für das Vorkommen von *B. cereus* in Milchpulver gemacht werden. Dies erfolgt in Anlehnung an Richtlinien des Codex Alimentarius, die jetzt in letztgültiger Fassung verabschiedet wurden (CODEX ALIMENTARIUS 1998).

Der Prozeß der Risikobewertung (Risk analysis) besteht nach dem Codex-Standard aus der Risikoabschätzung (Risk assessment), dem Risikomanagement (Risk management) und der Risikovermittlung (Risk communication).

Eine "risk analysis" im Sinne von Codex Alimentarius ist ein langwieriges und umfangreiches Verfahren, das eine sehr große Datensammlung und entsprechende statistische Auswertung erfordert. Dies kann im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt werden. Dennoch sollen die Begriffe aus der Codex-Richtlinie verwendet werden, um die Anwendbarkeit der "Philosophie" der Risikobewertung zu verdeutlichen.

Risk assessment

Diesem Verfahren liegt eine vierstufige Vorgehensweise mit „Hazard identification“, „Hazard characterization“, „Exposure assessment“ und „Risk characterization“ zugrunde.

a) Hazard identification

Als Hazard wird ein biologisches, chemisches oder physikalisches Agens bezeichnet, das gesundheitsgefährdend ist und in bestimmten Lebensmitteln vorkommt (CODEX ALIMENTARIUS 1998).

Die Rolle von *B. cereus* als Infektions- bzw. Intoxikationserreger ist hinlänglich bekannt (z.B. CHRISTIANSSON 1992, GILBERT 1979, HAUGE 1955, MORTIMER und McCANN 1974, NOTERMANS und BATT 1998, VAN NETTEN et al. 1990, WHO 1992).

Verschiedene Enterotoxine und ein emetisches Toxin können von dem Keim gebildet werden (s.a. Kapitel 2.3). Zytotoxizität und die 45 kDa Komponente des nicht hämolytischen Toxins, das aus drei Bausteinen besteht, sind bei vielen Stämmen von *B. cereus* in dieser Arbeit nachgewiesen worden (58,4 % bzw. 97,9 %). Seine Toxizität wird außerdem von einer ganzen Reihe von Autoren belegt, die *B. cereus* und seine Produkte charakterisiert haben (BEECHER und WONG 1994, BENNETT et al. 1993, BEUTLING und BÖTTCHER 1998, MELLING et al. 1976, TURNBULL 1981).

Ursache für Ausbrüche von *B. cereus*-Intoxikationen reichen von Speisen in chinesischen Restaurants, über Fleisch, Gemüse und Obst hin zu Milch und Milchprodukten (GOOSEN, NOTERMANS und BORGDORFF 1997, TODD 1996, WHO 1992). Gerade in Verbindung mit Reisgerichten, aber auch mit Milch und Milchprodukten wird *B. cereus* nachgewiesen.

Für eine Diarrhoe muß der Keim selber aufgenommen werden. Die im Produkt gebildeten Enterotoxine haben wahrscheinlich keine Wirkung auf den Wirt, weil es im Magen zu einer fast vollständigen Inaktivierung kommt (GRANUM et al. 1993). Damit die Enterotoxine beim Wirt wirksam werden können, müssen sie im Dünndarm entstehen. Dies geschieht während der späten logarithmischen Phase der Vermehrung der Keime eben dort (GRANUM et al. 1993, GRANUM 1994). Bei diesem Krankheitstyp handelt es sich daher eher um eine Lebensmittelinfektion.

Die emetische Form hingegen ist eine Lebensmittelintoxikation. Das emetische Toxin wird während der Vermehrung von *B. cereus* im Lebensmittel präformiert (KRAMER und GILBERT 1989). Es bleibt bis zu einem pH-Wert von 2 und in Gegenwart von Trypsin und Pepsin stabil (SHINAGAWA et al. 1995), so daß es unbeschadet in den Intestinaltrakt gelangen kann.

Als Hazard ist folglich sowohl der Keim *B. cereus* selber als auch das emetische Toxin zu betrachten.

b) Hazard characterization

In diesem Schritt sollte eine qualitative oder quantitative Beurteilung der durch das Agens zu erwartenden Gesundheitsgefährdung erfolgen (CODEX ALIMENTARIUS 1998).

Die für *B. cereus* typischen Krankheitsformen hängen vom jeweiligen Toxintyp ab. Die Toxine verursachen Erbrechen oder Diarrhoe. Die Inkubationszeit für das "diarrhoeische Syndrom" beträgt acht bis sechzehn Stunden, es macht sich durch Magenkrämpfe und Durchfall bemerkbar. Übelkeit und Erbrechen treten beim "emetischen Syndrom" auf und setzen ein bis fünf Stunden nach der Toxinaufnahme ein (KRAMER und GILBERT 1989).

Nach Untersuchungen von LANGEVELD et al. (1996) besteht zwar ein Zusammenhang zwischen der aufgenommenen *B. cereus*-Menge pro ml, doch gibt es kein eindeutiges Dosis-Antwort-Verhältnis. Daher gehen LANGEVELD et al. (1996) davon aus, daß *B. cereus* nicht immer zu einer Erkrankung führt. Diese These läßt sich durch mehrere Ansätze rechtfertigen:

- Die produzierten Toxinmengen variieren auch bei den in dieser Arbeit untersuchten Stämmen deutlich zwischen 0,0 und 320,5 ng/ml in Bezug auf die 45 kDa Komponente des nicht hämolytischen Toxins. Es muß schon ein starker Toxinbildner aufgenommen werden, damit entsprechende Symptome auftreten.
- Psychrotrophe Stämme vermehren sich nur spärlich bei 37° C, und ihre Vermehrung im Darm könnte deshalb verlangsamt sein (NOTERMANS und BATT 1998).
- Resistenzbildung durch regelmäßige Aufnahme von *B. cereus* mit den Lebensmitteln (NOTERMANS und BATT 1998), wobei MELLING und CAPEL (1978) bei einem Fütte-

rungsversuch mit Affen für das emetische Toxin jedoch keine Resistenzausbildung festgestellt haben.

- Die Nährstoffgrundlage im Lebensmittel (Glukose, Laktose, Fruktose und Stärke) kann nach SUTHERLAND und LIMOND (1993) die Toxinproduktion und die Vermehrung beeinflussen.

Bei Versuchen von NIKODEMUSZ (1969) gelangten bei den Probanden $1,4 \times 10^{10}$ *B. cereus* in den Darm, wobei nur bei einer Person nach 72 h eine Diarrhoe festgestellt wurde. Der Versuch führte zu keinen weiteren auffälligen Symptomen.

Sowohl zum Auslösen einer Diarrhoe, als auch für das "emetische Syndrom" müssen im Mittel 10^7 *B. cereus*/g aufgenommen werden, doch reichen gegebenenfalls $1,2 \times 10^3$ bzw. 10^4 Keime aus (KRAMER und GILBERT 1989). Nach BECKER und TERPLAN liegt die untere Grenze bei 10^6 Keimen/g im Lebensmittel, damit eine Erkrankung ausgelöst wird, wobei Riskogruppen schon durch geringere Keimgehalte gefährdet sind. NOTERMANS und BATT (1998) sehen 10^4 *B. cereus*/g Produkt als minimale Infektionsdosis an.

c) Exposure assessment

In diesem Schritt ist die wahrscheinliche Aufnahmemenge des Agens über Lebensmittel zu bestimmen (CODEX ALIMENTARIUS, 1998).

In den hier durchgeführten Untersuchungen waren 11 % der Milchpulverproben mit *B. cereus* kontaminiert, wobei die positiven Proben ca. 1-10 Sporen/g enthielten bei einer Probengröße von 750 g.

STADHOUDERS, HUP und HASSING (1982) haben Daten der "Netherlands Controlling Authority for Milk and Milk Products" (COZ) ausgewertet. In den meisten positiven Proben wurden bis zu 20 *B. cereus*/g Milchpulver gefunden, in Ausnahmefällen aber sogar mehr als 100/g. Bei Untersuchungen von TE GIFFEL et al. (1996) in einem Milchtrocknungsbetrieb waren 60 % der Proben mit *B. cereus* kontaminiert. WONG, CHANG und FAN (1988) isolierten aus 29 % ihrer 94 Proben *B. cereus*. Die durchschnittliche Kontamination lag dort bei 74 KBE/g der positiven Proben. WALTHERW und LÜCK (1978) fanden in 26,7 % ihrer Proben *B. cereus* und im Durchschnitt 11,7 vegetative KBE/g und 3,9 Sporen/g.

Nach den oben zitierten Daten scheint die Kontamination des Pulvers wie bei der Rohmilch zu schwanken (s a. Kap. 2.4.3). Legt man die höchsten Werte zugrunde, so sind ca. 60 % der Proben mit 100 *B. cereus*/g Milchpulver kontaminiert. Dies wird sich während der Lagerung des Pulvers nur in geringem Maße verändern, da sich nach WONG, CHEN und CHEN (1988) *B. cereus* in Milchpulver aufgrund der geringen Wasseraktivität und der niedrigen Lagerungstemperatur in diesem Produkt kaum vermehrt. Somit bleiben diese Werte bis zum Lösen des Pulvers konstant.

Die tägliche Aufnahme von Milchpulver durch den Menschen läßt sich nur schwierig quantitativ abschätzen, da Milchpulver mit sehr unterschiedlichen Anteilen in diversen Lebensmitteln wie z.B. Wurst, Schokolade, Desserts und Babynahrung enthalten ist.

d) Risk characterization

In diesem Schritt soll unter Berücksichtigung der vorherigen Überlegungen abgeschätzt werden, mit welcher Häufigkeit und Schwere gesundheitsgefährdende Effekte in der Bevölkerung auftreten könnten (CODEX ALIMENTARIUS 1998).

Eine umfassende "Risk characterization" ist schwierig, weil Milchpulver wie oben angeführt in vielen verschiedenen Lebensmitteln enthalten ist. Dazu müßte die "Risk characterization" für jedes Lebensmittel einzeln durchgeführt werden.

Eine ganze Reihe von Krankheitsausbrüchen ist in Tabelle 1 dargestellt. Es darf jedoch nicht vergessen werden, daß sehr viele Einzelerkrankungen gar nicht entsprechend identifiziert werden, weil der Krankheitsverlauf so milde ist, daß die Personen nicht zum Arzt gehen.

Die von NOTERMANS und BATT (1998) beschriebene minimale Infektionsdosis von $> 10^4$ *B. cereus*/g Lebensmittel begründet sich auf epidemiologische Untersuchungen von Krankheitsausbrüchen beim Menschen. Eine höhere Dosis führt wahrscheinlich häufiger zu Erkrankungen. Trotzdem ist die Wahrscheinlichkeit, mit der Infektionen/Intoxikationen aufgrund von *B. cereus*-Toxinen aus Milchpulver auftreten, nicht bekannt. Auch die Kontaminationsrate des Milchpulvers, die zwischen 11 % (eigene Untersuchungen) und 60 % (TE GIFFEL et al. 1996) der Proben liegt, hilft dabei nicht weiter. Immerhin ist das Risiko, daß durch *B. cereus* nachteilige Effekte für die Gesundheit auftreten könnten so nicht akzeptabel. Mögliche Risikogruppen wie Säuglinge, ältere oder immunsuppressive Menschen müssen ebenfalls in Betracht gezogen werden.

Risikomanagement

Hierbei soll es zu einem Abwägen verschiedener Vorgehensweisen unter Berücksichtigung der Ergebnisse vom "Risk assessment" kommen und, wenn notwendig, sollen geeignete Überwachungsmöglichkeiten ausgewählt und durchgeführt werden, regulatorische Maßnahmen eingeschlossen (CODEX ALIMENTARIUS 1998).

Die durch *B. cereus* bedingten Gesundheitsrisiken fallen unter gesetzliche Regelungen, z. B. des Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetzes (LMBG) und der Milchverordnung. Danach ist es verboten, Lebensmittel für andere so herzustellen, daß sie geeignet sind, die Gesundheit zu schädigen (§ 8 LMBG), bzw. dürfen pathogene Keime (*B. cereus*) und deren Toxine beim Verlassen des Herstellungsbetriebes im Lebensmittel nicht in

Mengen vorhanden sein, die die Gesundheit des Verbrauchers schädigen könnten (Milch-Verordnung, Anlage 4, 1.3; Anlage 6, 3.1.1, 3.3.1.1). Da der ermittelte Eintrag von *B. cereus* über die Rohmilch bei optimaler Herstellungspraxis zu Sporenzahlen von 1-10/g führt, sollte dieser Wert vom Hersteller angestrebt werden. Diese Keimzahl würde auch eine etwaige Vermehrung während Distribution und Lagerhaltung berücksichtigen, da die Gesundheitsgefährdung erst durch die im verzehrsfähigen Produkt vorliegende Keimzahl bedingt wird. Dies ist in der Milchverordnung nicht berücksichtigt, kommt jedoch im LMBG und im Produkthaftungsgesetz zum Tragen. Auf diesen Vorgaben sollte daher ein Hygienesicherungskonzept des Herstellers zur Überwachung von *B. cereus* aufbauen.

Risikovermittlung

In diesem Abschnitt soll der interaktive Austausch von Informationen und Meinungen zum Risiko und zum Risikomanagement zwischen Risikobewerter, Risikomanager, Verbraucher und anderen interessierten Personen dargelegt werden (CODEX ALIMENTARIUS, 1998).

Das Risikobewußtsein ist bei Handelspartnern meistens bereits gut ausgeprägt. Ein Hersteller von Babynahrung wird in seiner Spezifikation an den Milchpulverproduzenten immer Grenzwerte für *B. cereus* angeben. Da es sehr schwierig sein wird, das Vorkommen von *B. cereus* völlig zu vermeiden, sind auf den Fertigprodukten Hinweise für den Verbraucher erforderlich, wie Qualität und Haltbarkeit des Produktes zu erhalten ist. Angaben wie: "Nur benötigte Menge ansetzen" oder "Restmengen maximal 24 Stunden im Kühlschrank aufbewahren" sind, ohne *B. cereus* und andere Krankheitserreger explizit zu nennen, Ausdruck der Risikovermittlung. Schwächstes Glied in dieser Kette ist meistens der Endverbraucher, der aus Unkenntnis oder Gleichgültigkeit entsprechende Hinweise nicht beachtet oder nicht ernst nimmt. Eine moderne Verbraucheraufklärung sollte also auch die Gefahrenpotentiale einer *B. cereus*-Kontamination von bestimmten Milcherzeugnissen wie Desserts und Babynahrung berücksichtigen. Auch sollte vermittelt werden, daß eine totale Abwesenheit aerober Sporenbildner in den Produkten nicht erreichbar ist.

4.4 Hygienesicherung

B. cereus stellt nicht nur ein Gesundheitsrisiko dar, sondern ist zusätzlich noch ein Lebensmittelverderber, so daß für die betroffenen Betriebe ein Konzept zur Qualitätssicherung unabdingbar ist. Darüber hinaus sind zum einen gesetzliche Vorschriften einzuhalten, zum anderen müssen Handelsbeschränkungen durch Nichterfüllung etwaiger Spezifikationen vermieden werden.

Für die Anwendung eines Hygienesicherungskonzeptes ist die gesamte Produktionskette von der Uerzeugung bis zum Endprodukt zu betrachten. Es sind mit Hilfe des HACCP-Konzeptes Punkte zu finden, an denen ein Eintrag des Keimes in die Produktion wirksam unterbunden oder minimiert werden kann. Prinzipien und Anwendung des HACCP-Konzeptes werden als bekannt vorausgesetzt. Im übrigen wird auf die weiterführende Literatur verwiesen (z.B. SINELL 1996).

Von besonderem Interesse für ein innerbetriebliches Überwachungskonzept ist es hierbei, festzustellen, ob *B. cereus* durch ständigen Eintrag die Erhitzung überlebender Sporen in das Produkt gelangt, oder ob nur ein Stamm als Bestandteil der Hausflora für Rekontaminationen sorgt. Dieses Hauskeimphänomen ist z.B. für Salmonellen seit langem bekannt und beschrieben. Moderne molekularbiologische Methoden, wie z.B. die RAPD-PCR, erlauben bei einer Vielzahl von Bakterienspezies eine Identitätsbestimmung auf Stammebene (BROUSSEAU et al. 1993, JAYARAO und OLIVER 1994). Die erhaltenen Fingerprintmuster sind bei entsprechender Primer-Auswahl stammspezifisch und erlauben die epidemiologische Aufklärung nicht nur innerhalb eines Betriebes sondern z.B. auch bei Krankheitsausbrüchen (CZAJKA und BATT 1994). Ebenfalls Bestandteil der "Hazard Analysis" ist die Festlegung auf einen akzeptablen Grenzwert. Die Kontamination des Endproduktes mit *B. cereus* sollte so gering wie möglich gehalten werden, zumindest $\leq 10^4$ KBE/g bzw. ml. Auch wenn andere Autoren wie ROWAN und ANDERSON (1998) die Grenze bei $\leq 10^5$ KBE/g bzw. ml und BECKER und TERPLAN (1987) bei $\geq 10^6$ KBE/g ziehen, sollte doch $\leq 10^4$ KBE/g bzw. ml angestrebt werden, da Fälle beschrieben sind, in denen eine entsprechende Keimzahl an *B. cereus* zu einer Erkrankung geführt hat (KRAMER und GILBERT 1989).

Die hier durchgeführten Untersuchungen, vor allem die RAPD-PCR, dienten der Charakterisierung der isolierten *B. cereus*-Stämme. Die Clusteranalyse im Anschluß an die RAPD-PCR zeigte keine signifikanten Ähnlichkeiten zwischen den beiden Stammgruppen aus Milchpulver und Umfeld. Das Ergebnis läßt den Schluß zu, daß das Milchpulver über die Anlieferungsmilch mit die Erhitzung überlebenden Sporen kontaminiert wird und nicht während des Produktionsprozesses im Milchtrocknungsbetrieb. Bei Annahme einer Kontamination von 10 Sporen/10 ml (d. h. 1 Spore/ml) und dem bei der Milchtrocknung erreichten Konzentrierungsfaktor von 10, entsprechen die in vorliegender Arbeit ermittelten Sporenzahlen (1-10/g) dem erwarteten Eintrag durch die Rohmilch. Es ist also davon auszugehen, daß während der Produktion keine Reduktion, aber auch keine Vermehrung erfolgt. Damit kann für einen betriebsinternen Kontrollplan eine Grenzwertempfehlung mit o.a. Sporenzahl gegeben werden. Bei Einhaltung der guten Herstellungspraxis dürfte dieser Wert nicht überschritten werden. Eine Erhöhung der Sporenzahlen im Endprodukt ist folglich ein Hinweis auf Mängel in der Hygiene bei der Aufbereitung der Milch für die Trocknung und auf eine unzureichende Technologie zur Verminderung der Sporenzahlen.

Die Anlieferungsmilch als Ausgangsprodukt gibt somit den Eintrag von *B. cereus* in die Produktion vor. Es wird beschrieben, daß die Rohmilch zwischen 5 und 35 % mit *B. cereus* kontaminiert ist (AHMED, MUSTAFA und MARTH 1983, SLAGHUIS et al. 1997, TE GIFFEL et al. 1996). SLAGHUIS et al. (1997) fanden in ihren Untersuchungen < 2-10 Sporen/10 ml.

Auf die Anlieferungsmilch kann der Milchtrochnungsbetrieb keinen direkten Einfluß nehmen, doch sind für die mikrobiologische Qualität der Milch die Melkhygiene im landwirtschaftlichen Betrieb und die Einhaltung der Kühlkette vom Melken bis zur Pasteurisierung in der Meierei entscheidend.

Kontrollmöglichkeiten lassen sich für den Hersteller somit vor allem im Prozeß der Milch-trocknung finden, der wie folgt abläuft:

Prozessstufe	Produktionsbedingungen
Anliefern, Vorstapeln	6° C, max. 36 h Lagerzeit
Pasteurisierung	72-75° C, 15-30 sek
Eindampfen	85° C, 20 min., bis ca. 45 % Trockenmasse
Konzentratlagerung (nur manchmal)	8° C
Konzentraterhitzung	low-heat: 72-73° C, 15 sek medium-heat: 90-100° C, ca. 1 sek high-heat: > 100° C, ca. 1 sek
Zerstäubungstrocknung	Lufttemperatur: 180-230° C Konzentrattemperatur: < 100° C
Kühlung, Konzentrierung	< 30° C, Restfeuchte < 3-3,5 %
Lagerung	Raumtemperatur, Restfeuchte unverändert
Verpackung, Versand	Raumtemperatur, Restfeuchte unverändert

Da *B. cereus*-Sporen in der Lage sind, die Pasteurisierung der Milch, das Eindampfen und die Konzentraterhitzung für Low-heat, Medium-heat und High-heat Pulver, sowie den Sprühtrocknungsprozeß zu überleben, wird eine Kontamination des Endproduktes unter bestehenden Prozessbedingungen nicht zu verhindern sein. In Anbetracht der beschriebenen D-Werte für hitzeresistente Sporen ($D_{100^{\circ}C}$ 2,7-3,1 min. (NOTERMANS und BATT 1998)), ist jedoch mit einer Reduktion der Sporenbelastung durch die Erhitzungsschritte zu rechnen.

Einfluß auf die Kontaminationsrate kann zusätzlich noch während der Milchsammlung und Vorstapelung genommen werden. Durch eine möglichst niedrige Lagertemperatur ($\leq 5^{\circ}C$) kann die Vermehrung minimiert werden. Im fertigen Milchpulver ist aufgrund des niedrigen a_w -Wertes von < 0,6 keine Vermehrung der Mikroflora mehr möglich, im Laufe der Lage-

rung sterben vegetative Mikroorganismen sogar noch ab (SPILLMANN und FEDDER 1997). Die minimale Vermehrungstemperatur liegt für *B. cereus* je nach Stamm bei 5 bis 15° C und der minimale a_w -Wert bei 0,912 bis 0,950 (NOTERMANS und BATT 1998) (s. Tab. 11).

Im vorliegenden Produktionsprozeß sind somit Lagerung und Erhitzung der Milch die einzigen kritischen Kontrollpunkte (CCP) zur Verminderung einer Kontamination von Milchpulver mit *B. cereus*. Schritte, die eine Kontamination verhindern oder eliminieren, lassen sich nicht identifizieren. Die Kontrollpunkte sind bei heutiger Technologie problemlos zu überwachen, Regulierungen bei Über- bzw. Unterschreiten der definierten Sollwerte erfolgen online.

Auf Meiereiebene kann der Keim- bzw. Sporengehalt auf der Rohmilchseite zwar durch Baktofugation vermindert werden (90 % Reduktion), üblicherweise werden diese sehr teuren Geräte aber nur in Käsereien eingesetzt. Betriebe, die Milchpulver herstellen, können durch eine intensivere Reinigung und Desinfektion im Vorfeld nur eine Keimanheftung und -vermehrung verhindern.

Die nach heutigem Kenntnisstand einzige Möglichkeit, die Kontamination von Milchpulver mit diesem Keim wirksam zu unterbinden, wäre eine Veränderung bei den Erhitzungsbedingungen. Dabei ist zu berücksichtigen, daß die Sporen erst bei einer UHT-Erhitzung (Temp. $\geq 135^\circ\text{C}$, F_0 -Wert ≥ 3 min.) vollständig abgetötet werden. Ihr $D_{100^\circ\text{C}}$ Wert liegt bei 2,7 bis 3,1 min. (NOTERMANS und BATT 1998). Der Betrieb einer UHT-Anlage zur Herstellung von Milchpulver ist aber aus ökonomischen Gründen nicht durchsetzbar.

Eine andere Möglichkeit, die Belastung von Milchpulver mit *B. cereus* zu reduzieren, ist, die Sporen nach der ersten Pasteurisierung oder nach der Konzentrierung zur Germination zu veranlassen. Dazu wird die Milch bzw. das Konzentrat für bis zu vier Stunden bei 30° C zwischengelagert. Während dieser Zeit kommt es zum Auskeimen der Sporen. Bei der anschließenden Weiterverarbeitung werden die vegetativen Zellen abgetötet. Da zu diesem Zeitpunkt nur wenige Sporen vorliegen, führt dieses Vorgehen zu einer erheblichen Reduktion der Sporenzahl. Dieses Verfahren ist naturgemäß ökonomisch ungünstiger zu beurteilen und zudem abhängig von den Kapazitäten zur Zwischenlagerung.

In dem hier untersuchten Betrieb sind durchschnittlich 11 % aller Pulverchargen mit *B. cereus* kontaminiert (Untersuchungszeitraum vier Jahre). Die Kontaminationsdichte im Pulver liegt bei 1-10 Sporen/g. Vergleicht man diese Zahlen mit den oben genannten Vorgaben von $< 10^4$ cfu/g für eine potentielle Gesundheitsgefährdung, so werden diese Anforderungen deutlich unterschritten. Die aufgezeigten Möglichkeiten zur Verbesserung der Produktionsbedingungen im Sinne einer weiteren Reduktion des Gehaltes an *B. cereus* können z.B. bei Änderungen eines Qualitätssicherungssystems einbezogen werden. In jedem Fall sollten diese Möglichkeiten bei einem Anstieg der Belastung in Erwägung ge-

zogen werden. Die Untersuchung auf *B. cereus* kann in Verbindung mit der Untersuchung auf Salmonellen durchgeführt werden, wobei allerdings der zu untersuchende Umfang der analytischen Proben geringer sein könnte als der für Salmonellen. In der Praxis beinhalten die Spezifikationen des Handels jedoch nahezu immer auch *B. cereus*, so daß ein eigener Stichprobenplan für diesen Keim nicht notwendig ist. Die Stichprobe für Salmonellen wird mit einem automatischen Probenehmer gezogen, wobei pro Charge von 25 to mehr als 250 Proben von 3-4 g anfallen, die in einer Poolprobe von ca. 1 kg vorliegen. Von dieser Poolprobe gelangen 750 g zur Untersuchung. Bei quantitativem Nachweis von *B. cereus* kann der empfohlene Grenzwert von 10 Sporen/g im Sinne eines Zweiklassenplanes als M definiert werden. Chargen mit einer *B. cereus*-Dichte von ≥ 10 KBE/g dürfen nicht zur Herstellung von Lebensmitteln verwendet werden.

Die bisher durchgeführte Beprobung des Endproduktes im Rahmen des Monitoringprogrammes kann somit beibehalten werden.