

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1 Material

3.1.1 Betriebe

Direktvermarktungsbetriebe aus folgenden Bundesländern wurden von der Untersuchung erfaßt:

Baden-Württemberg, Bayern, Bremen, Hessen, Mecklenburg-Vorpommern, Niedersachsen, Nordrhein-Westfalen, Rheinland-Pfalz, Schleswig-Holstein.

Insgesamt wurden 709 Proben untersucht und ausgewertet.

3.1.2 Proben

Die Proben wurden auf dem Markt oder in den Betrieben genommen oder zugesandt. Die Probennahme und Verschickung erfolgte überwiegend durch Veterinäruntersuchungsämter. Ein Teil der zugesandten Proben wurde im Rahmen des Kundenservices von den Betrieben selber verschickt. Die Proben wurden nach der Probennahme gekühlt transportiert. Selbst genommene Proben wurden innerhalb von 24 h verarbeitet. Zugesandte Proben wurden innerhalb von 48-72 h nach Probennahme verarbeitet.

Durch den Einkauf auf dem Markt ließ sich nicht in jedem Fall der Betrieb zweifelsfrei feststellen. In diesem Fall läßt sich nur die Minimalzahl der Betriebe angeben. Häufig ist eine Hofkäserei auf eine Käseart (z.B.: Gouda) spezialisiert, die durch Beigabe verschiedener Gewürze oder z.B. durch Räuchern variiert wird, um die Angebotspalette zu vervielfältigen. Bei der Zuteilung von Käsen zu Produktgruppen (Weich-, Schnitt-, Hartkäse) wurden die Angaben des Herstellers übernommen.

Vorzugsmilch-Tankmilch: 74

Einzelhandel (Reformhäuser, Markt): 13

direkt von Erzeugerbetrieben: 61

Die Proben stammten aus 35 Betrieben.

Vorzugsmilch-Einzelgamelke: 91

direkt von Erzeugerbetrieben: 91

Die Proben stammten aus sechs Betrieben.

Milch-ab-Hof: 149

direkt von Erzeugerbetrieben: 149

Die Proben stammten aus 115 Betrieben.

<u>Frischkäse:</u>	35
Markt:	6
direkt von Erzeugerbetrieben:	29
Die Proben stammten aus 17 Betrieben.	

<u>Weichkäse:</u>	89
Markt:	18
direkt von Erzeugerbetrieben:	71
Die Proben stammten aus mehr als 26 Betrieben.	

<u>Schnitt- und Hartkäse:</u>	245
Markt:	65
direkt von Erzeugerbetrieben:	180
Die Proben stammten aus mehr als 39 Betrieben.	

<u>Sonstige Produkte:</u>	26
Markt:	1
direkt von Erzeugerbetrieben:	25
Die Proben stammten aus 16 Betrieben.	

3.1.3 Nährmedien und Reagenzien

Die genaue Beschreibung der eingesetzten Puffer und Lösungen erfolgt im Anhang. Alle verwendeten Reagenzien sind, soweit nicht anders vermerkt, zur Analyse geeignet.

3.1.3.1 Somatische Zellen

- Kalium-dichromat (Merck 4862)
- Ethidiumbromid (Foss Electric)
- Triton X-100 (Merck)
- Pufferlösungen

3.1.3.2 Gesamtkeimzahl

- Plate count agar (Difco 0479-17)

3.1.3.3 *Staphylococcus aureus*

Bakteriologie

- BAIRD-PARKER-Agar-Basis mit Eigelb-Tellurit-Supplement (Oxoid)
= BAIRD-PARKER-Agar (ETGPA)
- Toluidinblau O-DNA-Reaktionsmedium hergestellt nach der Methode L 01.00-33 der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG (im folgenden § 35 LMBG)
- Coagulase-Plasma EDTA (Difco 0803-46)
- Blutagar
- Hirn-Herz-Glucose Bouillon = Brain-Heart-Infusion (BHI) (Oxoid CM 225)
- Caseinpepton-Sojamehlpepton Bouillon = Trypticase soy broth (TSB) (Difco 0370-17-3)
- NaCl-Pepton-Lösung (1 g Casein-Pepton (Merck 7213 oder Oxoid L 42), 8,5 g NaCl ad 1 l A. dest. pH 7,0-7,2)
- viertelstarke Ringerlösung (Merck 15525)
- Glycerin (Merck), 50% in A. dest., autoklaviert
- API-Staph-Test (bio-Mérieux 20500)

Enzymimmunoassay

- RIDASCREEN SET A, B, C, D, E (R-Biopharm, R 4101)
- Waschpuffer: PBS/Tween

3.1.3.4 *Listeria monocytogenes*

Bakteriologie

- FDA-Medium:
TSB + Hefeextrakt, granuliert (Merck 1.03753), Actidione (Fluka 01810), Acriflaviniumchlorid (Sigma A-8252), Nalidixic acid sodium salt (Fluka 70126)
- PALCAM-Agar:
PALCAM-Listeria-Selektivagar (Basis), (Merck 1.11755.0500) + PALCAM-Listeria-Selektiv-Supplement (Merck 1.12122)
- Blutagar
- D(+)-Xylose (Merck 1.08689)-Bouillon
- L(+)-Rhamnose (Merck 1.04736)-Bouillon
- SIM-Agar (Merck 5470)

3.1.3.5 *Bacillus cereus*

Bakteriologie

- Polymyxin-Eigelb-Mannit-Bromthymolblau-Agar (PEMBA) (Oxoid CM 617, SR 99)
- TSB normal und doppelt konzentriert + Polymyxin B: Polymyxin B-Lösung 50 mg/60 ml A. dest., steril filtriert (Oxoid SR 99) vor Gebrauch dem Medium zugeben (0,1 ml/10 ml einfach konz. TSB, 0,2 ml/10 ml doppelt konz. TSB)
- Blutagar
- viertelstarke Ringerlösung (Merck 15525)
- Glycerin (Merck), 50% in A. dest., autoklaviert

Zellkultur

- Zellen:
VERO-B₄, Niere, afrikanische Grüne Meerkatze (DSM ACC 33)
- Nährmedien:
Kulturmedium: RPMI 1640 (Biochrom) + 10 % foetales Kälberserum BHI-Bouillon mit 0,1 % Glucose (pH 7,4) (BHIG)

Reagenzien

- Sigma LH 340 (Testkit zum Nachweis der Laktatdehydrogenase)

3.1.3.6 *Escherichia coli*

Bakteriologie

- Fluorocult Lauryl-Sulfat-Trypton-Bouillon/MUG (LST/MUG), (Merck 12588)
- Fluorocult Plate-Count-Agar (Merck 4033)
- Fluorocult 0157:H7-Agar (Merck 4036)
- Blutagar
- viertelstarke Ringerlösung (Merck 15525)
- NaCl-Pepton-Lösung
- KOVÁCS-Reagens (Merck 1.09293.0100)
- Glycerin (Merck), 50% in A. dest., autoklaviert
- Kryoröhrchen, 1,8 ml (Nunc)

Verotoxin-Enzym-Immunoassay (VT-EIA)

- modifizierte TSB (m-TSB)

- Novobiocin (Sigma N-1628)
- Mitomycin C (Sigma M-0503)
- VT-EIA (Premier EHEC, HiSS 608096V)

Isolierung der Verotoxinbildner

a.: DNA-DNA-Hybridisierung (KNAPPSTEIN, 1996)

Zubehör:

- Nitrozellulosefilter BA 85, Porengröße 0,45 µm, Ø 82 mm (Schleicher & Schuell)
- Nylonmembran, Porengröße 0,45 µm (Sartorius)
- Whatman 3MM Chr-Papier (Whatman)
- Polypropylen-Wannen, 18 x 24 cm, autoklavierbar

Stammlösungen:

- 20 x SSC (standard saline-citrate): 3,0 M NaCl (Merck), 0,3 M Na-Citrat (Merck), pH 7,0, autoklaviert
- 20 x SET: 3,0 M NaCl, 0,02 M EDTA, 0,4 M Tris-HCL (Merck), pH 7,8
- Proteinase K-Lösung: Proteinase K (Boehringer), 1 %, Lagerung bei -20 °C
- Natrium-dodecylsulfat (SDS)-Lösung: Na-dodecylsulfat (Serva), 10 %
- N-Lauroylsarkosin-Lösung: N-Lauroylsarkosin, Na-Salz (Sigma), 10 %
- Maleinsäurepuffer: 0,1 M Maleinsäure (Merck), 0,15 M NaCl, pH 7,5, autoklaviert
- Blockierungsreagens-Lösung: Blockierungsreagens (Boehringer, 1096766), 10 % in Maleinsäurepuffer, lösen bei 50-70 °C, autoklavieren, Lagerung bei 4 °C

Koloniehybridisierungsverfahren:

- Lösung 1: 10 % SDS
- Lösung 2: 0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl, autoklaviert
- Lösung 3: 1,0 M Tris-HCl, 1,5 M NaCl, pH 7,5
- Lösung 4: 4 x SET
- Proteinase-K-Gebrauchslösung: 2 x SSC, 0,1 % SDS, 0,01 % Proteinase K
- Waschlösung 1: 2 x SSC, 0,1 % SDS
- Waschlösung 2: 2 x SSC

Hybridisierung:

- Hybridisierungslösung: 5 x SSC, 1 % Blockierungsreagens, 0,1 % N-Lauroylsarkosin, 0,02 % SDS
- Waschpuffer 1: 2 x SSC, 0,1 % SDS
- Waschpuffer 2: 0,1 x SSC, 0,1 % SDS (für Polynukleotid-Sonden)

Digoxigenin-markierte DNA-Sonden:

- Polynukleotid-Sonden (institutseigene Herstellung)

Enzymimmunologische Detektion der gebundenen Sonden:

- Anti-Digoxigenin-Antikörper, Fab-Fragmente, konjugiert mit alkalischer Phosphatase (Anti-Dig-AP-Konjugat) (Boehringer, 1093274)
- N,N-Dimethylformamid (DMF) (Sigma)
- Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT) (Boehringer): 70 mg/ml in 70 % DMF, Lagerung bei -20 °C
- 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat, 4-Toluidinsalz (X-Phosphat) (Boehringer): 50 mg/ml in 100 % DMF, Lagerung bei -20 °C
- Maleinsäurepuffer: s. Stammlösungen
- Blockierungspuffer: 1 % Blockierungsreagens in Maleinsäurepuffer
- Substratpuffer: 0,1 M Tris-HCl, 0,1 M NaCl, 0,05 M MgCl₂, pH 9,5
- Substratlösung: pro 10 ml Substratpuffer 45 µl NBT, 35 µl X-Phosphat, frisch zubereitet
- TE-Puffer: 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0

b.: Immunoblot, Dessauer Verfahren (ANONYM, 1996)

Probenvorbereitung:

- Verdünnungsflüssigkeit für Probenvorbereitung
- Syncase-Agar mit Mitomycin C-Zusatz

Immunoblotreagenzien:

- phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)
- PBS/Tween
- Blocklösung
- Puffer zum Nachweis alkalischer Phosphatase
- Farbreagens
- Stopplösung

- monoklonale Antikörper:

Zellkulturüberstände der Hybridomazelllinien:

VT1: 13C4 (ATCC CRL-1794) (zum Gebrauch verdünnen 1:20 in Blocklösung)

VT2: 11E10 (ATCC CRL-1907) (zum Gebrauch verdünnen 1:160 in Blocklösung)

- Konjugat: Goat-Anti-Mouse-IgG1-AP (Fa. Biozol, 1070-04), (zum Gebrauch verdünnen 1:4000 in Blocklösung)
- Nitrocellulosemembran, Optitran BA-S 85/20, 0,45 µm, 82 mm (Schleicher & Schuell 439900) (NC-Membran)
- Celluloseacetatmembran, OE 67/20, 0,45 µm, 82 mm (Schleicher & Schuell 19404088) (CA-Membran)
- Petrischalen, 90 mm (Sarstedt 821473)

LT/ST-Nachweis

a. ST-ELISA:

- *Escherichia coli* heat-stable Enterotoxin STa (SIGMA E 5763)
- Mikrotiterplatte (MT-NUNC, Maxisorp)
- EEB (Enterobacteriaceae Enrichment Broth) (Oxoid CM 317)
- Faltenfilter 595 __, 150 mm (Schleicher & Schuell, Ref. No. 311645)
- CAYE-2-Bouillon (CAYE-Casamino Acid-Yeast-Extract-Salts-Medium (nach FRANKE 1982))
- Verdünnungspuffer für Absättigung-, Antitoxin- und Konjugatverdünnung: PBS 0,01 M in 0,14 M NaCl, pH 7,4 + 0,001 M MgCl₂
- Substrat (4-Nitrophenylphosphat Dinatriumsalz (NPP) (Merck)), lösen in Substratpuffer (NPP-Puffer) (0,05 M Bicarbonatpuffer, pH 9,8)
- Waschlösung: Tween-NaCl (0,5% Tween 20 in 0,5 M NaCl)
- Tween-Stocklösung (6,15 g Tween 20/100 ml): 1 ml Tween-Stocklösung/l entspricht 0,05 mM Tween 20/l

b. LT-ELISA:

- Cholera toxin B Subunit (SIGMA)
- Mikrotiterplatte (MT-NUNC, Maxisorp)
- PBS: 0,1 M in 0,14 M NaCl, pH 7,0
- EEB

- Faltenfilter 595 __, 150 mm (Schleicher & Schuell, Ref. No. 311645)
- CAYE-2-Bouillon
- GM₁-Gangliosid (SIGMA)
- Cholera-Toxin-Rabbit-Antikörper (1:2000 in PBS) (SIGMA)
- humanes Serumalbumin (HSA) (SIGMA)
- Anti-Kaninchen-Ig (Schwein), konjugiert mit AP (1:1000 in PBS) (DAKO)
- NPP
- NPP-Puffer (0,05 M Bicarbonat-Puffer, pH 9,8)
- Waschlösung: Tween-NaCl (0,5% Tween 20 in 0,5 M NaCl)

3.1.3.7 *Salmonella spp.*

Bakteriologie

- Rappaport-Vassiliadis-Sojapepton (RVS)-Medium (Oxoid CM 866)
- Xylose-Lysin-Desoxycholat (XLD)-Medium (Difco 0788-17)
- doppelt gepuffertes Peptonwasser (PW); (20 g/l Casein-Pepton (Oxoid CM 509) + 3,5 g Na₂HPO₄, 1,5 g KH₂PO₄, autoklaviert)
- Blutagar
- omnivalentes und polyvalentes (I, II, III) *Salmonella*-Antiserum (Behring-Werke)
- API-20E-Test (bio-Mérieux 20100)

3.1.3.8 *Campylobacter jejuni*

Bakteriologie

- BBL CampyPak Plus (BECTON DICKINSON 437104510)

Anreicherung:

- Nährbouillon Nr. 2 (CM 67)
- *Campylobacter*-Anreicherungs-Supplement (SR 84)
- *Campylobacter*-Selektiv-Supplement (Preston) (SR 117)
- Pferdeblut, lysiert (SR 48)

Selektion:

- *Campylobacter*-Agar-Basis (CM 689)
- *Campylobacter*-Selektiv-Supplement (Preston) (SR 117)

- Pferdeblut, lysiert (SR 48)

3.1.4 Geräte

Zellzählung:

- Fossomatic F 360 (Foss Electric A/S, Dänemark)

Bakteriologie:

- Stomacher 400 (Colworth)
- UV-Lampe, 366 nm (Heraeus)
- Mikroskop (Axiolab, Zeiss)
- Tiefkühltruhe, -79 °C (Gesellschaft für Labortechnik mbH)
- Filtropur S 0,2, steril (Sarstedt, USA)
- Anaerobiertöpfe

Immunchemie:

- ELISA (enzyme-linked-immuno-adsorbent-assay)-Reader: EAR 400 AT (SLT-Labinstruments, Austria)
- Mikrozentrifuge: 5415 C (Eppendorf)
- Schüttler: AM 69 Microshaker (Dynatech)
- Zentrifuge (W. Stock, Marburg)

DNA-DNA-Hybridisierung:

- Hybridisierungsöfen OV2 (Biometra)
- Hybridisierungsflaschen, 15 x 3,5 cm (Biometra)
- Transilluminator/UV-Crosslinker: Fluolink™, 312 nm (Froebel)

Zellkultur:

- Filtropur S 0,2, steril (Sarstedt, USA)
- Cellstar®, Makroplatte mit Abdeckplatte, TC, steril (Greiner labortechnik)
- Gewebekulturplatte, 24 Kavitäten, TC, steril (Greiner labortechnik)
- Gasbrutschrank 7,5 % CO₂, 37° C (zur Inkubation)
- Umkehrmikroskop (Carl Zeiss, Germany)
- Stock-Zentrifuge (Wilhelm Stock Maschinenbau KG, Marburg/L., Germany)
- MSE 150 Watt Ultrasonic Disintegrator Mk2

- Shimadzu Spectralphotometer (340 nm)

3.1.5 Referenzstämme

Die Referenzstämme wurden, soweit nicht anders angegeben, der hauseigenen Stammsammlung entnommen.

3.1.5.1 *Staphylococcus aureus*

- *S. aureus* WOOD 46
- *S. epidermidis*
- *S. aureus* CAMP

3.1.5.2 *Listeria spp.* (Listeria Referenz-Labor, Univ. Würzburg)

- *L. monocytogenes*
- *L. innocua*
- *L. ivanovii*
- *L. seeligeri*
- *L. grayi*

3.1.5.3 *Bacillus cereus*

- Toxin-bildender *Bacillus cereus*

3.1.5.4 *Escherichia coli*

- *E. coli* (ICB 4004)
- *Enterobacter cloacae*
- *E. coli* (C600J1): VT 1 (Prof. Dr. H. Karch, Institut für Hygiene und Mikrobiologie, Universität Würzburg)
- *E. coli* (C600W34): VT 2 (Prof. Dr. H. Karch, s.o.)
- *E. coli* (B 2391): VT-negativ (Dr. M. Bülte, Institut für Fleischhygiene, Freie Universität Berlin)
- *E. coli* (H10407): LT/ST (Dr. habil. Perlberg, BgVV Dessau)
- *E. coli* (O137K-): LT/ST-negativ (Dr. van Leeuwen, RIVM Bilthoven, Holland)
- *E. coli* (O45): LT/ST-negativ

3.1.5.5 *Campylobacter jejuni* (Hygiene-Institut Hamburg)

- Lior 011
- Lior 016
- Lior 029
- Lior 036

3.2 Methoden

3.2.1 Somatische Zellen

Die Zellzählung erfolgte nach Methode L 01.01-01 der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG (§ 35 LMBG).

- Milch konservieren mit Kalium-dichromat (0,2 % Endkonzentration), 2 h im Wasserbad bei 40 °C inkubieren: automatische Zählung

3.2.2 Gesamtkeimzahl

- modifiziert nach Methode L01.00-00 (§ 35 LMBG)
- Modifizierung: 1 ml Probe zu 99 ml Verdünnungsflüssigkeit, daraus Entnehmen von 0,1 ml und 1 ml

3.2.3 Staphylococcus aureus

3.2.3.1 Isolierung und Keimzahlbestimmung

Untersucht wurde 1 g bzw. 1 ml pro Probe.

Die Isolierung von *S. aureus* aus Milch und Milchprodukten erfolgte modifiziert nach den Methoden L01.00-24 bzw. L03.00-1 (§ 35 LMBG).

Probenaufbereitung:

- Entnahme von 10 g bzw. 1 ml Probe unter sterilen Bedingungen (Lagerung des restlichen Materials bei -20 °C)
- bei festen Proben Homogenisierung mit 90 ml Ringer-Lösung im Stomacher, 2 min
- Herstellung von dezimalen Verdünnungsreihen aus flüssigen Proben von u.v. bis 10^{-3} mit NaCl-Lösung
- Herstellung von dezimalen Verdünnungsreihen von in Ringer-Lösung homogenisierter Probe von 10^{-1} bis 10^{-4} mit NaCl-Lösung
- Beimpfung von ETGPA nach BAIRD-PARKER im Doppelansatz mit je 0,1 ml der Probe, damit Verdünnungsstufe auf Agar:
 10^{-1} - 10^{-4} (flüssige Produkte)

10^{-2} - 10^{-5} (homogenisierte Produkte)

- Inkubation 48 h/37 °C
- Auswertung der Kolonien auf ETGPA:
- Einteilung und Zählung der Kolonien aufgrund morphologischer Eigenschaften:
 - Typ A: schwarzglänzend, Präzipitationszone mit Aufhellung
 - Typ B: schwarzglänzend, Präzipitationszone ohne Aufhellung
 - Typ C: schwarzgrau, rauhe Oberfläche, trocken
 - Typ D: schwarz, glatt, ohne Aufhellung, ohne Präzipitation
 - Typ E: grau, glatt, ohne Aufhellung, ohne Präzipitation
- Überimpfen von bis zu drei Kolonien je Typ pro Probe in Brain Heart Infusion broth (BHI), Auszählen der verschiedenen Kolonietypen
- Durchführung Thermonuklease (TNase)-, Koagulase- und Clumpingfactor-Test
- Berechnung der Zahl Koagulase-positiver Staphylokokken (Typ A,B, C, D, E)

3.2.3.2 Identifizierung und Charakterisierung der Keime

Der TNase-Nachweis erfolgte nach der Methode L01.00-33 und der Koagulase-Nachweis nach der Methode L01.00-24 (§ 35 LMBG) wie im Anhang beschrieben.

Zur weiteren Charakterisierung TNase- und Koagulase-positiver *S. aureus*-Stämme wurden folgende Tests durchgeführt:

Clumping factor:

- Ausstrich isolierter Stämme auf Blutagar und Inkubation (24 h/37 °C)
- Verreiben des Koloniematerials in 30 µl Kaninchenplasma
- Auswertung: positive Reaktion = deutliche Klumpenbildung

Hämolyse:

- Beurteilung der Kolonien auf Blutagarplatte: vollständige Hämolyse (-Hämolyse), unvollständige Hämolyse (/ -Hämolyse) bzw. Kombination (/ -Hämolyse)

Noch fragliche Stämme wurden mit dem API-Staph-Test überprüft.

Konservierung geprüfter Stämme, die den Höchstwert (M) entspr. MVO'95 überschreiten:

- Anzüchtung eines Stammes in 10 ml TSB
- Lagerung bebrüteter TSB-Bouillon mit 10 % Glycerin bei -79 °C

3.2.3.3 Enterotoxin-Nachweis

Der Enterotoxin-Nachweis wurde mit dem RIDASCREEN SET entsprechend der Anleitung der Herstellerfirma durchgeführt.

3.2.4 Listeria monocytogenes

3.2.4.1 Isolierung

Untersucht wurden 25 g bzw. 25 ml pro Probe nach IDF Standard 143A:1995.

- Entnahme von 25 ml flüssigem Probenmaterial bzw. 25 g festem Probenmaterial unter sterilen Bedingungen (Lagerung des restlichen Materials bei -20 °C)
- Homogenisierung von festem Probenmaterial mit 225 ml FDA-Medium im Stomacher, 2 min
- Anreichern von Probenmaterial in 225 ml FDA-Medium
- Inkubation 48 h/30 °C
- Drei-Ösen-Ausstrich auf PALCAM-Agar
- Inkubation 48 h/37 °C

3.2.4.2 Identifizierung und Charakterisierung der Keime

- Dunkelbraune bis schwarze Kolonien mit napfförmiger Vertiefung = verdächtige *Listeria spp.*-Kolonien
- Subkultur von 5 Kolonien auf Blutagar
- Inkubation 24 h/37 °C
- Hämolyse unter der Kolonie auf Blutagar = präsumtive *L. monocytogenes*
- GRAM-Färbung
- SIM-Agar
- CAMP-Test
- Test: Xylose (neg.) und Rhamnose (pos.)

3.2.5 Bacillus cereus

3.2.5.1 Isolierung und Keimzahlbestimmung

Untersucht wurde 1 g bzw. 1 ml pro Probe.

Der Nachweis erfolgte nach der Methode L 01.00-53, § 35 LMBG.

- Entnahme von 10 g bzw. 1 ml Probe unter sterilen Bedingungen (Lagerung des restlichen Materials bei -20 °C)

- Homogenisierung von festem Probenmaterial mit 90 ml Ringer-Lösung im Stomacher, 2 min
- flüssiges Probenmaterial:
 - 1,0 ml in 10 ml TSB + Polymyxin B
- homogenisierte Proben:
 - 10 ml Homogenat in 10 ml doppelt konzentrierte TSB + Polymyxin
- Inkubation 48 h/30 °C
- Subkultur aus jedem Röhrchen auf PEMBA durch fraktioniertes Ausstreichen
- Inkubation 24 h/30 °C

3.2.5.2 Identifizierung und Charakterisierung der Keime

- typische Koloniemorphologie auf PEMBA: etwa 5 mm groß, auffällig türkis bis pfauenblau gefärbt, umgeben von einer ausgeprägten Eigelb-Präzipitation mit gleicher Färbung
- typische Koloniemorphologie auf Blutagar
- Sporen-/Lipidfärbung nach Holbrook und Anderson mit nachfolgender mikroskopischer Beurteilung
- Anzüchtung von *B. cereus*-Stämmen in BHI
- Lagerung bebrüteter BHI-Bouillon mit 10 % Glycerin bei -79 °C

3.2.5.3 Zytotoxizitätsnachweis

Nachweis in Zellkulturversuchen:

Die allgemeinen Methoden zum Arbeiten mit Zellkulturen sind in zahlreichen Lehrbüchern veröffentlicht. Im folgenden werden stichwortartig nur die für die hier vorgestellten Versuche wichtigen Bedingungen aufgeführt.

- Anzüchten der VERO-B₄ Zellen in Cellstar[®] Makroplattten (6er-Feld, Anzuchtphase: 1 Woche)
- Durchführung aller Versuche auf Gewebekulturplatten (24er-Feld) im Doppelansatz und auf jeweils zwei Platten
- Anzüchten von *B. cereus* in Brain Heart Infusion + 0,1 % Glucose (BHIG); 24 h/30 °C (modifiziert nach GLATZ und GOEPPERT 1976)
- Zentrifugation der Bouillon 15 min/ 2200 x g
- Sterilfiltration des Überstandes durch Spritzenvorsatzfilter (0,22 µm)
- Aufbringen von 250 µl des Filtrates je Feld der Zellkultur

- Auswertung nach 48 h:
 - a. mikroskopische Beurteilung mit Umkehrmikroskop (25-160fache Vergrößerung):
Beurteilungskriterien (HAMMER und WALTE 1996):
Grad der Abrundung der polygonalen Zellen
Grad der Vakuolisierung
 - b. photometrische Bestimmung der Freisetzung von Lactatdehydrogenase (LDH): LDH wird nur bei Schädigung der Zellmembran in den Zellkulturüberstand freigesetzt.
- LDH-Messung im Spektralphotometer, Wellenlänge: 340 nm
- Abgleichen der Absorptionsanzeige auf Null mit 1 ml A.dest.
- Pipettieren und Mischen von 1,0 ml LDH-L und 50 µl Probe
- Messung der Absorptionsänderung innerhalb von 60 sec
- Positivkontrolle: Toxin-bildender *B. cereus* Referenzstamm
- positiver Referenzwert (Freisetzung = 100 %): Mittelwert der Meßwerte zweier Kulturfelder mit abgeschwemmten und mit Ultraschall desintegrierten Zellen (HAMMER und WALTE 1996)
- Berechnung der LDH-Freisetzung der Proben (GRANUM 1985): LDH-Freisetzung > 20 % = positiv für *B. cereus*
- Grundlage Evaluierung: 12 x Kulturüberstand Negativkontrolle (BHI)
12 x Kulturüberstand Positivkontrolle

3.2.6 Escherichia coli

3.2.6.1 Isolierung, Keimzahlbestimmung und Identifizierung

Untersucht wurde der *E. coli*-Gehalt von 1 g bzw 1 ml Probe.

Die Untersuchung der Proben auf den Gehalt von *E. coli* erfolgte mit dem Most Probable Number (MPN)-Verfahren entsprechend der Methode L01.00-54, § 35 LMBG.

Probenaufbereitung:

- Entnahme von 10 g bzw. 3 x 1 ml Probe unter sterilen Bedingungen (Lagerung des restlichen Materials bei -20 °C)
- bei festen Proben Homogenisierung mit 90 ml Ringer-Lösung im Stomacher, 2 min
- Herstellung von dezimalen Verdünnungsreihen aus flüssigen Proben bis 10^{-4} bzw. von Homogenat bis 10^{-5} mittels NaCl-Lösung
- Beimpfung von je 3 LST/MUG-Röhrchen aus jeder Verdünnungsstufe mit 1 ml (bei flüssigen Proben: 1. Verdünnungsstufe = u.v.)
- Inkubation 48 h/30 °C

Auswertung:

- Gasbildung: positiv = deutliche Gasblase im Durham-Röhrchen
- Fluoreszenz: positiv = hellblaue Fluoreszenz bei Bestrahlung der Röhrchen mit langwelligem UV-Licht
- Indolbildung: positiv = kirschrote Färbung der Alkoholschicht nach Zugabe von KOVÁCS-Reagenz
- zur Isolierung von Keimen aus einem Röhrchen sind vor Zugabe von KOVÁCS- Reagenz 2 ml Bouillon in ein separates Röhrchen zu überführen
- coliforme Keime positiv: Röhrchen mit Gasbildung
- *E. coli*-positiv: Röhrchen zusätzlich mit Fluoreszenz und Indolbildung
- Bildung einer Indexziffer aus der Anzahl positiver Röhrchen
- Ermittlung der MPN (most probable number) für jede Probe (Mc Grady-Tabelle)

3.2.6.2 Verotoxin-Nachweis

- Voranreicherung von 25 ml flüssiger Probe in 225 ml vorgewärmter m-TSB bzw. Homogenisation (Stomacher, 2 min) und Voranreicherung von 25 g fester Probe in 225 ml m-TSB unter Zusatz von je 225 µl sterilfiltriertem Novobiocin (20 mg/ml A.dest.)
- Inkubation 5 h/37 °C auf Schüttler (100 U/min)
- Anreicherung von 1 ml vorangereicherter Probe in 4 ml m-TSB unter Zusatz von Mitomycin C (50 ng/ml m-TSB)
- Inkubation 16-18 h/37 °C auf Schüttler (180 U/min)
- Durchführung VT-EIA: (entsprechend Produktanleitung Premier EHEC, HiSS) Modifikation: Entnahme und Zentrifugation von 1 ml je Probe (14.000 g, 4 min), Verwendung des klaren Überstandes
- im Falle einer Verotoxin-positiven Probe: Probenvorbereitung entsprechend 3.2.6.3

3.2.6.3 Isolierung und Identifizierung der Verotoxinbildner

Um die Verotoxinbildner zu isolieren, wurden zwei Methoden angewendet:

- a. DNA-DNA-Hybridisierung (KNAPPSTEIN, 1996)
- b. Immunoblot (ANONYM, 1996)

zu a.:

Probenvorbereitung:

Herstellung von dezimalen Verdünnungsreihen bis 10^{-6} aus der Anreicherungsbouillon dieser Probe in NaCl-Pepton-Lösung

- Beimpfung von Fluorocult[®] 0157:H7-Agar im Doppelansatz mit je 0,1 ml der Verdünnungsstufen (10^{-3} - 10^{-7} auf Agar)
- Inkubation 16-18 h/42 °C

DNA-DNA-Hybridisierung:

Hierzu sind grundsätzlich drei Schritte notwendig. Zuerst muß die zu untersuchende DNA auf eine Membran übertragen werden. Im zweiten Schritt erfolgt die eigentliche Hybridisierung und anschließend eine Reaktion zum Nachweis der gebundenen Gensonden.

1. SCHRITT: TRANSFER VON DNA AUF MEMBRANEN

Bei der Kolonie-Hybridisierung wird die gesamte DNA aus Bakterienkolonien auf einer Membran fixiert. Dazu sind folgende Arbeitsschritte erforderlich:

1. für Mischkulturen: Übertragung von Kolonien auf Nitrozellulosefilter im Abklatschverfahren
2. Lysis der Bakterien und Fixierung der DNA
3. Proteinase K-Behandlung zur Entfernung von Bakterienresten

zu 1: Abklatschverfahren (Mischkulturen) (modifiziert nach SAMBROOK et al., 1989).

- Anzüchtung von Mischkulturen auf *E. coli* 0157:H7-Agar
- Positivkontrolle: Aufbringen von Koloniematerial auf freie Fläche des bewachsenen Agars mit steriler Öse
- Vorbereitung der Nitrozellulosefilter wie oben
- vorsichtiges Auflegen der Filter auf die Platten
- Filter mit sterilem Glasspatel leicht andrücken
- asymmetrische Markierung von Filter und Agar
- Filter 5 min liegen lassen, dann vorsichtig abnehmen

zu 2. Lysis der Bakterien und Fixierung der DNA:

- Lösungen 1,2,3,4 (s. Kap. 3.1.3.6.) zur Bakterien-Lyse jeweils in eine Polypropylen-Wanne füllen, Whatman-Papier damit tränken, überschüssige Flüssigkeit abgießen

- Überführen der bewachsenen bzw. abgeklatschten Filter auf das getränkte Whatman-Papier, Kolonieoberseite nach oben, nacheinander Lösung jeder Wanne 10 min einwirken lassen
- UV-Crosslinking zur Fixierung der DNA, 300 mJ/cm^2

zu 3. Proteinase-K-Behandlung zur Entfernung von Bakterienresten:

- Inkubation der Filter im Schüttelwasserbad mit Proteinase K-Gebrauchslösung, 60 min bei $60\text{-}62 \text{ }^\circ\text{C}$, mind. 30 ml pro Filter
- Schwenken der Filter für 10 min in Waschlösung 1 bei Raumtemperatur (Schüttler)
- Abreiben von Kolonieresten mit Handschuhen
- Waschen der Filter in Waschlösung 2 für 10 min bei RT (Schüttler)

2. Schritt: HYBRIDISIERUNG MIT DIGOXIGENIN-MARKIERTEN SONDEN:

(nach Produktanleitung der Fa. Boehringer Mannheim)

Hybridisierung mit Polynukleotid-Sonden:

- Prähybridisierung: Inkubation der Filter mit vorgewärmter Hybridisierungslösung, mind. 10 ml pro 100 cm^2 Filter, 2 h bei $68 \text{ }^\circ\text{C}$ im Hybridisierungssofen
- 10 min vor Ende der Prähybridisierungszeit parallel dazu Denaturierung der Polynukleotid-Sonde durch Erhitzung mit frischer Hybridisierungslösung im kochenden Wasserbad (10 min): $5 \text{ } \mu\text{l}$ Dig-markiertes PCR-Amplifikat (DNA-Sonde) pro 10 ml Hybridisierungslösung
- Ersetzen der Prähybridisierungslösung durch Sonden-haltige Lösung, mind. 3-5 ml pro 100 cm^2 Lösung
- Hybridisierung über Nacht/ $68 \text{ }^\circ\text{C}$
- Abgiessen der Sonden-haltigen Lösung, Aufbewahrung bis zur Wiederverwendung bei $20 \text{ }^\circ\text{C}$
- Waschen der Filter: 2 x 5 min mit Waschpuffer 1 bei RT, 2 x 15 min mit vorgewärmtem Waschpuffer 2 bei $68 \text{ }^\circ\text{C}$

3. Schritt: ENZYMIMMUNOLOGISCHE DETEKTION DER GEBUNDENEN SONDEN

(nach Produktanleitung der Fa. Boehringer)

Der Nachweis von gebundenen Digoxigenin-markierten Sonden erfolgt durch einen Antikörper gegen Digoxigenin, der an alkalische Phosphatase gekoppelt ist. Diese setzt ein chromogenes Substrat (NBT und X-Phosphat) zu einem blauschwarzen Präzipitat um.

Alle Schritte der Detektion werden bei RT auf einem Schüttler mit 40 U/min durchgeführt. Die angegebenen Volumina beziehen sich auf eine Filterfläche von 100 cm², bei kleineren Filtern wird entsprechend reduziert.

- Waschen der Filter eine Minute in Maleinsäurepuffer
- Inkubation der Filter 30 min in Blockierungspuffer (100 ml)
- Verdünnung des Anti-Digoxigenin-AP-Konjugats (kurz anzentrifugieren) 1:5000 in Blockierungspuffer, Inkubation der Filter in 20 ml verdünnter Antikörper-Konjugat-Lösung für 30 min
- Entfernung ungebundenen Antikörper-Konjugates durch zweimaliges Waschen der Filter für 15 min mit je 100 ml Maleinsäurepuffer
- Äquilibrierung 2 min in Substratpuffer (20 ml)
- Inkubation der Filter mit 10 ml Substratlösung an dunklem Ort ohne Schütteln für 18-24 h.
- Abstoppen der Farbreaktion mit TE-Puffer
- positiv = deutliche dunkle Farbreaktion

Anhand der Farbmarkierung auf den Filtern wurden die entsprechenden Kolonien isoliert und durch EIA und Immunoblot überprüft.

zu b.: Immunoblot (ANONYM, 1996)

Hierzu erfolgt nach der Probenvorbereitung die Bakterienkultivierung und anschließend der Immunoblot.

Probenvorbereitung:

- Entnahme von 1 ml der Voranreichungskultur (s. 3.2.6.2)
- 3 min Zentrifugieren, 10000 g, Überstand entfernen, Fett am Gefäßinnenrand mit Watte-
testäbchen abnehmen
- Resuspendieren des Bakteriensedimentes in 1 ml PBS mittels Mikrohandrührer
- Zugabe von 950 µl Verdünnungsflüssigkeit

Bakterienkultivierung:

- Auflegen einer NC- und sodann darüber deckungsgleich einer CA-Membran luftblasen-
frei auf dem Syncase-Agar (Markierungen vornehmen)
- Auftragen von 0,1 ml der vorbereiteten Probenvoranreicherung mittels Verdünnungs-
ausstrich
- Auftragen der Referenzstämme im oberen Bereich der Membran als Dots

- Inkubation 16-18 h/37 °C/feuchte Kammer

Immunoblot:

Die CA-Membran mit den gewachsenen Kolonien wird abgehoben, die darunterliegende NC-Membran vom Agar abgenommen und die CA-Membran wieder auf den Agar gelegt (Lagerung der Agarplatte bei +4 °C). Alle nachfolgenden Schritte erfolgen bei Raumtemperatur unter Schütteln (50 U/min) in Petrischalen (1 Filter/Petrischale). Sofern nicht anders beschrieben, wurden immer je 10 ml Reagenzien pro Filter bei den einzelnen Reaktionsschritten eingesetzt.

- Waschen der NC-Membran mit PBS/Tween, 3 x 3 min
- Behandlung der NC-Membran mit Blocklösung, 1 h
- Inkubation mit monoklonalen Antikörpern, 1,5 h
- Waschen mit PBS/Tween, 4 x 3 min
- Inkubation mit Konjugat, 1 h
- Waschen mit PBS/Tween, 5 x 3 min
- Zugabe Substrat
- Abstoppen nach 5-10 min (entsprechend visueller Bewertung)
- Verwerfen des Substrates, Inkubation der Stopplösung, 2 x 15 min

Auswertung: rot-violette Färbung = positiv

Wenn positive Einzelkolonien isolierbar sind, Abnahme derselben und Bestätigung durch EIA, DNA-DNA-Hybridisierung und mit API-Teststreifen.

Die Feindifferenzierung und serologische Bestätigung der VTEC-Isolate wurde im Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BGVV) durchgeführt.

3.2.6.4 LT/ST-Nachweis

Zwei Frischkäse, je sieben Weich- und Schnittkäse sowie fünf sonstige Produkte, die mehr als 10^5 cfu/m *E. coli* enthielten, wurden auf das Vorhandensein von LT- und ST-Bildnern untersucht (siehe S. 92 vorletzter Absatz).

Die entsprechenden Rückstellproben und die betroffenen Stämme wurden schonend aufgetaut und mit folgenden Verfahren geprüft.

- a. Die ST-Bildung wurde mit einem kompetitiven ELISA (enzyme-linked-immuno-adsorbent-assay) untersucht (HAHN und BONNIKSEN, 1996).
- b. Die LT-Bildung wurde mit einem ELISA untersucht (FRANKE et al., 1984).

zu a.) ST-ELISA

Die Methodik entspricht einem Antibody-Capture-Test, bei dem das Toxin in der Probe, für den Standard in Verdünnungsstufen, mit einer eingestellten Antitoxin-Verdünnung (Antitoxin: institutseigene Herstellung) separat „neutralisiert“ wird.

Probenvorbereitung:

- Homogenisieren von 10 ml flüssigem Probenmaterial mit 90 ml vorgewärmter EEB (festes Probenmaterial: 10 g 2 min stomachen in 90 ml vorgewärmter EEB)
- Inkubation 4 h/37 °C
- Filtration des Homogenisats durch einen Faltenfilter
- Subkultur von 4 und 50 µl des Filtrats in 4 ml CAYE-2-Bouillon
- Inkubation 18 h/37 °C
- Entnahme und Zentrifugation von 1 ml je Probe (4 min, 14.000 g), Verwendung des klaren Überstandes
- Verdünnen des Überstandes 1:5 in CAYE-2-Bouillon zur Vermeidung von unspezifischen Reaktionen

Durchführung ELISA:

- Coat: 20 ng/ml STa in PBS 0,1M in 0,14M NaCl, pH 7,0, 1,5 h oder über Nacht/37 °C
- 4 x waschen mit Tween-NaCl
- Absättigung: 15 min/37 °C mit 0,5 % Ovalbumin (SIGMA) in PBS + 0,5 mM Tween 20
- 4 x waschen mit Tween-NaCl
- Neutralisation von 0,3 ml Probe bzw. der Standardverdünnung + 50 µl Antitoxinverdünnung (1:750 Endverdünnung) in PBS-Tween, 30 min/37 °C
- 100 µl Probe/Kavität in vorbereitetem MT-Tablett, Inkubation 1,5 h/37 °C
- 6 x waschen mit Tween-NaCl
- 100 µl Anti-Kaninchen-Ig-AP-Konjugat/Kavität in PBS-Tween (1:200), Inkubation 1 h/37 °C
- 6 x waschen mit Tween-NaCl
- 150 µl NPP/Kavität (1mg/ml NPP-Puffer), Inkubation 1 h/37 °C
- Messung mit ELISA-Reader bei 405 nm Wellenlänge
- Inkubation immer im Wasserbad

Standards: Die auf jeder Mikrotiter-Platte mitgeführten Standards zur quantitativen Berechnung der Proben bestehen aus in CAYE-2-Bouillon gelöstem STa in Konzentrationen von 25,0-12,5-6,25-3,13-1,56 und 0 ng/ml.

zu b.) LT-ELISA

Probenvorbereitung:

- Homogenisieren von 10 ml flüssigem Probenmaterial mit 90 ml vorgewärmter EEB (festes Probenmaterial: 10 g 2 min stomachen in 90 ml vorgewärmter EEB)
- Inkubation 4 h/37 °C
- Filtration des Homogenisats durch einen Faltenfilter
- Subkultur von 330 µl des Filtrats in 4 ml CAYE-2-Bouillon
- Inkubation 18 h/37 °C
- Entnahme und Zentrifugation von 1 ml je Probe (4 min, 14.000 g), Verwendung des klaren Überstandes

Durchführung ELISA:

- Coat: 100 µl GM₁-Gangliosid (1,5 µM)/Kavität, Inkubation über Nacht 37 °C
- Absättigung: 300 µl/Kavität, 30 min/37 °C mit 1 % HSA in PBS, pH 7,0 + 5 % Tween
- 100 µl Probe/Standard, Inkubation 1 h/37 °C
- 100 µl Cholera-Toxin-Rabbit-Antikörper, Inkubation 30 min/37 °C
- 100 µl Anti-Kaninchen-Ig (Schwein), konjugiert mit AP, Inkubation 30 min/37 °C
- 150 µl NPP/Kavität (1 mg/ml NPP-Puffer), Inkubation 1 h/37 °C
- Messung mit ELISA-Reader bei 405 nm Wellenlänge
- Inkubation immer im Wasserbad
- Waschen: 6 x vor NPP, sonst 4 x zwischen allen Arbeitsschritten mit Tween-NaCl

Standards: Die auf jeder Mikrotiter-Platte mitgeführten Standards zur quantitativen Berechnung der Proben bestehen aus in CAYE-2-Bouillon gelösten Cholera-Toxin in Konzentrationen von 16, 8, 4, 2, 1, 0,5, 0,25, 0,125 und 0 ng/ml.

3.2.7 Salmonella spp.

3.2.7.1 Isolierung

Untersucht wurden 25 g bzw. 25 ml pro Probe.

Der Nachweis erfolgte nach der Methode L00.00-20, § 35 LMBG.

- Homogenisierung von 25 g bzw. 25 ml steril entnommener Probe in 225 ml PW (feste Proben: Stomacher, 2 min)
- Inkubation 18-24 h/37 °C
- aus in PW bebrüteter Probe 0,1 ml in 10 ml RVS
- Inkubation 18-24 h/42 °C

- aus RVS 2 Ösen auf XLD ausstreichen (nicht fraktioniert);
- Inkubation 18-24 h/37 °C

3.2.7.2 Identifizierung und Charakterisierung der Keime

Die meisten Salmonellen zeigen auf XLD-Agar schwarze Kolonien (H₂S-Bildung).

Zur Bestätigung werden diese auf Blutagar überimpft, 18-24 h/37 °C bebrütet, mit API 20 E und in der Agglutination gegen omni- und polyvalentes Serum geprüft.

3.2.8 Campylobacter jejuni

3.2.8.1 Isolierung

Untersucht wurde 1 g bzw. 1 ml pro Probe. Eine Standardmethode für *C. jejuni* ist nicht festgelegt. Die Proben wurden mit PRESTON-Medien untersucht.

- unter sterilen Bedingungen Entnahme von 1,0 ml aus flüssigem Probenmaterial, Entnahme und Homogenisation von 10 g festem Probenmaterial in 90 ml Ringerlösung (Stomacher, 2 min)
- Anreicherung des flüssigen Probenmaterials in 9 ml einfach konzentrierter Anreicherungsbouillon nach PRESTON sowie von 10 ml Homogenat in 10 ml zweifach konzentrierter Anreicherungsbouillon nach PRESTON
- 24h / 42 °C aerob bebrüten
- Subkultur auf Selektivmedium, 1 x fraktioniert und 1 x 0,1 ml ausgespatelt
- 48 h/42 °C mikroaerob bebrüten

3.2.8.2 Identifizierung und Charakterisierung der Keime

- Mikroskopische Beurteilung von Morphologie und Beweglichkeit
- Cytochromoxidasetest
- Katalasetest
- Gramfärbung
- Hippuratnachweis (siehe Anhang)

3.3 **Ergebnisse**

3.3.1 Vorzugsmilch

Bundesweit wurden 74 Bestandmilchproben aus Vorzugsmilchbetrieben und 91 Vorzugsmilch-Einzelgemelke untersucht.

Die 74 Bestandmilchproben stammten aus 35 Betrieben und die 91 Vorzugsmilch-Einzelgemelke aus sechs Betrieben.

Einige Betriebe wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten wiederholt beprobt.

Die qualitativen und quantitativen Ergebnisse zu den einzelnen Parametern sind in den Tabellen 22-25 und den Abbildungen 1-10 dargestellt.

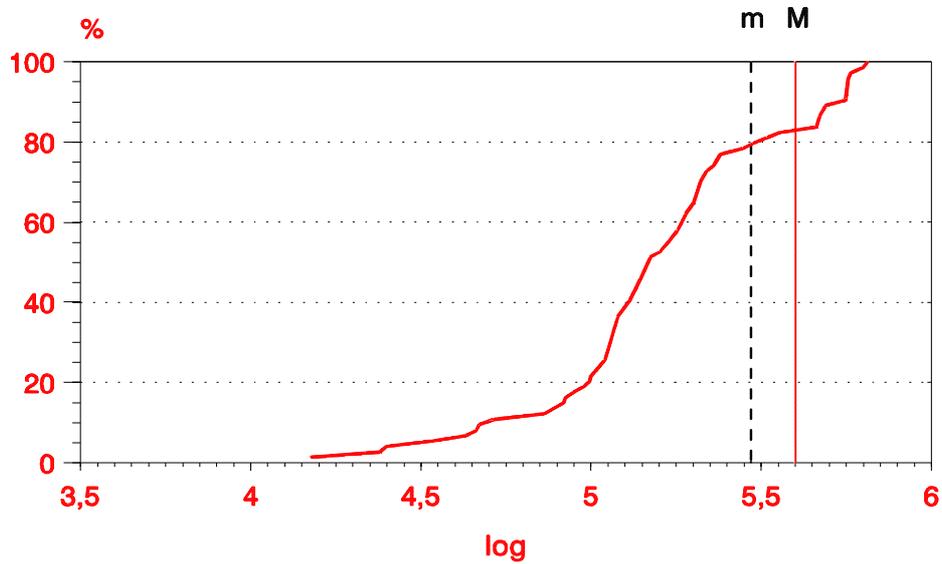
Tab. 22: Krankheitserreger in Vorzugsmilch (Bestandmilch)			
Krankheitserreger	Anzahl/Proben	positive Proben	Prozent
<i>L. monocytogenes</i>	74	12	16,2 ¹
<i>B. cereus</i>	74	0	0
VTEC	72	0	0
<i>Salmonella spp.</i>	74	0	0
<i>C. jejuni</i>	74	0	0

¹ Alle 12 positiven Proben stammen aus einem Betrieb

Tab. 23: Quantitative Parameter zur Vorzugsmilch (Bestandmilch): Keimzahl/ml, Zellzahl/ml, <i>S. aureus</i>/ml, <i>E. coli</i>/ml, Coliforme/ml					
Parameter	Keimzahl	Zellzahl	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	Coliforme
Anzahl	73	74	74	74	74
Positiv	73	74	40 (54,0 %)	44 (59,5 %)	65 (87,8 %)
M (cfu bzw. Zellen/ml)	50.000	400.000	500	M (-)	100
> M	17 %	17 %	17 %	-	22 %
Min	1,0 x 10 ²	1,5 x 10 ⁴	0	0	1,0 x 10 ⁻³
5 %	6,8 x 10 ²	3,4 x 10 ⁴	0	1,0 x 10 ⁻³	1,0 x 10 ⁻³
25 %	2,2 x 10 ³	1,1 x 10 ⁵	0	1,0 x 10 ⁻³	2,3 x 10 ⁰
Median	5,1 x 10 ³	1,5 x 10 ⁵	2,4 x 10 ¹	3,6 x 10 ⁻¹	2,2 x 10 ¹
Mittelwert ¹	8,7 x 10 ³	1,6 x 10 ⁵	8,6 x 10 ²	8,3 x 10 ⁻²	1,0 x 10 ¹
75 %	2,1 x 10 ⁴	2,4 x 10 ⁵	2,9 x 10 ²	2,3 x 10 ⁰	9,3 x 10 ¹
95 %	5,8 x 10 ⁵	5,7 x 10 ⁵	9,0 x 10 ²	9,3 x 10 ⁰	1,1 x 10 ⁴
Max	4,3 x 10 ⁶	6,5 x 10 ⁵	1,1 x 10 ³	4,6 x 10 ¹	1,1 x 10 ⁵

¹ geometrisches Mittel (X_G), M (-): Höchstwert gesetzlich nicht festgelegt

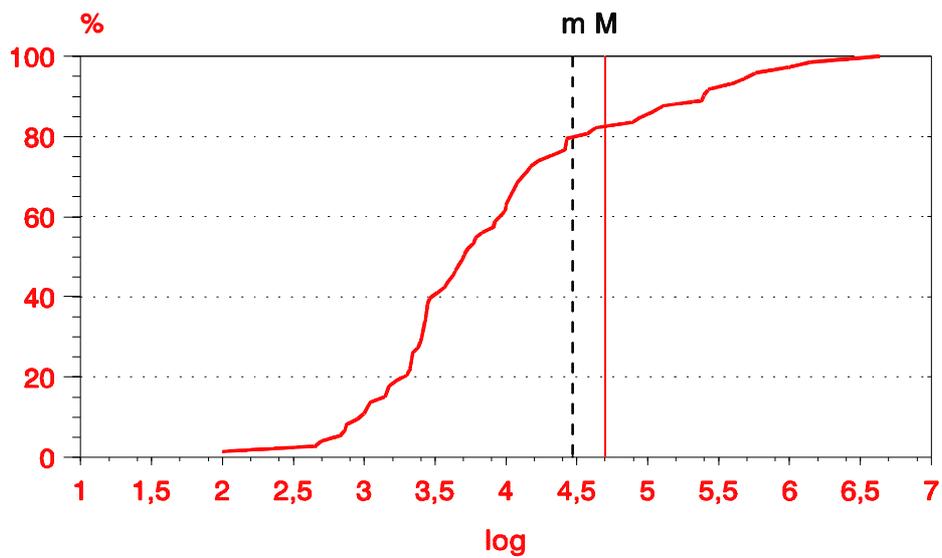
Abb.1: Produktgruppe: Vorzugsmilch (n=74)
Summenprozent: Zellzahl/ml (log)



m = Schwellenwert, M = Höchstwert

6_00199J

Abb. 2: Produktgruppe: Vorzugsmilch (n=73)
Summenprozent: Keimzahl/ml (log)



m = Schwellenwert, M = Höchstwert

6_00299J