

Aus dem Institut für Hygiene und Technologie der Lebensmittel tierischen Ursprungs
(Lehrstuhl Prof. Dr. E. Märtlbauer)
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Angefertigt am Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit,
Dienststelle Oberschleißheim
(Dr. U. Messelhäuser und Dr. P. Kämpf)

**Untersuchungen zum Vorkommen von *Enterobacter sakazakii* in Speiseeis
mit real-time-PCR-Verfahren**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Iris Kraemer
aus München

München 2008

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan:	Univ. -Prof. Dr. Braun
Berichterstatter:	Univ. -Prof. Dr. Dr. h.c. Märtlbauer
Koreferent:	Univ. -Prof. Dr. Korbel

Tag der Promotion: 8. Februar 2008

Meiner Mama und meiner Oma

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ACC.-number	Accession-number
ATCC	American Type Culture Collection
CFSAN	Center for Food Safety and Applied Nutrition
cp-Wert	Crossing Point
ct-Wert	Threshold Cycle
DNA	Desoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat
EFSA	European Food Safety Authority
Entsa-F	<i>E. sakazakii</i> -Forward primer
Entsa-R	<i>E. sakazakii</i> -Reverse primer
Entsa-S	<i>E. sakazakii</i> -Sonde
ESPM	<i>Enterobacter sakazakii</i> chromogenic plating medium
ESSM	<i>Enterobacter sakazakii</i> screening medium
FAM	6-Carboxyfluorescein
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FDA	Food and Drug Administration
HEX	Hexachloro-6-carboxyfluorescein
IPC	Interne Amplifikationskontrolle
MPN	Most probable number
pUC	Plasmid University of California
rDNA	Ribosomal desoxyribonucleinacid
SYBR Green	Farbstoff
TAMRA	6-Carboxytetramethylrhodamin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)- aminomethan/Ethylendiamintetraessigsäure
WHO	World Health Organization

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
2	LITERATUR	2
2.1	<i>Enterobacter sakazakii</i>	2
2.1.1	Taxonomische Stellung	2
2.1.2	Physiologische Eigenschaften	3
2.1.2.1	Biofilmbildung	4
2.1.2.2	Einfluss unterschiedlicher Temperaturen	4
2.1.2.3	Einfluss von pH-Wert, Druck und trockenen Bedingungen	5
2.1.2.4	Biochemische Eigenschaften	5
2.1.3	Pathogenitätsmechanismen	6
2.1.4	Vorkommen von <i>Enterobacter sakazakii</i> in der Umwelt	7
2.1.5	Vorkommen von <i>Enterobacter sakazakii</i> in Lebensmitteln	7
2.1.5.1	Säuglingsnahrung	7
2.1.5.2	Sonstige Lebensmittel und Trinkwasser	9
2.1.6	Epidemiologie und Ausbrüche	9
2.2	Nachweis von <i>Enterobacter sakazakii</i>	13
2.2.1	Kulturelle Verfahren zum Nachweis von <i>Enterobacter sakazakii</i>	13
2.2.2	Grundlagen molekularbiologischer Verfahren zum Nachweis von <i>Enterobacter sakazakii</i>	16
2.2.2.1	Polymerase Chain Reaction (PCR)	16
2.2.2.2	Real-time-PCR	16
2.2.3	Molekularbiologische Verfahren zum Nachweis und zur Typisierung von <i>Enterobacter sakazakii</i>	17
3	EIGENE UNTERSUCHUNGEN: MATERIAL UND METHODEN	18
3.1	Material	18
3.1.1	Allgemeine Materialien	18
3.1.2	Materialien und Geräte für die Isolierung und biochemische Differenzierung von <i>Enterobacter sakazakii</i>	19
3.1.2.1	Materialien für die Isolierung	19

II

3.1.2.1.1	Flüssige Nährböden	19
3.1.2.1.2	Feste Nährböden	19
3.1.2.1.3	Reagenzien	19
3.1.2.2	Materialien für die biochemische Differenzierung	20
3.1.2.3	Geräte	20
3.1.3	Materialien und Geräte für den real-time-PCR-Nachweis	20
3.1.3.1	Materialien bei Verwendung des Thermocyclers Mx3000P	20
3.1.3.2	Geräte bei Verwendung des Thermocyclers Mx3000P	20
3.1.3.3	Materialien bei Verwendung des Thermocyclers LightCycler 2.0	21
3.1.3.4	Geräte bei Verwendung des Thermocyclers LightCycler 2.0	21
3.1.4	Untersuchungsmaterial	22
3.2	Methoden	22
3.2.1	Voruntersuchungen	22
3.2.1.1	Mikrobiologische Voruntersuchungen	22
3.2.1.1.1	Voruntersuchungen an Reinkulturen	22
3.2.1.1.2	Voruntersuchungen an künstlich kontaminierten Speiseeisproben	23
3.2.1.2	PCR-Voruntersuchungen: PCR nach Heuvelink et al. (2004)	24
3.2.1.3	PCR-Voruntersuchungen: PCR nach Liu et al. (2006)	27
3.2.2	Hauptuntersuchungen	29
3.2.2.1	Entnahme und Lagerung der Speiseeisproben	29
3.2.2.2	Kultureller Nachweis	29
3.2.2.2.1	Nachweis von <i>Enterobacter sakazakii</i> nach einer Anreicherung in gepuffertem Peptonwasser	29
3.2.2.2.2	Nachweis von <i>Enterobacter sakazakii</i> nach ISO/TS 22964 IDF/RM 210 (2006)	30
3.2.2.2.3	Quantifizierung von <i>Enterobacter sakazakii</i>	31
3.2.2.2.4	Nachweis coliformer Keime in Laurylsulfat-Tryptose-Nähr- medium	31
3.2.2.3	Molekularbiologischer Nachweis von <i>Enterobacter sakazakii</i>	31
3.2.2.3.1	Real-time-PCR nach Heuvelink et al. (2004)	31
3.2.2.3.2	Real-time-PCR nach Liu et al. (2006)	32
3.2.2.3.3	PCR mittels LightCycler 2.0	32
3.2.2.3.4	<i>ompA</i> -targeted PCR	33

4	EIGENE UNTERSUCHUNGEN: ERGEBNISSE	33
4.1	Ergebnisse der mikrobiologischen Voruntersuchungen	33
4.1.1	Voruntersuchungen an Reinkulturen	33
4.1.2	Voruntersuchungen an künstlich kontaminierten Speiseeisproben	34
4.1.2.1	Vanilleeiscreme aus industrieller Herstellung	34
4.1.2.2	Handwerklich gefertigtes Speiseeis	34
4.2	Ergebnisse der PCR-Voruntersuchungen: PCR nach Heuvelink et al. (2004)	35
4.3	Ergebnisse der PCR-Voruntersuchungen: PCR nach Liu et al. (2006)	38
4.4	Ergebnisse der Hauptuntersuchungen	39
4.4.1	Gesamtergebnisse der Untersuchung von Speiseeis auf <i>Enterobacter sakazakii</i>	39
4.4.2	Ergebnisse unter Berücksichtigung der verschiedenen Untersuchungsverfahren	40
4.4.2.1	Ergebnisse der kulturellen Untersuchungen	40
4.4.2.1.1	Nachweis von <i>Enterobacter sakazakii</i>	40
4.4.2.1.2	Quantitative Untersuchung auf <i>Enterobacter sakazakii</i>	41
4.4.2.1.3	Beziehung zwischen Coliformengehalt und <i>Enterobacter sakazakii</i> -positiven Proben	41
4.4.2.1.4	Biochemische Differenzierung der <i>Enterobacter sakazakii</i> -Isolate	43
4.4.2.2	Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchungen	43
4.4.3	Gegenüberstellung unterschiedlicher Untersuchungsverfahren	44
4.4.3.1	PCR-Methoden und kultureller Nachweis nach Anreicherung in gepuffertem Peptonwasser	44
4.4.3.2	PCR-Methoden und kulturelle Untersuchung nach ISO/TS 22964 IDF/RM 210 (2006)	45
5	BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE UND DISKUSSION	46
5.1	Einleitung und Ziel der Arbeit	46
5.2	Voruntersuchungen	47

5.2.1	Mikrobiologische Voruntersuchungen	47
5.2.2	Voruntersuchungen zur Optimierung der molekularbiologischen Verfahren für den Nachweis von <i>Enterobacter sakazakii</i> in Speiseeis	48
5.3	Hauptuntersuchungen	49
5.3.1	Ergebnisse der Untersuchung von Speiseeis auf <i>Enterobacter sakazakii</i>	49
5.3.2	Kultureller Nachweis von <i>Enterobacter sakazakii</i>	50
5.3.3	Beziehung zwischen Coliformengehalt und <i>Enterobacter sakazakii</i> -positiven Proben	50
5.3.4	Molekularbiologischer Nachweis von <i>Enterobacter sakazakii</i>	51
5.3.5	Zusammenfassende Bewertung der molekularbiologischen Verfahren im Hinblick auf den Einsatz in der Routinediagnostik	52
5.3.6	Ausblick	53
6	ZUSAMMENFASSUNG	54
7	SUMMARY	56
8	LITERATURVERZEICHNIS	58
9	ANHANG	72

1 EINLEITUNG

Enterobacter sakazakii zählt zur Gruppe der bisher selten diagnostizierten lebensmittelassoziierten Infektionserreger. Auch wenn eine Infektiosität für alle Altersgruppen gegeben ist, betrifft eine Erkrankung überwiegend Frühgeborene und Säuglinge. *E. sakazakii* wurde zusammen mit *Salmonella enterica* 2004 von der FAO/WHO bei der Risikobewertung von Säuglingsfertiernahrung auf Milchpulverbasis in die Kategorie A (sicherer Beweis der Kausalität zwischen Anwesenheit des Erregers in Säuglingsanfangsnahrung und Erkrankung von Kindern) eingestuft. Diese Einstufung wurde 2006 von oben genannter Expertenkommission bestätigt. Der Erreger verursacht u. a. Sepsis, Meningitis und nekrotisierende Enterokolitis und ist gerade für die Risikogruppen mit einer hohen Letalität verbunden.

Ziel der Arbeit war es, ein molekularbiologisches Nachweisverfahren für *E. sakazakii* in Ergänzung zu mikrobiologischen Methoden zu etablieren, um so den routinemäßigen Nachweis des Erregers im Lebensmittelbereich, insbesondere bei Speiseeis zu vereinfachen. Des Weiteren sollte mit Hilfe dieses Konzeptes der Kontaminationsgrad von Speiseeis ermittelt werden, da bei den routinemäßig durchgeführten Hygienekontrollen gelegentlich *E. sakazakii* in Speiseeisproben kulturell nachgewiesen wurde. Wissenschaftliche Daten zum Vorkommen dieses Erregers in dem genannten Untersuchungsmaterial fehlen nahezu ganz.

Im Zeitraum von April bis Oktober 2006 wurden 1253 sowohl handwerklich als auch industriell hergestellte Speiseeisproben aus dem südbayerischen Raum, die im Rahmen des Amtlichen Probenplanes durch das Bayerische Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL) in Oberschleißheim angefordert oder dort als Verdachts- bzw. Beschwerdeproben abgegeben wurden, untersucht.

2 LITERATUR

2.1 *Enterobacter sakazakii*

2.1.1 Taxonomische Stellung

Enterobacter (E.) sakazakii ist ein gramnegatives Bakterium, das zur Familie der *Enterobacteriaceae* und derzeit noch zum Genus *Enterobacter* gehört. *E. sakazakii* wurde erstmals 1958 bei zwei schweren Fällen von neonataler Meningitis identifiziert (Urmenyi und Franklin, 1961), damals aber noch als gelb pigmentierter, beweglicher, begeißelter, nicht Sporen bildender *Enterobacter cloacae*-Stamm bezeichnet (Monroe und Tift, 1979). Im Jahr 1980 wurde das Bakterium aufgrund unterschiedlicher DNA-Zusammensetzung, abweichender biochemischer Reaktionen und wegen der oben genannten Gelbpigmentierung als eigene Spezies eingestuft und nach dem japanischen Bakteriologen Riichi Sakazaki benannt (Farmer et al., 1980).

In einer Studie über die phylogenetische Verwandtschaft zwischen *E. sakazakii*-Stämmen untereinander und deren Vergleich mit *Enterobacter* spp. und *Citrobacter* spp. zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen einzelnen Stämmen von *E. sakazakii*, aber auch deren große Ähnlichkeit mit anderen *Enterobacter*- und *Citrobacter*-Spezies. Es wurden 126 Stämme von *E. sakazakii*, darunter auch der Referenzstamm NCTC 11467, sowie Isolate klinischer Herkunft herangezogen, die alle bereits mit biochemischen Testverfahren (API 20 E und ID 32 E, BioMérieux) bestätigt worden waren. Als Vergleichsmaßstab diente die Sequenzierung zum einen der 16S rDNA und zum anderen des Gens hsp60 (Hitzeschockprotein mit Molekulargewicht 60). Die Unterschiede in den Sequenzanalysen ergaben für *E. sakazakii*-Stämme vier Clustergruppen und ließen somit erkennen, dass die Stämme genetisch nicht einheitlich und im Hinblick auf die Taxonomie komplexer sind als bis zu diesem Zeitpunkt angenommen. Die DNA-DNA-Hybridisierung ermöglichte jedoch keine eindeutige Einstufung von *E. sakazakii* in eine bestimmte Gattung, da er 53-54 % Verwandtschaft sowohl zur Gattung *Enterobacter* als auch zur Gattung *Citrobacter* zeigte. Trotzdem wurde die Spezies dem Genus *Enterobacter* zugeordnet, da sie phänotypisch und genotypisch näher an *E. cloacae* lag als an *C. freundii* (Iversen et al., 2004c).

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden von Iversen et al. neue Untersuchungen hinsichtlich der taxonomischen Einordnung durchgeführt und 2007 ein Vorschlag zur Neuklassifizierung von *E. sakazakii* veröffentlicht. Um neue Erkenntnisse über die taxonomische Stellung zu erhalten, wurden folgende Parameter herangezogen: f-AFLP (amplified fragment length polymorphisms) fingerprints, Ribotypisierung, DNA-DNA-Hybridisierung und Gensequenzierung der 16S rRNA (> 1300 Basenpaare im Gegensatz zu früheren Untersuchungen mit ca. 500 Basenpaaren). Das aufgrund der Untersuchungsergebnisse vorgeschlagene neue Genus *Cronobacter* wurde nach dem griechischen Gott Kronos benannt, der nach der Mythologie seine Kinder bei der Geburt verschlungen haben soll.

Neben der Genotypisierung wurden auch das phänotypische Profil und biochemische Schlüsselreaktionen unter Einbeziehung von 210 *E. sakazakii*-Stämmen bestimmt. Der Vergleich der Merkmale zeigte eine mögliche Unterteilung in fünf Gruppen. Die DNA-Übereinstimmung zwischen den einzelnen Gruppen lag eindeutig unter 70 %, weshalb daraus auf fünf separate Spezies geschlossen wurde und zwar: *Cronobacter sakazakii* comb. nov. mit *C. sakazakii* subsp. *sakazakii* comb. nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. *malonaticus* subsp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov. und *Cronobacter* genomospecies 1.

Zur phänotypischen Differenzierung der Spezies wurden als biochemische Tests die Indolproduktion, Malonatverwertung und Säurebildung aus Dulcitol und Methyl-alpha-D-Glucosid herangezogen. *Cronobacter* genomospecies 1 lässt sich allerdings von *Cronobacter turicensis* nicht phänotypisch, sondern nur genotypisch unterscheiden. Die Autoren betonen, dass sich durch die Neuklassifizierung von *E. sakazakii* hinsichtlich der Risikobewertung nichts ändern sollte. Alle fünf neuen Spezies, die gegenwärtig als *E. sakazakii* bezeichnet werden, enthalten klinische Isolate (Iversen et al., 2007).

2.1.2 Physiologische Eigenschaften

Charakteristisch für *E. sakazakii* ist seine Anpassungsfähigkeit an unterschiedliche Temperaturen, an hohen osmotischen Druck und/oder trockene Bedingungen, wie sie bei der Herstellung von pulverförmiger Kindernahrung auftreten. Diese Fähigkeit beruht auf mehreren Faktoren, wozu u. a. die Produktion von Zellulose, die Bildung von

Biofilmen, das Anhaften an hydrophile und hydrophobe Oberflächen, die Produktion von extrazellulären Polysacchariden und die Fähigkeit Signalmoleküle für die Kommunikation zwischen den Zellen zu bilden, zählen (Lehner et al., 2005).

2.1.2.1 Biofilmbildung

Die Bildung von Biofilmen äußert sich zum einen in Zellverklumpung oder Flockenbildung in Flüssigkeiten und zum anderen im Anhaften an feste Oberflächen. Voraussetzung dafür ist die Produktion von Zellulosefasern und/oder Curli-Fimbrien (Zogaj et al., 2003). Bei der mikroskopischen Untersuchung der Verklumpungen und Ausflockungen wurden sowohl in lockeren wie auch in festen Zellverbänden Fasern erkannt, die mit "Calcofluor" behaftet waren. Diese Zellulosefasern stellen eine extrazelluläre Komponente des Biofilms dar (Lehner et al., 2005). Die Biofilmbildung und die genetischen Voraussetzungen für die Biosynthese von Zellulose und Curli-Fimbrien wurden bereits bei *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp. und *Klebsiella* spp., die aus dem menschlichen Gastrointestinaltrakt isoliert worden waren, näher untersucht. In einer Studie über Biofilmbildung wurde festgestellt, dass ein Anhaften z. B. an Edelstahl oder Ernährungssonden abhängig von Zellzahlen, Temperatur und Nährstoffangebot möglich ist (Kim et al., 2006).

2.1.2.2 Einfluss unterschiedlicher Temperaturen

Bei der Untersuchung von sechs *E. sakazakii*-Stämmen wurde ein Wachstumsoptimum in rekonstituierter Säuglingsnahrung in Pulverform bei Temperaturen von 37 °C bis 43 °C festgestellt, wobei hier die niedrigste Temperatur, bei welcher der Keim sich noch vermehrte, mit 6 °C, die höchste Temperatur mit 45 °C angegeben wurde (Iversen et al., 2004b). Kandhai et al. ermittelten 2006 bei der Untersuchung von rekonstituierter Säuglingsnahrung in Pulverform ein Wachstum von *Enterobacter sakazakii* im Temperaturbereich zwischen 8 °C und 47 °C.

Bei der Untersuchung von zehn kanadischen *E. sakazakii*-Stämmen (fünf klinische Isolate und fünf Lebensmittelisolate), die in rekonstituierter Säuglingsnahrung in Pulverform erhitzt worden waren, zeigten sich bei Temperaturen von 52 ° / 54 ° / 56 ° / 58 ° und 60 °C entsprechende D-Werte von 54,8 / 23,7 / 10,3 / 4,2 und 2,5 min, der

berechnete z-Wert betrug 5,82 °C. Verglichen mit den D-Werten anderer *Enterobacteriaceae* in Milchprodukten erweist sich *E. sakazakii* somit als einer der hitzetolerantesten Organismen dieser Gruppe (Nazarowec-White und Farber, 1997a). Neuere Untersuchungen belegten für Isolate aus braunem Reis D-Werte von 3,79 - 3,86 min bei 60 °C. Andere landwirtschaftliche Produkte wiesen D-Werte zwischen 4,40 und 4,79 min bei 60 °C auf (Jung und Park, 2006).

2.1.2.3 Einfluss von pH-Wert, Druck und trockenen Bedingungen

Neben der oben beschriebenen hohen Resistenz gegenüber verschiedenen Erhitzungstemperaturen konnte bei *E. sakazakii* eine Säureresistenz bis zu einem pH-Wert von 3,0 demonstriert werden. Hierbei lag die Keimreduktion in Tryptose-Soja-Bouillon innerhalb von fünf Stunden bei 36 °C zwischen 4,9 bis > 6,3 log KbE/ml (Edelson-Mammel et al., 2006).

Gonzalez et al. (2006) erreichten eine Reduktion verschiedener *E. sakazakii*-Stämme in rekonstituierter Säuglingsnahrung in Pulverform zwischen 3 und 6,84 log bei einer Druckbelastung von 600 MPa während einer Minute. In Säuglingsnahrung in Pulverform konnte eine Überlebensdauer bekapselter *E. sakazakii*-Stämme von mindestens zweieinhalb Jahren beobachtet werden (Caubilla Barron et al., 2007).

2.1.2.4 Biochemische Eigenschaften

Ein charakteristisches Merkmal von *E. sakazakii* ist die alpha-Glucosidase-Aktivität (Muytjens et al., 1984), die in einer Studie bei 53 von 57 getesteten Stämmen nachgewiesen wurde (Farmer et al., 1985). Diese Reaktion wurde bei der Entwicklung von Selektivnährböden genutzt. Folgende Kohlenhydrate können von *E. sakazakii* verwertet werden: Glucose wird von allen bisher bekannten Stämmen umgesetzt; Melibiose, Saccharose, Arabinose und Amygdalin von 99 % und Inosit von 75 % der Stämme. Der Voges-Proskauer-Test ist bei 91 % der Stämme positiv (API 20 E, BioMérieux, 2007). Gelbe Pigmentbildung zeigen die meisten *E. sakazakii*-Stämme (Farmer et al., 1980). In Untersuchungen von Iversen und Forsythe (2007) produzierten allerdings 2 % der geprüften *E. sakazakii*-Stämme kein gelbes Pigment.

2.1.3 Pathogenitätsmechanismen

Über die Pathogenitätsmechanismen von *E. sakazakii* ist bisher noch wenig bekannt. Die minimale infektiöse Dosis wird auf $< 3 \text{ KbE}/100 \text{ g}$ geschätzt (FAO/WHO, 2004). Eine wichtige Voraussetzung für eine erfolgreiche Kolonisation, Etablierung und schließlich krankmachende Wirkung von Erregern ist die Fähigkeit, sich z. B. an Schleimhaut sowie Epi- oder Endothel des Gastrointestinaltraktes anzuheften. In einer Studie wurde *in vitro* die Anheftungsfähigkeit von 50 *E. sakazakii*-Stämmen an zwei Epithelzelllinien (HEp-2 und Caco-2) und eine mikrovaskuläre Gehirndothelzelllinie (HBMEC) untersucht. Als Ergebnis wurden zwei Adhärenzmuster auf der Zelloberfläche deutlich; zum einen eine diffuse Adhärenz, zum anderen die Bildung von Bakteriennestern. Verschiedene weiterführende Tests, u. a. auch im Transmissions-Elektronen-Mikroskop ließen den Schluss zu, dass das Anhaften von *E. sakazakii* an den Epithel- und Endothelzellen in der Hauptsache nicht mit der Produktion von Fimbrien in Zusammenhang steht (Mange et al., 2006).

Lenati et al. (2006) untersuchten in einem Versuchsmodell mit Nicht-Primaten die Pathogenitätsmechanismen und die Dosis-Wirkungs-Beziehung bei einer Exposition mit *E. sakazakii*. Dazu wurden jungen Schweinen, Hühnern, Kaninchen, Meerschweinchen und Mäusen orale Dosen von 10^9 KbE von drei verschiedenen *E. sakazakii*-Stämmen unterschiedlicher Herkunft verabreicht. In allen Fällen konnte der Keim im Kot der Tiere - entnommen in verschiedenen Zeitabständen - und in verschiedenen Organen der Hühner nachgewiesen werden. Diese Kolonisierung mit *E. sakazakii* führte aber nicht zum Tod der Tiere.

Da es Hinweise darauf gibt, dass Lipopolysaccharide der Zellwand gramnegativer Keime (Endotoxine) die Durchlässigkeit der Darmwand für Mikroorganismen erhöhen, ermittelten Townsend et al. (2007) die Endotoxingehalte von 75 Proben getrockneter Säuglingsnahrung auf Milchbasis und fanden dabei mit dem Limulus-Amöbozyten-Lysat-Test Endotoxinkonzentrationen zwischen 40 und $5,5 \times 10^4$ Einheiten/g. Im Tierversuch mit Ratten konnte nach einer Applikation von Endotoxinen und anschließender Verfütterung hoher Dosen an *E. sakazakii* der Keim in verschiedenen Organen sowie in der Zerebrospinalflüssigkeit nachgewiesen werden. Möglicherweise ist dieses Modell auch auf neugeborene Kinder, insbesondere solche, deren

Immunsystem noch nicht ausreichend entwickelt ist, übertragbar. Dies würde die Forderung nach einer hygienisch einwandfreien Säuglingsnahrung unterstreichen.

Auf eine mögliche Beteiligung von Toxinen an Erkrankungen weisen Untersuchungen von Pagotto et al. (2003) hin. So konnten in entsprechenden Versuchen zytotoxische Effekte bei Zellkulturen und Tod von Babymäusen nach intraperitonealer, z. T. auch oraler Applikation von Kulturfiltraten beobachtet werden. Allerdings waren diese Ergebnisse nicht mit allen geprüften *E. sakazakii*-Stämmen reproduzierbar. Auch wiesen nicht alle im Babymaustest positiven Stämme gleichzeitig zytotoxische Eigenschaften auf.

2.1.4 Vorkommen von *Enterobacter sakazakii* in der Umwelt

Nach verschiedenen Untersuchungen könnte eines der Umweltreservoirs von *E. sakazakii* der Darm von Fliegen sein. So berichteten Hamilton et al. (2003) über die Isolierung des Erregers aus dem Darm der Larve der Stallfliege (*Stomoxys calcitrans*), und Kuzina et al. (2001) aus dem Darm der mexikanischen Fruchtfliege (*Anastrepha ludens*). In den USA wurde auch bei Untersuchungen der Hausfliege (*Musca domestica*) *E. sakazakii* nachgewiesen (Hamilton et al., 2003). Die letztgenannten Autoren diskutieren eine mögliche Übertragung des Keimes durch *Stomoxys calcitrans* auf die Milch von Nutztieren.

Als weiteres mögliches Reservoir von *E. sakazakii* wurden in Spanien hyperthermale Mineralwasserquellen beschrieben (Mosso et al., 1994).

2.1.5 Vorkommen von *Enterobacter sakazakii* in Lebensmitteln

2.1.5.1 Säuglingsnahrung

Eine wichtige Quelle für die Infektion ist Säuglingsnahrung auf Milchpulverbasis. In Tab. 1 findet sich eine Zusammenstellung der Ergebnisse verschiedener Studien zum Vorkommen und zum Gehalt von *E. sakazakii* in Säuglingsnahrung in Pulverform.

Tabelle 1: Untersuchungen zum Vorkommen von *E. sakazakii* in Säuglingsnahrung in Pulverform (in Anlehnung an FAO/WHO, 2006)

Autoren	Probengewicht (g)	Probenzahl	<i>E. sakazakii</i> -positive Proben (%)	Keimzahl (KbE/100g)
Muytjens et al., 1988	333-555	141	20 (14,2)	0,36-66
Nazarowec-White und Farber, 1997b	333	120	8 (6,7)	0,36
FDA, 2003	333	22	5 (22,7)	0,36
Heuvelink et al., 2003	25	101	2 (2)	n. d. ¹
Kress et al., 2004	300	40	5 (12,5)	n. d. ¹
Iversen und Forsythe, 2004	25	102	3 (2,9)	n. d. ¹
Santos, 2006	5 x 100	98	12 (12,2)	0,22-1,61

¹ nicht durchgeführt

Neben unsterilen Frühgeborenen-, Säuglingsanfangs- und Folgenahrungen kommen als Infektionsquellen auch Bedarfsgegenstände, die zur Zubereitung dieser Lebensmittel in den Kliniken benutzt werden, in Frage (Van Acker et al., 2001; Bar-Oz et al., 2001). Epidemiologische Untersuchungen ergaben für derartige Nahrungsmittel folgende Kontaminationsquellen mit *E. sakazakii* (Drudy et al., 2006):

- Im Herstellungsbetrieb nach der Pasteurisation
- Bei der Rekonstitution
- Bei der Lagerung des rekonstituierten Lebensmittels

Kindernahrung auf Zerealien-Basis wurde wegen hoher Keimzahlen an *Enterobacteriaceae* in Luxemburg aus dem Handel genommen; eine Beteiligung von *E. sakazakii* wurde vermutet (Sécurité alimentaire – Grand-Duché de Luxembourg, 2005). Im Oktober 2006 wurde eine Säuglingsnahrung, die in Dänemark für eine Firma in Griechenland hergestellt worden war, wegen des Nachweises von *E. sakazakii* gesperrt und zurückgerufen (Kämpf, 2006; pers. Mitteilung). In Deutschland wurde 2007 von den Firmen Milupa und Bebivita Säuglingsmilchnahrung („Anfangsmilch“) zurückgerufen, da bei einer Routineuntersuchung *E. sakazakii* gefunden worden war (Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, 2007).

2.1.5.2 Sonstige Lebensmittel und Trinkwasser

E. sakazakii wurde auch in anderen Lebensmitteln nachgewiesen. So wurde der Keim aus roh zu verzehrenden Produkten wie Blattsalat oder verschiedenen Gemüsesorten isoliert (Kim und Beuchat, 2005). Ebenso wurde er in ultrahocherhitzter Milch, verdorbenem Tofu, in Khamir (saudiarabische Brotsorte) und in Bierkrügen nach dem Ausspülen gefunden (Hamilton et al., 2003). Der Keim wurde auch in Hackfleisch und Fleischbrät (Leclercq et al., 2002) sowie italienischem Pecorino-Käse (Chaves-Lopez, 2006) nachgewiesen. Außerdem wurde das Vorkommen von *E. sakazakii* in der Produktionsumgebung von Schokolade-, Getreide-, Kartoffel- und Nudelprodukten sowohl in Fabriken als auch in Haushalten festgestellt (Lehner und Stephan, 2004; Kandhai et al., 2004). Bei der Untersuchung von verschiedenen Wasserproben aus Südbayern wurde *E. sakazakii* in Trinkwasser aus Einzelversorgung, Mineral-, Quell- und Tafelwasser, Bierkrugspülwasser und in Bademoor vor und nach dem Baden gefunden (Schindler, 2006; pers. Mitteilung). Vom Bundesinstitut für Risikobewertung liegt eine Zusammenfassung über das Vorkommen von *E. sakazakii* in verschiedenen Lebensmitteln und Lebensmittelzutaten vor (Friedemann, 2007). Demnach wurde der Keim aus pflanzlicher Nahrung wie Zerealien, Früchten und Gemüse, Produkten aus Hülsenfrüchten, Kräutern und Gewürzen, sowie aus Nahrungsmitteln tierischer Herkunft wie Milch, Fleisch und Fisch isoliert. Die kontaminierten Lebensmittel waren sowohl roh als auch verarbeitet; die verarbeiteten Produkte sowohl getrocknet als auch frisch, gefroren, fermentiert oder gekocht. *E. sakazakii* wurde ebenso in Fertignahrung und Getränken nachgewiesen. Zum Vorkommen in Speiseeis konnten im Schrifttum keine Daten gefunden werden. In einer Erhebung von Heuvelink et al. (2004) wurden allerdings 87 Eismix-Proben (der noch flüssige Ansatz, der alle Zutaten des späteren Produkts enthält) untersucht, in denen *E. sakazakii* nicht nachgewiesen werden konnte.

2.1.6 Epidemiologie und Ausbrüche

Im Jahr 2002 wurde *E. sakazakii* von der International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF) als „severe hazard for restricted populations, life threatening or substantial chronic sequelae or long duration“ eingestuft (ICMSF, 2002) und 2004 zusammen mit *Salmonella enterica* von der FAO/WHO bei der

Risikobewertung von Säuglingsnahrung in Pulverform in die Kategorie A (sicherer Beweis der Kausalität zwischen Anwesenheit des Erregers in Säuglingsnahrung in Pulverform und Erkrankung von Kindern) aufgenommen. Diese Einstufung wurde 2006 von o. g. Expertenkommission bestätigt (FAO/WHO, 2006).

E. sakazakii kann in allen Altersstufen zu Erkrankungen führen. Die Risikogruppe stellen aber in der Hauptsache Kinder unter zwölf Monaten, vor allem Früh-, und Neugeborene, Säuglinge unter zwei Monaten oder durch Erkrankungen vorgeschädigte, immungeschwächte Säuglinge dar. Nach einer Erhebung in den USA von 2002 lag bei Kindern unter zwölf Monaten die Inzidenz invasiver *E. sakazakii*-Infektionen bei einem Fall pro 100.000 Kinder pro Jahr, während sie bei untergewichtigen Neugeborenen 8,7 pro 100.000 Kinder pro Jahr betrug (FAO/WHO, 2004). Stoll et al. berichteten 2004 nach einer Studie in Intensivstationen von einer Inzidenz von 9,4 pro 100.000 Säuglingen mit sehr geringem Geburtsgewicht (< 1.500 g) pro Jahr. Die Erkrankungshäufigkeit hängt demnach nicht nur vom Alter, sondern auch vom Gewicht der Patienten ab.

Eine Infektion mit *E. sakazakii* kann verschiedene Organe betreffen, verschiedene Formen annehmen und entsprechend unterschiedliche Symptomatiken aufweisen. Bei den Centers for Disease Control and Prevention (CDC) in Atlanta, USA wurden 46 Fälle von Infektionen mit *E. sakazakii* bei Kindern retrospektiv analysiert (Bowen und Braden, 2006) (Tab. 2). Berücksichtigung fanden nur solche Erkrankungen, bei denen der Erreger in normalerweise sterilen Körperregionen (Zerebrospinalflüssigkeit, Blut etc.) nachweisbar war. Zwölf der Kinder litten an Bakteriämie, 33 an Meningitis und ein Kind an einer Infektion der Harnwege. Im Vergleich zu Frühgeborenen mit Bakteriämie wiesen die Patienten mit Meningitis ein höheres Geburtsgewicht, eine längere Schwangerschaftsdauer der Mutter und einen früheren Infektionszeitpunkt auf. Die Letalitätsrate bei den Bakteriämiefällen lag bei 8 %, hingegen bei den Meningitisfällen bei 44 %. Bei letzteren traten außer Krämpfen auch Hirnabszesse und -zysten, Hydrozephalus und Entwicklungsstörungen auf. Nicht in allen Fällen konnte getrocknete Säuglingsnahrung auf Milchbasis als Erregerquelle nachgewiesen werden.

Tabelle 2: Fälle invasiver *E. sakazakii*-Infektionen (Bowen und Braden, 2006)

Jahr der Veröffentlichung	Land	Anzahl der Fälle
1961	Großbritannien	2
1965	Dänemark	1
1979	USA	1
1981	USA	2
1983	Niederlande	8
1985	USA	1
1988	USA	2
	Portugal	1
1989	Island	3
	USA	3
1990	USA	1
1991	USA	1
2000	USA	1
2001	Israel	2
	Belgien	1
2002	Israel	2
	USA	2
2003	USA	6
2004	Frankreich	2
	USA	2
2005	USA	2

1988 traten drei Fälle von blutigem Neugeborenenendurchfall in Memphis, USA auf (Simmons et al., 1989). Als weitere Erkrankungen werden nekrotisierende Enterokolitiden sowie nekrotisierende Meningoenzephalitiden beschrieben (Muytjens et al., 1983; Iversen und Forsythe, 2003). Über Krankheitsfälle mit Bakteriämie und Befall des zentralen Nervensystems bei Kindern über 12 Monate wird im Schrifttum in drei, bei Erwachsenen in acht Fällen berichtet. Bei letzteren waren in sechs Fällen die Betroffenen älter als 70 Jahre. Die meisten Erwachsenen mit *E. sakazakii*-Infektion litten bereits an schwerwiegenden, zu 50 % an malignen Grunderkrankungen; Meningitisfälle sind nicht bekannt (Lai, 2001). Einen Fall von Bakteriämie bei einem älteren

Patienten mit unbekannter Infektionsquelle beschrieben Hawkins et al. (1991). Eine weitere Bakteriämie mit multiplen Abszessen an der Milz wurde bei einer 75-jährigen Frau aus Singapur diagnostiziert (See et al., 2007).

Über eine Wundinfektion durch einen multiresistenten *E. sakazakii*-Stamm, die bei einem Erwachsenen, der sich wegen peripherer Gefäßerkrankung mehreren Operationen unterzogen hatte, auftrat, berichteten Dennison und Morris (2002). Ebenso wurden Infektionen der Harnwege und der Gallengänge sowie Prostata-Entzündungen, die durch *E. sakazakii*-kontaminierte Katheter aufgrund von Biofilmbildung hervorgerufen worden waren, beschrieben (Zogaj et al., 2003). Die Erkrankung eines ansonsten gesunden Mannes an Osteomyelitis des Femur, postoperativ durch *E. sakazakii* hervorgerufen, wurde von Corti et al. (2007) veröffentlicht. Die meisten Isolate von *E. sakazakii*, die bei Patienten gefunden wurden, stammten aus Zerebrospinalflüssigkeit, Blut, Sputum, Kot, dem Darm, Augen-, Nasen- und Knochenmarkabstrichen, Wunden, der Kehle und von der Haut (Farmer et al., 1980).

Bei einem Ausbruch in Frankreich im Jahr 2004 wurde über neun Fälle berichtet, zwei davon mit tödlichem Ausgang. Bei den betroffenen Kindern handelte es sich um Frühgeborene, die mit einer Ausnahme zum Zeitpunkt der Geburt untergewichtig waren. Zwei Kinder litten an Meningitis, ein Kind an hämorrhagischer Kolitis und eines an Konjunktivitis. Dazu kamen fünf Fälle, bei denen der Keim nachgewiesen wurde, allerdings ohne Vorliegen einer offensichtlichen Erkrankung. In allen neun Fällen erfolgte die Infektion mit hoher Wahrscheinlichkeit über eine hypoallergene Säuglingsmilchnahrung mit dem Handelsnamen „Pregestimil“. Vier in Frage kommende Chargen des Pulvers aus einem Produktionszeitraum von sechs Monaten enthielten 1 bis 10 *E. sakazakii*/100 g. Die beiden Chargen mit den höchsten Kontaminationsraten (22,4 % und 32,1 % positive Proben) waren in acht der neun Fälle involviert. Bei der nachträglichen Überprüfung der Kliniken zeigte sich, dass in einer Klinik weder die Herstellungsempfehlungen für die Aufbereitung der Säuglingsmilchnahrung, noch die Empfehlungen für den Umgang und die Aufbewahrung der Säuglingsflaschen eingehalten worden waren. Vier Einrichtungen lagerten die rekonstituierte Milchnahrung länger als 24 Stunden in einem Kühlschrank ohne Temperaturkontrolle (Coignard et al., 2006).

Über zwei Krankheitsfälle in einer Neugeborenenstation wurde aus Israel berichtet. Hierbei war die Erregerquelle ein Mischgefäß in der Milchküche der Klinik. Ein Kind litt an Septikämie, das andere an Septikämie und Meningitis mit zerebralem Infarkt (Bar-Oz et al., 2001).

Abschließend soll noch erwähnt werden, dass nach Untersuchungen von Lenati et al. (2005) sich *E. sakazakii* in abgepumpter Muttermilch ebenfalls sehr gut vermehren kann. Ein Fall von *E. sakazakii*-Meningitis, wahrscheinlich hervorgerufen durch kontaminierte Muttermilch, wurde in Brasilien bekannt (Barreira et al., 2003).

2.2 Nachweis von *Enterobacter sakazakii*

2.2.1 Kulturelle Verfahren zum Nachweis von *Enterobacter sakazakii*

Während ursprünglich (FDA/CFSAN, 2002) als flüssiges Selektivmedium die nicht für den Nachweis von *E. sakazakii* spezifische EE-Bouillon nach Mossel (*Enterobacteriaceae* enrichment broth) verwendet wurde (siehe weiter unten), gibt es inzwischen eine Reihe von Anreicherungsmedien, die direkt auf die Detektion von *E. sakazakii* ausgerichtet sind. Diese, sowie eine Reihe fester Selektivnährböden wurden vergleichend von Iversen und Forsythe (2007) hinsichtlich ihrer Produktivität und Leistungsfähigkeit getestet. Von 177 *E. sakazakii*-Stämmen wuchsen alle in der von den genannten Autoren neu entwickelten Anreicherungs-Bouillon ESE (*E. sakazakii* enrichment). Mit den bisher empfohlenen Medien EE (*E. sakazakii* enrichment), ESSB (*E. sakazakii* selective broth) und mLST (modified lauryl sulfate tryptose broth) konnten dagegen zwischen zwei und sechs Prozent der Stämme nicht nachgewiesen werden. Beim Vergleich chromogener Agarmedien wie ESIA (*E. sakazakii* isolation agar) und DFI-Agar (Druggan-Forsythe-Iversen agar), deren indikatives Prinzip auf der alpha-Glucosidase-Aktivität beruht, zeigten sich auf ESIA-Agar weniger falschpositive Kolonien als auf den anderen verwendeten Nährböden. Eine Zusammenfassung der Nachweismethoden für *E. sakazakii* in pulverisierter Säuglingsmilchnahrung wurde bei dem bereits erwähnten FAO/WHO Expertentreffen 2006 vorgestellt und ist in Tab. 3 wiedergegeben.

Tabelle 3: Methoden zum Nachweis von *E. sakazakii* in Säuglingsnahrung in Pulverform (FAO/WHO, 2006)

Methode	Voranreicherung (37 °C)	Anreicherung	Nachweis	Präsumtive Identifizierung (typische Kolonien)
FDA ^a	Steriles deionisiertes Wasser	EE-Bouillon (36 °C)	VRBG-Agar (36 °C)	Purpurfarbene Kolonien mit purpurfarbenem Gallensäurenpräzipitathof. Nach Ausstrich auf TSA (25 °C/ 48-72 h) Wachstum gelb pigmentierter Kolonien
DFI ^b	Gepuffertes Peptonwasser	EE-Bouillon (37 °C)	DFI-Agar (37 °C)	Blau-grüne Kolonien
NES ^c	Gepuffertes Peptonwasser	mLST mit Vancomycin (45 °C)	TSA (37 °C mit erhöhter Lichtexposition)	Gelbe, alpha- Glucosidase-positive Kolonien
ISO IDF ^d	Gepuffertes Peptonwasser	mLST mit Vancomycin (45 °C)	ESIA (44 °C)	Blau-grüne Kolonien
R & F ESPM- ESSM ^e	Steriles deionisiertes Wasser	EE Bouillon (35-37 °C)	ESPM (35 °-37 °C), anschließend Screening auf ESSM-Agar (35-37 °C, 4-6 h)	Blau-schwarze, erhöhte bis gewölbte Kolonien von 1-2 mm Durchmesser Gelbe Färbung um Bakterienwachstum nach 6 h

^a FDA/CFSAN (2002)^b Iversen et al. (2004a)^c Guillaume-Gentil et al. (2005)^d ISO/TS 22964 | IDF/RM 210 (2006)^e Restaino et al. (2006)

Auf die beiden national und international am häufigsten eingesetzten kulturellen Nachweisverfahren soll im Folgenden detaillierter eingegangen werden.

FDA/CFSAN (2002):

Zur Voranreicherung der Probe dient auf 45 °C vorgewärmtes steriles deionisiertes Wasser. Die Inkubation wird bei 36 °C über 24 h durchgeführt. Es folgt ein Selektivanreicherungsschritt in EE-Bouillon bei 36 °C ebenfalls über 24 h. Zum Nachweis wird VRBG-Agar (**V**iolet **r**ed **b**ile **g**lucose agar) verwendet (Bebrütung 36 °C/24 h). *E. sakazakii* bildet auf diesem *Enterobacteriaceae*-Selektivagar purpurfarbene Kolonien mit purpurfarbenem Gallensäurenpräzipitathof. Typische Kolonien werden zum Nachweis der Gelbpigmentierung auf TSA (**T**rypton **S**oja **A**gar) ausgestrichen und bei 25 °C über 48-72 h bebrütet. Nur gelbe Kolonien werden mit API 20 E bestätigt. Das Verfahren hat mehrere Nachteile. Unter anderem sind sowohl das flüssige als auch das feste Selektivmedium nicht spezifisch für *E. sakazakii*, sondern allgemein auf die Isolierung von *Enterobacteriaceae* ausgerichtet. Die Auswahl verdächtiger Kolonien von VRBG-Agar ist daher willkürlich. Auch die Bestätigung nur gelbpigmentierter Kolonien erscheint fragwürdig, da, wie oben bereits erwähnt, ein gewisser Prozentsatz der Stämme unpigmentierte Kolonien bildet.

ISO/TS 22964 | IDF/RM 210 (2006):

Nach der Voranreicherung der Probe in gepuffertem Peptonwasser bei 37 °C über 18 h wird in mLST-Bouillon mit Vancomycinzusatz bei 45 °C über 24 h selektiv angereichert. Die Isolierung erfolgt durch Ausstrich auf ESIA-Agar, der 24 h bei 44 °C bebrütet wird. *E. sakazakii* bildet auf diesem Selektivagar aufgrund der alpha-Glucosidase-Aktivität charakteristische blau-grüne Kolonien. Typische Kolonien werden zum Nachweis der Gelbpigmentierung auf TSA übertragen und bei 25 °C über 46 h bebrütet. Nur gelbe Kolonien werden biochemisch bestätigt. Wenn dieses Verfahren auch gegenüber der FDA-Methode insbesondere durch die Verwendung spezifischer Selektivnährböden erhebliche Vorteile aufweist, so ist es sicherlich noch nicht als optimal zu bezeichnen (z. B. Zusammensetzung und Bebrütungstemperatur der mLST-Bouillon, Identifizierung nur gelbpigmentierter Kolonien). Dessen war sich auch die ISO/IDF-Arbeitsgruppe, in der das Verfahren entwickelt worden war, bewußt und begann unmittelbar nach der Veröffentlichung dieser Technischen Spezifikation mit den Arbeiten zur Optimierung der Medien und zur Ausdehnung des Anwendungsbereiches auch auf andere Lebensmittel (Becker, 2007; pers. Mitteilung).

2.2.2 Grundlagen molekularbiologischer Verfahren zum Nachweis von *Enterobacter sakazakii*

2.2.2.1 Polymerase Chain Reaktion (PCR)

Mit der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR), einer in-vitro-Technik, die vom Nobelpreisträger Kary Mullis entdeckt wurde, kann man DNA-Abschnitte, die von zwei bekannten DNA-Sequenzen eingerahmt sind, vervielfältigen. Mit Hilfe der PCR lassen sich winzige Mengen, also auch ein einziges bakterielles oder virales Genom nachweisen. Es kann virale und bakterielle DNA in unterschiedlichen biologischen Materialien ermittelt werden (Streuer, 1996), was die Diagnostik im bakteriologischen und virologischen Bereich erheblich vereinfacht hat. Neben der Blockcycler-PCR mit anschließender Gelelektrophorese werden heute vor allem in der Routinediagnostik verstärkt real-time-PCR-Methoden eingesetzt.

2.2.2.2 Real-time-PCR

Die real-time-PCR ermöglicht die Messung der entstehenden PCR-Produkte mit Hilfe von fluoreszierenden Farbstoffen während des PCR-Laufs (Sagner et al., 1999). Es werden verschiedene Methoden unterschieden:

Die Zugabe eines *interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes*, wie SYBR Green: Dieser Farbstoff interkaliert in die doppelsträngige DNA, wodurch die Fluoreszenz des Farbstoffes ansteigt. So kommt es bei Fortschreiten der PCR zu einem Anstieg der Fluoreszenz (De Silva et al., 1998).

Die Verwendung von *fluoreszenzmarkierten Sonden*: Dabei werden zwei genspezifische Primer verwendet. Als Sonden kommen Hybridisierungssonden oder Hydrolysesonden in Frage:

Das TaqMan-Prinzip (z. B. Mx3000P, Stratagene) benutzt eine doppelt fluoreszenzmarkierte *Hydrolysesonde*. Diese besitzt am 5'-Ende einen markierten Reporter (Donor-Fluorochrom) und am 3'-Ende einen Quencher, der entweder aus einem Farbstoff oder einem Dark Quencher (Akzeptor-Fluorochrom) besteht. Das Donor-Fluorochrom wird durch das Licht einer Halogenlampe angeregt und die entstehende Extinktionsenergie an das Akzeptor-Fluorochrom abgegeben. Solange Reporter und Quencher in einem definierten Abstand zueinander liegen,

wird die Fluoreszenz des angeregten Reporters vom Quencher „verschluckt“. Die Taq DNA Polymerase, die eine 5´-3´ Exonucleaseaktivität besitzt, setzt während der Synthese des Gegenstranges die Sonde frei und zerstört diese schließlich. Dadurch verschwindet die räumliche Nähe zwischen den beiden Fluorochromen, der Reporter gibt die Extinktionsenergie ab und der dadurch entstehende Fluoreszenzanstieg kann durch das angeschlossene Gerät detektiert werden (Busch, 2006; persönliche Mitteilung).

Bei Verwendung der *Hybridisierungssonden* (z. B. LightCycler, Roche Diagnostics) enthält der PCR-Ansatz zwei fluoreszenzmarkierte Sonden, wobei die eine das Akzeptor-Fluorochrom am 3`-Ende, die andere das Donor-Fluorochrom am 5´-Ende trägt (De Silva et al., 1998; Sagner et al., 1999).

2.2.3 Molekularbiologische Verfahren zum Nachweis und zur Typisierung von *Enterobacter sakazakii*

Im Schrifttum wurden verschiedene molekularbiologische Verfahren zum Nachweis und zur Typisierung von *E. sakazakii* beschrieben (Tab.4).

Tabelle 4: Molekularbiologische Verfahren zum Nachweis und zur Typisierung von *E. sakazakii*

Methoden	Autoren
Real-time-PCR	Heuvelink et al., 2004 Liu et al., 2006
PFGE (Pulsfeld-Gel-Elektrophorese)	Nazarowec-White und Farber, 1999
RAPD (Random amplification of polymorphic DNA)	Nazarowec-White und Farber, 1999
Plasmid-Typisierung	Clark et al., 1990
Restriktionsenzym-Analyse chromosomaler DNA	Clark et al., 1990
Ribotypisierung	Iversen et al., 2007
AFLP (Amplified fragment length polymorphisms)	Iversen et al., 2007

DNA-DNA Hybridisierung	Iversen et al., 2007
Gensequenzierung	Iversen et al., 2007

3 EIGENE UNTERSUCHUNGEN: MATERIAL UND METHODEN

3.1 Material

3.1.1 Allgemeine Materialien

-Verpackung des Probenmaterials:

- Polyesterol-Runddosen glasklar; aufgedeckt, 6-stückweise verpackt, strahlensterilisiert, 150 cm³, Art. Nr. 967101 (Boll, Deutschland)

-Pipetten:

- eppendorf Reference 10 µl (eppendorf, Deutschland)
- eppendorf Reference 100 µl (eppendorf, Deutschland)
- eppendorf Reference 1000 µl (eppendorf, Deutschland)

-Pipettenspitzen (eppendorf, Deutschland)

- ep T.I.P.S. filter PCR clean, Nr.0030 007.040, 10 µl
- ep T.I.P.S. filter PCR clean, Nr.0030 007.067, 100 µl
- ep T.I.P.S. filter PCR clean, Nr.0030 007.105, 1000 µl

-PCR-Zubehör:

- eppendorf safe-lock-tubes, 1,5 ml, 1000 St., Nr. 0030 121.848 (eppendorf, Deutschland)
- eppendorf safe-lock-tubes, 2 ml, 1000 St., Nr. 0030 121.848 (eppendorf, Deutschland)

-Handschuhe:

- SAFESKIN SATIN PLUS powder-free latex exam gloves, Size M, REF SP2330E (Kimberly-Clark, USA)

3.1.2 Materialien und Geräte für die Isolierung und biochemische Differenzierung von *Enterobacter sakazakii*

3.1.2.1 Materialien für die Isolierung

3.1.2.1.1 Flüssige Nährböden

- Gepuffertes Peptonwasser, Art. Nr. 1.07228 (Merck, Deutschland)
- Modified laurylsulfate broth with Vancomycin, Art. Nr. AEB 110549 (AES Laboratoire, Frankreich)
- *Enterobacter sakazakii* Selective Broth (ESSB), Art. Nr. AEB 611448 (AES Laboratoire, Frankreich)
- Laurylsulfat-Tryptose-Bouillon, Art. Nr. 1.10266 (Merck, Deutschland)

3.1.2.1.2 Feste Nährböden

- *Enterobacter sakazakii* isolation Agar (ESIA), Art. Nr. AEB 520010 (AES Laboratoire, Frankreich)
- Trypton-Soja-Agar (CASO), Art. Nr. 1.05458 (Merck, Deutschland)
- Blut-Agar-Basis, Art. Nr. CM 55 (Oxoid, Deutschland), mit Zusatz von 10 % defibriniertem Schafblut, Art. Nr. FSR 1055 (Oxoid, Deutschland)

3.1.2.1.3 Reagenzien

- Verdünnungsflüssigkeit: Ringer-Lösung ¼-stark, Art. Nr. 1.15525 (Merck, Deutschland)
- Oxidase-Teststäbchen, Art. Nr. 1.13300 (Merck, Deutschland)

3.1.2.2 Materialien für die biochemische Differenzierung

- API 20 E, Art. Nr. 20 100 (bioMérieux, Frankreich)
- Phoenix 100 IC (BD Biosciences, USA)

3.1.2.3 Geräte

- Brutschrank, 44 °C ± 1 °C (Mettler, Deutschland)
- Brutschrank, 37 °C ± 1 °C (Mettler, Deutschland)
- Brutschrank, 25 °C ± 1 °C (Mettler, Deutschland)
- Schüttler Heidolph Unimax 2010 (Heidolph, Deutschland)
- Gefrierschrank Profi Line (Liebherr, Deutschland)
- Wasserbad, 30 °C ± 1 °C (Mettler, Deutschland)

3.1.3 Materialien und Geräte für den real-time-PCR-Nachweis

3.1.3.1 Materialien bei Verwendung des Thermocyclers Mx3000P

- Primer und Sonden (MWG, Deutschland), Sequenzen siehe unter 3.2.1.2 und 3.2.1.3
- Brilliant Multiplex QPCR Master-Mix, Cat. No. 600553 (Stratagene, USA)
- MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode, Part. No. 4306737 (Applied Biosystems, USA)
- MicroAmp Optical Adhesive Covers, Part. No. 4306737 (Applied Biosystems, USA)
- pUC19-Plasmid (Fermentas, Deutschland)
- TRIS-Puffer, Cat. No. T-9285 (SIGMA-ALDRICH CHEMIE, Deutschland)
- AmpuWA, Wasser, DNase frei, 2 ml (Fresenius Kabi, Deutschland)
- High Pure foodproof 1 Kit Ref. Nr. 03358089001 (Roche Diagnostics, Deutschland)

3.1.3.2 Geräte bei Verwendung des Thermocyclers Mx3000P

- Schüttler Heidolph REAX top (Heidolph, Deutschland)

- eppendorf Thermomixer comfort (eppendorf, Deutschland)
- Tischzentrifuge Mikro 22R (Hettich, Deutschland)
- Sterilbank Hera Safe (Heraeus Instruments GmbH, Deutschland)
- Kühlschrank Bosch economic cooler (Bosch, Deutschland)
- Micro 7 Tischzentrifuge (Fisher Scientific, Deutschland)
- Real-time-PCR System, Typ Mx3000P (Stratagene, USA)

3.1.3.3 Materialien bei Verwendung des Thermocyclers LightCycler 2.0

- *Enterobacteriaceae* plus *E. sakazakii* Detection System-LightCycler 2.0 PCR, Order No. PPPS 290 03 (BIOTECON Diagnostics, Deutschland) (Enthalten: *Enterobacteriaceae* plus *E. sakazakii* Master Mix, Internal Control, Positive Control, PCR-grade Water)
- Taq Polymerase DNA free, Cat. No. DFT 030 01-03 (BIOTECON Diagnostics, Deutschland)
- LightCycler Capillaries, Cat. No. 11 909 339 001 (Roche Diagnostics, Deutschland)
- StarPrep One Kit, Cat. No. SPK 100 10 (BIOTECON Diagnostics, Deutschland)
- Reagent D, Cat. No. DCR 900 09 (BIOTECON Diagnostics, Deutschland)
- PCR-Mix: *Enterobacteriaceae* plus *E. sakazakii* Master Mix: 13 µl
 Taq Polymerase DNA free 1 µl
 Enterobacteriaceae plus *E. sakazakii*, internal Control 1 µl
 Proben-DNA 5 µl

3.1.3.4 Geräte bei Verwendung des Thermocyclers LightCycler 2.0

- LightCycler 2.0 Instrument, Cat. No. 03531414201 (Roche Diagnostics, Deutschland)
- LightCycler Carousel Centrifuge, Cat. No. 03709582001 (Roche Diagnostics, Deutschland)
- Weitere verwendete Geräte (ausgenommen real-time-PCR System, Typ Mx3000P, Stratagene, USA) unter 3.1.3.2

3.1.4 Untersuchungsmaterial

Insgesamt wurden 1253 Speiseeisproben (Plan- und Beschwerdeproben des LGL) untersucht. Dabei handelte es sich um 1167 handwerklich hergestellte Eisproben und 86 Industrieeisproben. Das Untersuchungsmaterial stammte aus 567 unterschiedlichen Produktionsstätten, darunter 513 Verkaufsstellen, die Speiseeis selbst handwerklich herstellten. Im Einzelnen handelte es sich um 1091 Milcheis-, 97 Eiscreme-, 55 Fruchteis-, fünf Wassereis- und drei Cremeeisproben, sowie je eine Sahneeis- und Sorbetprobe. Eine detaillierte Aufschlüsselung nach Sorten findet sich in Tab. 3 im Anhang.

3.2 Methoden

3.2.1 Voruntersuchungen

3.2.1.1 Mikrobiologische Voruntersuchungen

3.2.1.1.1 Voruntersuchungen an Reinkulturen

Da am Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL) routinemäßige Untersuchungen auf *E. sakazakii* nur bei Säuglingsanfangsnahrung auf Milchpulverbasis und nicht bei Speiseeis durchgeführt werden und deshalb nicht auf ein für Speiseeis etabliertes System zurückgegriffen werden konnte, wurden vor Beginn der Untersuchungen mikrobiologische und molekularbiologische Voruntersuchungen zur Anwendbarkeit dieser Methoden bei der Untersuchung derartiger Lebensmittel durchgeführt. Eventuelle, auf die Beschaffenheit des Probenmaterials zurückzuführende Besonderheiten sollten so bei den Hauptuntersuchungen Berücksichtigung finden.

Zunächst sollte die Eignung von GPW als Anreicherungsmedium für *E. sakazakii* geprüft werden. Dieses nichtselektive Medium ermöglicht den gleichzeitigen Nachweis auch anderer Pathogene, insbesondere von *Salmonella* spp. Die Leistungsfähigkeit von GPW wurde mit der *E. sakazakii*-Selective-Broth (ESSB) wie folgt verglichen.

Zur Keimzählung in GPW wurden von einer Blut-Agarplatte Koloniematerial einer *E. sakazakii*-Kultur (ATCC 51329) in 225 ml GPW suspendiert und über 18 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde eine dezimale Verdünnungsreihe in je 9 ml Verdünnungsflüssigkeit ($\frac{1}{4}$ -starke Ringerlösung) angelegt. Aus jeder Verdünnungsstufe wurde im Doppelansatz 0,1 ml auf *E. sakazakii*-isolation-Agar (ESIA) ausgespatelt und über 24 h bei 44 °C bebrütet. Zum Vergleich wurden nichtselektive Blut-Agarplatten in der gleichen Weise beimpft und über 24 h bei 37 °C inkubiert. Die Keimzahl wurde entsprechend der Methode der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB L 01.00-57 (1995) ermittelt. Diese Untersuchung wurde insgesamt fünfmal wiederholt.

Mit Ausnahme der nach den Angaben des Herstellers auf 24 h verlängerten Bebrütungsdauer von ESSB erfolgten die Untersuchungen zur Leistungsfähigkeit dieses Mediums wie für GPW beschrieben.

3.2.1.1.2 Voruntersuchungen an künstlich kontaminierten Speiseeisproben

Vanilleeiscreme aus industrieller Herstellung wurde mit unterschiedlichen Keimzahlen von *E. sakazakii* beimpft. Um diese Inokula zu erhalten, wurde der ATCC-Stamm 51329 in GPW über 18 h bei 37 °C bebrütet und anschließend eine dezimale Verdünnungsreihe angelegt. Zur künstlichen Kontamination des Speiseeises wurde aus im Hinblick auf die Keimzahl geeigneten Verdünnungsstufen 1 ml Inokulum mit 25 g Eis und 225 ml GPW in einem Erlenmeyerkolben vermischt und über 18 h bei 37 °C inkubiert. Eine unbeimpfte Eisprobe wurde in gleicher Weise behandelt und diente als Kontrolle. Die Keimzahlen der verwendeten Inokula wurden mit Hilfe des oben beschriebenen Spatelverfahrens auf ESIA-Agar ermittelt, wobei die Bebrütung über 24 h bei 44 °C erfolgte.

Da bei handwerklich gefertigtem Eis aus Eisdieleln mit einer stärkeren Begleitflora zu rechnen ist, wurden neun derartige Sorten (Tab. 9) mit *E. sakazakii* in Zahlen von jeweils etwa 100/25 g wie oben beschrieben beimpft, bebrütet und untersucht. Eine unbeimpfte Kontrolle wurde mitgeführt. Jeweils 1 ml der erhaltenen Anreicherungen wurde für die PCR-Versuche weiterverwendet.

3.2.1.2 PCR-Voruntersuchungen: PCR nach Heuvelink et al. (2004)

Für den real-time-PCR-Nachweis nach dem TaqMan-Prinzip wurde die Leistungsfähigkeit des Verfahrens von Heuvelink et al. (2004) für den Einsatz in der Speiseeisuntersuchung geprüft. Als interne Amplifikationskontrolle entsprechend der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB L 00.00-45 (2006) konnte auf ein hauseigenes (LGL) System auf Basis des pUC19-Plasmides der Firma Fermentas zurückgegriffen werden (Fricker et al., 2007; Messelhäuser et al., 2007). Für den real-time-PCR-Nachweis wurden insgesamt vier Primer und zwei Sonden eingesetzt (Tab. 5).

Tabelle 5: Primer und Sonden des Duplex-real-time-PCR-Systems nach Heuvelink et al. (2004)

Primer/Sonde	Sequenz (5` - 3`)	Acc.-number
Entsa-F 1	CCA AAG CTT CCG CAG TGA A (19 bp)	L01755
Entsa-R 1	CAA TAT CCC CTG AGG AAT TAG TAC AGA (27 bp)	L01755
Entsa-S 1	FAM-CGT CAC GCG AAG AAA CTG GCT CG-TAMRA (23 bp)	L01755
IPC-F	TGT GAA ATA CCG CAC AGA TG (20 bp)	L09137
IPC-R	AGC TGG CGT AAT AGC GAA G (19 bp)	L09137
IPC-S	HEX-GAG AAA ATA CCG CAT CAG GC-TAMRA (20 bp)	L09137

Der Master-Mix für diesen real-time-PCR-Ansatz enthielt folgende Komponenten je Probe:

Brilliant Multiplex QPCR Master-Mix (Stratagene)	12,5 µl
Primer (insgesamt 4, je 500 nM)	1,25 µl
Sonden (insgesamt 2, je 200 nM)	0,5 µl
H ₂ O für PCR-Zwecke	0,125 µl
Referenzfarbstoff ROX	0,375 µl

Je Probe wurden 5 µl der aufbereiteten DNA als Template, 1 µl des pUC19-Plasmides (Fermentas, Konzentration 1 fg/µl) für die interne Amplifikationskontrolle und 19 µl

Master-Mix zu einem Endvolumen von 25 µl pipettiert und die real-time-PCR in dem real-time-Cycler Mx3000P (Stratagene, USA) durchgeführt, wobei die beiden folgenden Temperatur-Zeit-Profile getestet wurden:

Temperatur-Zeit-Profil 1 (nach Heuvelink et al., 2004):

Initiale Denaturierung:		50 °C	2 min
		95 °C	10 min
40 Zyklen:	Denaturierung	95 °C	15 s
	Anlagerung/Synthese	60 °C	1 min

Temperatur-Zeit-Profil 2 (eigene Untersuchungen):

Initiale Denaturierung:		95 °C	2 min
45 Zyklen:	Denaturierung	95 °C	10 s
	Anlagerung/Synthese	55 °C	30 s

In der vorliegenden Arbeit wurden als Kriterien für die Leistungsfähigkeit der PCR-Verfahren die Exklusivität und die Inklusivität sowie die Nachweisgrenze herangezogen. Diese Parameter werden in Anlehnung an DIN EN ISO 16140 (2003) verwendet, obwohl nicht alle dort im Zusammenhang mit Verfahrenvergleichsuntersuchungen vorgegebenen Bedingungen erfüllt sind. Demnach wird unter Exklusivität das Nichtvorhandensein störender Einflüsse eines relevanten Spektrums von "Nicht-Zielkeimen" beim geprüften Verfahren und unter Inklusivität seine Eignung, den Zielkeim in einem breiten Spektrum von Stämmen nachzuweisen, verstanden. Als Nachweisgrenze wird die kleinste Anzahl anzüchtbarer Mikroorganismen angesehen, die in der Probe nachgewiesen werden kann.

Sowohl zur Bestimmung der Exklusivität als auch zur Bestimmung der Inklusivität wurde Koloniematerial der unten genannten Stämme in 0,1 x TRIS-Puffer gegeben, zur DNA-Extraktion 10 min bei 99 °C gekocht und in die PCR eingesetzt. Zusätzlich wurden für die Bestimmung der Inklusivität 10⁸ KbE der *E. sakazakii*-Stämme in 225 ml GPW und 25 g Vanilleeiscreme übergeführt. Hiervon wurde 1 ml nach Probenvorbereitung mit drei Reinigungsschritten und thermischer DNA-Extraktion (10 min bei 99 °C) für die PCR verwendet. Bezüglich der Exklusivität wurden insgesamt 48 Nicht-*E. sakazakii*-Isolate (DSM-, ATCC-Stämme sowie Feldisolate) geprüft (Tab. 6). Dabei wurde entweder auf

Species zurückgegriffen, die bei lebensmittelbedingten Erkrankungen eine Rolle spielen können (u. a. *Salmonella* spp.) oder auf Bakteriengruppen, die nahe mit *E. sakazakii* verwandt sind und/oder ähnliche Vermehrungsbedingungen benötigen (andere *Enterobacteriaceae*).

Zur Abschätzung der Inklusivität wurden der *E. sakazakii* ATCC-Stamm 51329 sowie drei Feldstämme von *E. sakazakii* getestet.

Tabelle 6: In die Untersuchungen zur Leistungsfähigkeit der PCR-Verfahren einbezogene Nicht-*E. sakazakii*-Isolate ("Nicht-Zielkeime")

Species	Anzahl der Stämme (n = 48)
<i>Salmonella</i> Enteritidis	4
<i>Salmonella</i> Typhimurium	3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4
<i>Escherichia coli</i>	11
<i>Escherichia vulneris</i>	1
<i>Citrobacter freundii</i>	5
<i>Enterobacter agglomerans</i>	2
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6
<i>Serratia marcescens</i>	1
<i>Serratia rubidaea</i>	2
<i>Proteus vulgaris</i>	2
<i>Enterobacter cloacae</i>	7

Zur Bestimmung der Nachweisgrenze des real-time-PCR-Systems nach Heuvelink et al. (2004) wurde Koloniematerial von *E. sakazakii* (ATCC 51329) in GPW suspendiert und über 18 h bei 37 °C inkubiert. Aus dieser Kultur wurde eine dezimale Verdünnungsreihe angelegt, die sowohl in die PCR eingesetzt wurde, als auch der künstlichen Kontamination von Speiseeis diente. Die Keimzahl der unverdünnten Kultur wurde mittels Spatelverfahren auf ESIA-Agar ermittelt (3.2.1.1.1). Aus dem erhaltenen Wert wurden rechnerisch die Keimzahlen der folgenden dezimalen Verdünnungsstufen ermittelt. Diese Untersuchung wurde insgesamt fünfmal wiederholt. Vor dem Einsatz in die PCR wurde Material aus der Kultur und aus den Verdünnungsstufen zwei unterschiedlichen Methoden der Nukleinsäureextraktion unterzogen:

- Methode mit einem Reinigungsschritt:

Ein ml jeder Suspension wurde 5 min bei 10.000 x g und 20 °C (zum besseren Entfernen der Fettschicht) zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und verworfen. Danach wurde das verbliebene Pellet in 300 µl 0,1 x TRIS-Puffer resuspendiert. Nach diesem Reinigungsschritt wurde die Zellsuspension zum thermischen Zellaufschluss über 10 min bei 99 °C erhitzt und bei 10.000 x g über 3 min bei 4 °C zentrifugiert. Vom Überstand wurden 150 µl in ein neues Gefäß übergeführt und für die PCR weiterverwendet.

- Methode mit drei Reinigungsschritten:

Das Zentrifugieren, Verwerfen des Überstandes und Resuspendieren mit 300 µl 0,1 x TRIS-Puffer wurde insgesamt dreimal durchgeführt. Dieses mehrfache Reinigen sollte der besseren Entfernung eventueller PCR-Inhibitoren aus der Keimsuspension dienen. Das weitere Vorgehen erfolgte wie bei der Methode mit einem Reinigungsschritt.

Der Vergleich der beiden o. g. Probenvorbereitungsmethoden wurde ebenso mit künstlich kontaminierten Eisproben (Vanilleeiscreme industrieller Herstellung) durchgeführt.

3.2.1.3 PCR-Voruntersuchungen: PCR nach Liu et al. (2006)

Für den Nachweis von *E. sakazakii* mittels PCR wurde zusätzlich das Verfahren von Liu et al. (2006) für den Einsatz in der Speiseeisdiagnostik getestet. Als interne Amplifikationskontrolle diente das pUC19-Plasmid (Fermentas) mit den entsprechenden Primern und Sonden. Für den PCR-Nachweis wurden vier Primer und zwei Sonden verwendet (Tab. 7).

Tabelle 7: Primer und Sonden für das Duplex-real-time-PCR-System nach Liu et al. (2006)

Primer/Sonde	Sequenz (5` - 3`)	Acc.-number
Entsa-F 2	CCG GAA CAA GCT GAA AAT TGA (21 bp)	AY748357
Entsa-R 2	TCT TCG TGC TGC GAG TTT G (19 bp)	AY748357
Entsa-S 2	FAM-ACT CTG ACA CAC CGC GCA TTC CTG-TAMRA (24 bp)	AY748357
IPC-F	TGT GAA ATA CCG CAC AGA TG (20 bp)	L09137
IPC-R	AGC TGG CGT AAT AGC GAA G (19 bp)	L09137
IPC-S	HEX-GAG AAA ATA CCG CAT CAG GC-TAMRA (20 bp)	L09137

Der Master-Mix setzte sich wie unter 3.2.1.2 beschrieben zusammen. Der real-time-Cycler Mx3000P (Stratagene, USA) kam mit folgendem modifiziertem Temperatur-Zeit-Profil zum Einsatz:

Initiale Denaturierung:		95 °C	10 min
45 Zyklen:	Denaturierung	95 °C	15 s
	Anlagerung/Synthese	55 °C	1 min

Bei der Extraktion konnte in Abweichung von 3.2.1.2 auf die Durchführung zweier weiterer Reinigungsschritte verzichtet werden.

Zur Überprüfung der Exklusivität (3.2.1.2) wurden die in Tab. 6 genannten Mikroorganismen verwendet. Zur Ermittlung der Inklusivität (3.2.1.2) wurden 40 Feldisolat von *E. sakazakii* sowie der ATCC-Stamm 51329 getestet (Biochemische Bestätigung durch API 20 E, BioMérieux).

Die Bestimmung der Nachweisgrenze (3.2.1.2) des PCR-Verfahrens nach Liu et al. (2006) erfolgte wie unter 3.2.1.2 beschrieben.

3.2.2 Hauptuntersuchungen

3.2.2.1 Entnahme und Lagerung der Speiseeisproben

Die im Zeitraum April bis Oktober 2006 untersuchten Eisproben (3.1.4) wurden von der Lebensmittelüberwachung im südbayerischen Raum bei insgesamt 581 Eisverkaufsstellen gezogen. Hierbei handelte es sich um 527 Selbsthersteller, einschließlich Softeisanbieter, neun Fremdhersteller, die Eisdielen belieferten, neun Hersteller von so genanntem Bauernhofeis und 36 Betriebe, z. B. Gaststätten, die Eis aus Industriegroßgebinden offen abgaben. Bei Direktvermarktern wurde das Eis mit dem Portionierer, der auch beim Verkauf verwendet wurde, entnommen. Dieser wurde nur nach dem Verfahren der Verkaufsstelle behandelt, z. B. durch Eintauchen in stehendes oder fließendes Portioniererwasser.

Die Proben wurden in Kühlboxen mit Trockeneis oder Kühlelementen angeliefert. Die Temperatur der Eisproben betrug bei Ankunft im Labor höchstens -5 °C, anschließend wurden die Proben bis zum Untersuchungsbeginn bei -18 °C gelagert.

3.2.2.2 Kultureller Nachweis

3.2.2.2.1 Nachweis von *Enterobacter sakazakii* nach einer Anreicherung in gepuffertem Peptonwasser

Zur Probenvorbereitung (n = 1253) wurde etwa die Hälfte jeder Eisprobe unter aseptischen Kautelen in ein Glasgefäß übergeführt, im Wasserbad bei 30 ° ± 1 °C innerhalb von 30 min geschmolzen und gut durchmischt. Der Rest der Probe wurde für eine eventuelle Nachuntersuchung bei -18 °C gelagert. Jeweils fünf Eisproben zu je 25 g wurden als Sammelprobe in der neunfachen Menge GPW über 18 h bei 37 °C bebrütet. Nach der Entnahme von 1 ml für die PCR wurden 10 µl der Anreicherung auf ESIA-Selektivagar ausgestrichen und unter aeroben Bedingungen über 24 h bei 44 °C bebrütet. Verdächtige, d. h. blau-grüne Kolonien wurden auf TSA-Agar (25 °C/ 48 h) und Blut-Agar (37 °C/ 24 h) subkultiviert. Anschließend wurde überprüft, ob sich auf TSA-Agar gelb pigmentierte Kolonien gebildet hatten (Abb. 1). Die Bestätigung erfolgte mittels API 20 E und Phoenix 100 IC mit Koloniematerial von Blut-Agarplatten. Im Fall

eines positiven Befundes wurden die fünf zu einer Sammelprobe vereinigten Proben einzeln nachuntersucht (25 g Speiseeis/225 ml GPW). Ein Schema des Untersuchungsgangs findet sich in Abb. 1.

3.2.2.2.2 Nachweis von *Enterobacter sakazakii* nach ISO/TS 22964 | IDF/RM 210 (2006)

Siebenundsiebzig der 1253 Proben wurden nach der Probenvorbereitung (3.2.2.2.1) zusätzlich mit dem Verfahren nach ISO/TS 22964 | IDF/RM 210 (2006) untersucht. Dabei wurden 25 g Probenmaterial in 225 ml GPW über 18 h bei 37 °C vorangereicht. Anschließend wurden 0,1 ml der Kultur in 10 ml mLST-Bouillon übergeführt und weitere 24 h bei 44 °C bebrütet. Von dieser Selektivanreicherung wurden 10 µl auf ESIA-Agar ausgestrichen und 24 h bei 44 °C inkubiert. Der weitere Untersuchungsgang erfolgte wie unter 3.2.2.2.1 beschrieben. Ein ml der mLST-Bouillon wurde für die PCR weiterverwendet (Abb. 1).

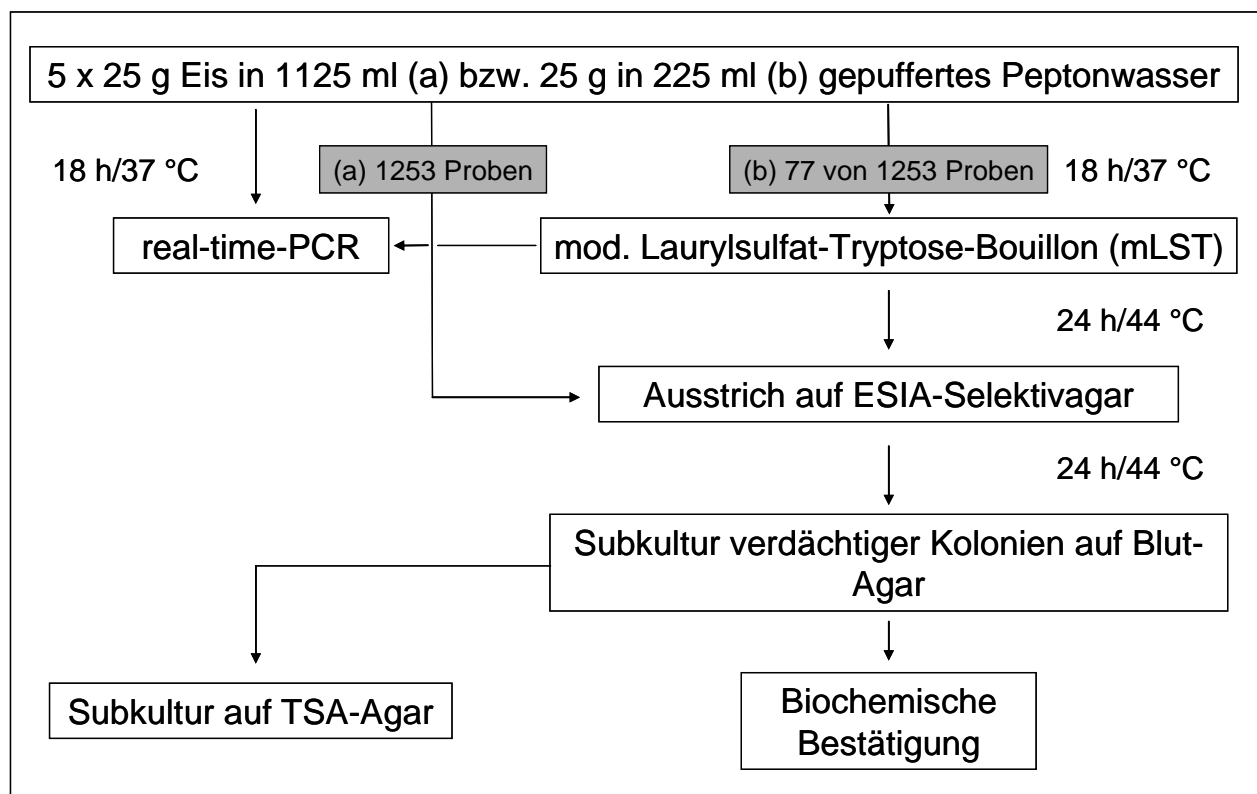


Abbildung 1: Nachweis von *E. sakazakii* in Speiseeis

3.2.2.2.3 Quantifizierung von *Enterobacter sakazakii*

Von jeder der positiven Proben wurden 10 g zu 90 ml Verdünnungslösung (Ringerlösung ¼-stark) hinzugefügt und gründlich gemischt. Drei Kulturröhrchen, die jeweils 10 ml GPW in doppelter Konzentration enthielten, wurden mit je 10 ml der verdünnten Probe beimpft (Ansatz von 1 g). Von sechs weiteren Kulturröhrchen mit je 10 ml GPW (einfach konzentriert) wurden drei mit je 1 ml der verdünnten Probe, die anderen drei Kulturröhrchen mit je 0,1 ml der Verdünnung beimpft. Die Bebrütung erfolgte über 18 h bei 37 °C. Anschließend wurde aus jedem Kulturröhrchen 0,1 ml auf jeweils 10 ml mLST überimpft und über 24 h bei 44 °C bebrütet. Von dieser Selektivanreicherung wurden 10 µl auf ESIA-Agar ausgestrichen und 24 h bei 44 °C inkubiert. Nach Bildung der Indexziffer aus positiven Befunden auf ESIA-Agar wurde die Keimzahl für *E. sakazakii*/g nach einer MPN-Tabelle berechnet.

3.2.2.2.4 Nachweis coliformer Keime in Laurylsulfat-Tryptose-Nährmedium

Um festzustellen, ob bei den Eisproben ein Zusammenhang zwischen dem Gehalt an coliformen Keimen und dem Vorkommen von *E. sakazakii* besteht, wurden die Proben mit einem MPN-Verfahren auf coliforme Keime untersucht [Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB L 01.00-2 (1991)]. Von drei Verdünnungsstufen (entsprechend 0,1 g; 0,01 g; 0,001 g Probenmaterial) wurden jeweils drei Parallelröhrchen angelegt und über 48 h bei 30 °C bebrütet. Nach der Beurteilung der Gasbildung im Durham-Röhrchen wurde die Anzahl coliformer Keime anhand der MPN-Tabelle ermittelt.

3.2.2.3 Molekularbiologischer Nachweis von *Enterobacter sakazakii*

3.2.2.3.1 Real-time-PCR nach Heuvelink et al. (2004)

Für den real-time-PCR-Nachweis von *E. sakazakii* wurde 1 ml aus jeder Voranreicherung (GPW) sowie bei 77 Proben (3.2.2.2.2) zusätzlich 1 ml aus jeder Selektivanreicherung (mLST) weiterverarbeitet. Alle Untersuchungen erfolgten im Doppelansatz. Zur Probenaufbereitung und Nukleinsäureextraktion wurde die Methode mit drei Reinigungsschritten angewandt (3.2.1.2). Bei einigen Proben, deren interne

Amplifikationskontrolle ein nicht eindeutig interpretierbares Ergebnis erbrachte, wurde eine zusätzliche DNA-Extraktion mittels eines kommerziellen Extraktionskits (High Pure foodproof 1, Roche Diagnostics) angewandt. Die real-time-PCR wurde – wie bei den Vorversuchen unter 3.2.1.2 beschrieben – nach der Methode von Heuvelink et al. (2004) mit Temperatur-Zeit-Profil 2, ergänzt durch die interne Amplifikationskontrolle (Fricker et al., 2007; Messelhäuser et al., 2007), durchgeführt.

Im Falle eines Verdachts auf Anwesenheit von *E. sakazakii* bei Sammelproben (3.2.2.2.1), entweder aufgrund positiver PCR-Ergebnisse oder verdächtiger Kolonien auf dem festen Nährmedium, wurden von den betroffenen fünf Eisproben je 25 g einzeln nachuntersucht.

3.2.2.3.2 Real-time-PCR nach Liu et al. (2006)

Für diesen real-time-PCR-Nachweis wurde, wie unter 3.2.2.3.1 beschrieben, 1 ml aus jeder Voranreicherung (GPW) und aus eventuell vorhandener Selektivanreicherung (mLST) verarbeitet. Es handelte sich hierbei um Rückstellproben der Anreicherungen, die gefroren gelagert worden waren. Zur Probenaufbereitung wurde die Methode mit einem Reinigungsschritt und anschließender DNA-Extraktion durch Erhitzen angewandt. Auch hier wurde als interne Amplifikationskontrolle auf das pUC19-Plasmid-System zurückgegriffen. Alle Untersuchungen erfolgten im Doppelansatz.

3.2.2.3.3 PCR mittels LightCycler 2.0

Die positiven Proben wurden zusätzlich mittels LightCycler-PCR-Prinzip untersucht. Hierzu wurde die DNA (aus GPW-Anreicherungen), die bereits für die PCR-Verfahren nach Heuvelink et al. (2004) und Liu et al. (2006) eingesetzt worden war, verwendet. Zum einen war dies DNA, die durch thermischen Zellaufschluss (drei Reinigungsschritte) gewonnen worden war, zum anderen zusätzlich DNA derselben Eisprobe, die mittels eines kommerziellen Extraktionskits erhalten wurde. Außerdem wurden Rückstellproben (aus GPW-Anreicherung), die gefroren gelagert worden waren, einer für den LightCycler (Roche Diagnostics) speziell entwickelten DNA-Extraktion (StarPrep One Kit, BIOTECON Diagnostics) nach Anweisung des Herstellers

unterzogen. Die PCR erfolgte mit dem unter 3.1.3.3 beschriebenen PCR-Mix und folgendem Temperatur-Zeit-Profil:

Vorinkubation:	Inkubation	37 °C	4	min
	Denaturierung	95 °C	2	min
Amplifikation:	Denaturierung	95 °C	2	s
	Anlagerung	64-60 °C	35	s
	Synthese	72 °C	20	s
Abkühlphase:		40 °C	30	s

(Vorinkubation und Abkühlphase jeweils ein Zyklus; Amplifikation 38 Zyklen)

3.2.2.3.4 *ompA*-targeted PCR

Die Isolate der *E. sakazakii*-positiven Proben wurden zur zusätzlichen Bestätigung an das Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie, Fachgebiet Lebensmittelmikrobiologie, der Universität Hohenheim eingesandt. Dort wurden diese nach der Methode von Nair und Venkitanarayanan (2006) mittels *ompA* (outer membrane protein A gene)-PCR-Verfahren unter Verwendung der Primer ESSF und ESSR getestet.

4 EIGENE UNTERSUCHUNGEN: ERGEBNISSE

4.1 Ergebnisse der mikrobiologischen Voruntersuchungen

4.1.1 Voruntersuchungen an Reinkulturen

Die Keimzahlen der Anreicherung von *E. sakazakii* (ATCC 51329) in GPW ergaben Werte zwischen $1,9 \times 10^8$ KbE/ml (Blut-Agar) und $3,0 \times 10^8$ KbE/ml (ESIA-Agar). Die Keimzahlbestimmung nach der Anreicherung in ESSB ergab einen Wert von $1,4 \times 10^8$ KbE/ml auf ESIA-Agar und $1,0 \times 10^8$ KbE/ml auf Blut-Agar.

Da sich die Keimzahlen nach der Anreicherung in ESSB ebenso wie nach der in GPW im Bereich von 10^8 KbE/ml bewegten, wurde für die Versuche mit künstlich kontaminierten Eisproben GPW als Anreicherungsmedium gewählt.

4.1.2 Voruntersuchungen an künstlich kontaminierten Speiseeisproben

4.1.2.1 Vanilleeiscreme aus industrieller Herstellung

Die Untersuchungen an künstlich mit *E. sakazakii* kontaminierter Vanilleeiscreme aus industrieller Herstellung zeigte, dass bei Beimpfungskeimzahlen von 6,6 bis 660 KbE pro 25 g Eis (dies entspricht Werten von 0,26 bis 26 KbE/g) nach einer Anreicherung über 18 h bei 37 °C Keimzahlen im Bereich von 10^6 bis 10^8 KbE/ml resultieren. Somit kann davon ausgegangen werden, dass der Nachweis von 1 KbE/g Speiseeis nach Anreicherung mit dem beschriebenen Untersuchungsverfahren möglich ist (Tab. 8).

Tabelle 8: Vermehrung von *E. sakazakii* in GPW mit künstlich kontaminierter Vanilleeiscreme (18 h/37 °C)

Beimpfungskeimzahl (KbE/25 g)	Beimpfungskeimzahl (KbE/g)	Keimzahl nach Anreicherung in GPW (KbE/ml)
660	26	$4,9 \times 10^8$
66	2,6	$1,4 \times 10^8$
6,6	0,26	$8,9 \times 10^6$

4.1.2.2 Handwerklich gefertigtes Speiseeis

Nach der Beimpfung von 25 g handwerklich gefertigtem Speiseeis (aus Eisdielen) mit jeweils etwa 100 KbE *E. sakazakii* wurden nach einer Anreicherung in GPW die in Tab. 9 aufgelisteten Keimzahlen und PCR-Ergebnisse (PCR-Verfahren nach Heuvelink et al., 2004) registriert.

Tabelle 9: Vermehrung von *E. sakazakii* (100 KbE/25 g) in GPW mit künstlich kontaminiertem Speiseeis handwerklicher Fertigung (18 h/37 °C)

Eissorte	<i>E. sakazakii</i> nach Anreicherung (KbE/ml)	Ergebnis PCR
Milcheis Nuss	$4,1 \times 10^8$	+ / +
Milcheis Tiramisu	$2,0 \times 10^7$	+ / +
Milcheis Vanille	$4,3 \times 10^7$	+ / +
Milcheis Schokolade	$3,6 \times 10^5$	+ / +

Milcheis Malaga	$1,4 \times 10^5$	+ / +
Milcheis Kokos	$4,5 \times 10^4$	+ / +
Fruchteis Holunder	$3,5 \times 10^7$	+ / +
Fruchteis Joghurt-Mandarine	<i>E. sakazakii</i> nicht nachweisbar Begleitflora +++	+ / +
Fruchteis Sauerkirsch	<i>E. sakazakii</i> nicht nachweisbar Begleitflora +++	+ / +

+++ : starkes Keimwachstum

+ / + : positiv im Doppelansatz

Bei Milcheis Nuss wurde eine Keimzahl von 10^8 KbE/ml erreicht, bei den Milcheisorten Tiramisu und Vanille sowie bei Fruchteis Holunder ergab sich der Wert von 10^7 KbE/ml. Werte von 10^5 KbE/ml wurden bei Milcheis Malaga und Milcheis Schokolade gefunden, bei Milcheis Kokos ergab sich ein Keimzahlwert von 10^4 KbE/ml. Bei zwei Fruchteisproben (Joghurt-Mandarine und Sauerkirsch) befanden sich keine typischen Kolonien auf dem ESIA-Agar. Das Wachstum von Begleitflora war hingegen wesentlich ausgeprägter als bei den anderen Speiseeisproben. Bei einer weiterführenden Untersuchung mittels PCR war bei allen neun Eisproben der Nachweis von *E. sakazakii* positiv (Tab. 9).

4.2 Ergebnisse der PCR-Voruntersuchungen: PCR nach Heuvelink et al. (2004)

Bezüglich der Prüfung der Exklusivität (GPW) ergaben sich bei Verwendung des Temperatur-Zeit-Profiles 1 (3.2.1.2) mit *Salmonella* Enteritidis und Typhimurium sowie *Escherichia coli* (Tab. 6) falschpositive Ergebnisse. Bei Verwendung des Temperatur-Zeit-Profiles 2 (3.2.1.2) lag die Exklusivität bei 100 %. Letzteres galt auch für die orientierend mit vier *E. sakazakii*-Isolaten geprüfte Inklusivität (GPW).

Zunächst wurde die Nachweisgrenze der PCR nach Anreicherung in GPW und einer DNA-Extraktion mit nur einem Reinigungsschritt ermittelt (3.2.1.2). Hierbei lag die Grenze bei einer Keimzahl von $2,8 \times 10^7$ KbE/ml (positiv im Doppelansatz). Bei $2,8 \times 10^5$ KbE/ml und $2,8 \times 10^2$ KbE/ml waren im Doppelansatz jeweils eine Probe positiv und eine Probe negativ (Tab. 10).

Wurde die PCR nach einer DNA-Extraktion mit drei Reinigungsschritten (3.2.1.2) durchgeführt, konnte die Nachweisgrenze auf 2,8 KbE/ml (letzter noch positiver Doppelansatz) gesenkt werden (Tab. 11).

Tabelle 10: PCR-Nachweisgrenze in KbE/ml nach Anreicherung von *E. sakazakii* in GPW (ein Reinigungsschritt bei der DNA-Extraktion)

Verdünnungsstufe	<i>E. sakazakii</i> (KbE/ml)	Ergebnis PCR
10 ⁰	2,8 x 10 ⁸	+ / +
10 ⁻¹	2,8 x 10 ⁷	+ / +
10 ⁻²	2,8 x 10 ⁶	- / -
10 ⁻³	2,8 x 10 ⁵	+ / -
10 ⁻⁴	2,8 x 10 ⁴	- / -
10 ⁻⁵	2,8 x 10 ³	- / -
10 ⁻⁶	2,8 x 10 ²	+ / -
10 ⁻⁷	2,8 x 10	- / -
10 ⁻⁸	2,8	- / -

+ / +: positiv im Doppelansatz

+ / -: Eine Probe positiv, eine Probe negativ im Doppelansatz

- / -: negativ im Doppelansatz

Tabelle 11: PCR-Nachweisgrenze in KbE/ml nach Anreicherung von *E. sakazakii* in GPW (drei Reinigungsschritte bei der DNA-Extraktion)

Verdünnungsstufe	<i>E. sakazakii</i> (KbE/ml)	Ergebnis PCR
10 ⁰	2,8 x 10 ⁸	+ / +
10 ⁻¹	2,8 x 10 ⁷	+ / +
10 ⁻²	2,8 x 10 ⁶	+ / +
10 ⁻³	2,8 x 10 ⁵	+ / +
10 ⁻⁴	2,8 x 10 ⁴	+ / +
10 ⁻⁵	2,8 x 10 ³	+ / +
10 ⁻⁶	2,8 x 10 ²	+ / +
10 ⁻⁷	2,8 x 10	+ / +
10 ⁻⁸	2,8	+ / +
10 ⁻⁹	0,28	- / -

+ / +: positiv im Doppelansatz

- / -: negativ im Doppelansatz

Den Einfluß der DNA-Extraktion auf die Nachweisgrenze der PCR bei der Untersuchung von künstlich mit *E. sakazakii* kontaminiertem Speiseeis (Vanilleeiscreme industrieller Herstellung) zeigen Tab. 12 und 13. Auch hier wird deutlich, dass bei der Einschaltung von drei Reinigungsschritten (Nachweisgrenze 3,6 KbE/ml) gegenüber der von nur einem Reinigungsschritt (Nachweisgrenze $3,6 \times 10^7$ KbE/ml) die Empfindlichkeit der PCR erheblich verbessert werden kann.

Tabelle 12: PCR-Nachweisgrenze in KbE/ml nach Anreicherung von *E. sakazakii* in GPW mit künstlich kontaminiertem Speiseeis (ein Reinigungsschritt)

Verdünnungsstufe	<i>E. sakazakii</i> (KbE/ml)	Ergebnis PCR
10^0	$3,6 \times 10^7$	+ / +
10^{-1}	$3,6 \times 10^6$	+ / -
10^{-2}	$3,6 \times 10^5$	+ / -
10^{-3}	$3,6 \times 10^4$	- / -
10^{-4}	$3,6 \times 10^3$	- / -
10^{-5}	$3,6 \times 10^2$	- / -
10^{-6}	3,6 x 10	+ / -
10^{-7}	3,6	- / -
10^{-8}	0,36	- / -

Legende siehe Tab. 10

Tabelle 13: PCR-Nachweisgrenze in KbE/ml nach Anreicherung von *E. sakazakii* in GPW mit künstlich kontaminiertem Speiseeis (drei Reinigungsschritte)

Verdünnungsstufe	<i>E. sakazakii</i> (KbE/ml)	Ergebnis PCR
10^0	$3,6 \times 10^7$	+ / +
10^{-1}	$3,6 \times 10^6$	+ / +
10^{-2}	$3,6 \times 10^5$	+ / +
10^{-3}	$3,6 \times 10^4$	+ / +
10^{-4}	$3,6 \times 10^3$	+ / +
10^{-5}	$3,6 \times 10^2$	+ / +
10^{-6}	3,6 x 10	+ / +
10^{-7}	3,6	+ / +
10^{-8}	0,36	- / -

Legende siehe Tab. 11

4.3 Ergebnisse der PCR-Voruntersuchungen: PCR nach Liu et al. (2006)

Nach der DNA-Extraktion mit nur einem Reinigungsschritt lagen die Exklusivität und die Inklusivität bei jeweils 100 % (GPW), d. h. es traten weder falschpositive noch falschnegative Ergebnisse auf.

Die Ergebnisse der Überprüfung der Nachweisgrenze (GPW) finden sich in Tab. 14. Bereits nach einem Reinigungsschritt bei der DNA-Extraktion resultierte eine Nachweisgrenze von 2,7 KbE/ml.

Nach Anreicherung in GPW mit künstlich kontaminierter Vanilleeiscreme lag die PCR-Nachweisgrenze bereits nach einem Reinigungsschritt bei 3,0 KbE/ml.

Tabelle 14: PCR-Nachweisgrenze in KbE/ml nach Anreicherung von *E. sakazakii* in GPW (ein Reinigungsschritt bei der DNA-Extraktion)

Verdünnungsstufe	<i>E. sakazakii</i> (KbE/ml)	Ergebnis PCR
10^0	$2,7 \times 10^8$	+ / +
10^{-1}	$2,7 \times 10^7$	+ / +
10^{-2}	$2,7 \times 10^6$	+ / +
10^{-3}	$2,7 \times 10^5$	+ / +
10^{-4}	$2,7 \times 10^4$	+ / +
10^{-5}	$2,7 \times 10^3$	+ / +
10^{-6}	$2,7 \times 10^2$	+ / +
10^{-7}	$2,7 \times 10$	+ / +
10^{-8}	2,7	+ / +
10^{-9}	0,27	- / -

Legende siehe Tab. 11

4.4 Ergebnisse der Hauptuntersuchungen

4.4.1 Gesamtergebnisse der Untersuchung von Speiseeis auf *Enterobacter sakazakii*

Bei den 1253 untersuchten Speiseeisproben handelte es sich entsprechend den Sortenbezeichnungen der Leitsätze für Speiseeis und Speiseeishalberzeugnisse (1993) in der überwiegenden Anzahl um Milcheis (87,1 %). Die restlichen Proben verteilten sich auf die Speiseeissorten Eiscreme (7,7 %), Fruchteis (4,4 %) und Wassereis (0,4 %) sowie Cremeeis (0,2 %), Sahneeis und Sorbet (jeweils 0,08 %; Abb. 2).

Unabhängig vom Untersuchungsverfahren konnte in 37 der 1253 Speiseeisproben *E. sakazakii* nachgewiesen werden. Dies entspricht einem Kontaminationsgrad von 2,95 %. Betrachtet man die Verteilung der positiven Befunde auf die sieben unterschiedlichen Eissorten, ergibt sich folgendes Resultat: Von den 1091 Milcheisproben waren 33 (3,02 %) positiv. Unter den 55 Fruchteisproben befanden sich drei positive Proben (5,45 %). Von der Eissorte Sahneeis lag nur eine Probe zur Untersuchung vor, deren Ergebnis ebenfalls positiv war. Mit jeweils negativem Ergebnis wurden 97 Proben Eiscreme, fünf Proben Wassereis, drei Proben Cremeeis sowie eine Probe Sorbet untersucht (Abb. 2). Die 37 positiven Proben verteilten sich auf 26 unterschiedliche Geschmacksrichtungen (Anhang Tab. 3).

Die Eisproben stammten aus 567 unterschiedlichen Produktionsstätten (3.1.4). Darunter waren 513 Eisverkaufsstellen, die Eis selbst handwerklich fertigten; aus diesen Betrieben stammten 35 der *E.sakazakii*-positiven Eisproben, wobei in fünf Fällen jeweils zwei positive Proben aus demselben Betrieb kamen. Die beiden weiteren positiven Proben entstammten zwei Eisdielen, die von Fremdherstellern mit handwerklich gefertigtem Speiseeis beliefert wurden. Weder im selbst hergestellten "Bauernhofeis" (neun Proben), noch in den 36 Proben aus Verkaufsstellen, die industriell hergestelltes Eis abgaben, konnte *E. sakazakii* nachgewiesen werden.

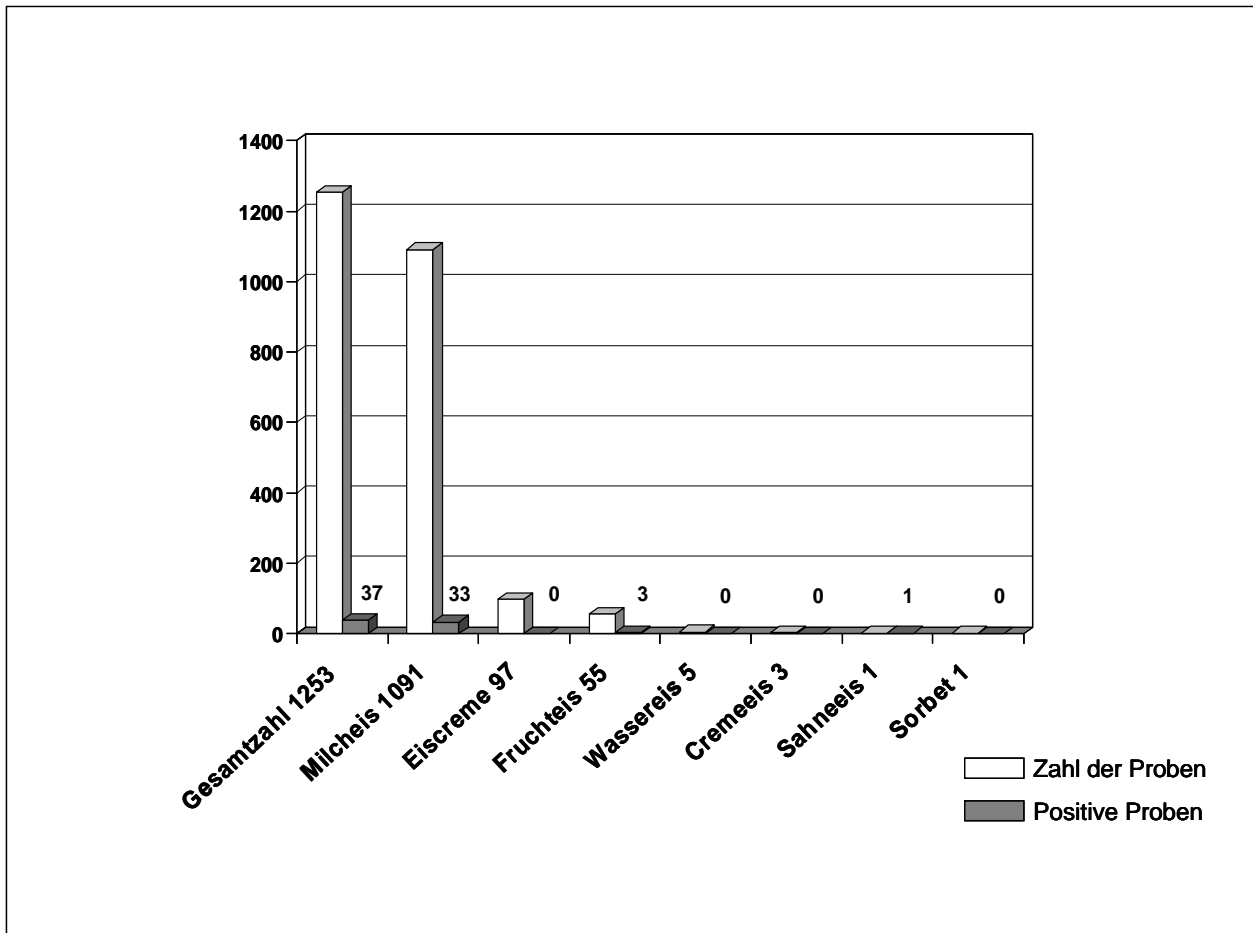


Abbildung 2: Ergebnis der Untersuchung von 1253 Speiseeisproben auf *E. sakazakii*

4.4.2 Ergebnisse unter Berücksichtigung der verschiedenen Untersuchungsverfahren

4.4.2.1 Ergebnisse der kulturellen Untersuchungen

4.4.2.1.1 Nachweis von *Enterobacter sakazakii*

Von den insgesamt 37 positiven Proben konnte in 35 Fällen bereits nach alleiniger Anreicherung in GPW (3.2.2.2.1) *E. sakazakii* auf ESIA-Agar nachgewiesen werden. Wie unter 3.2.2.2.2 ausgeführt, wurden 77 der 1253 Proben zusätzlich mit dem Verfahren nach ISO/TC 22964 | IDF/RM 210 untersucht, wobei im Anschluß an die Voranreicherung in GPW eine Selektivanreicherung in mLST erfolgt (Abb. 1). Unter diesen 77 befanden sich auch die beiden nach alleiniger Anreicherung in GPW auf ESIA-Agar negativen Proben, die nach der zusätzlichen Selektivanreicherung nun ebenfalls positiv waren (Tab. 15; Anhang Tab. 1a).

Außer den beiden bereits erwähnten Proben waren nach der Selektivanreicherung weitere sieben Proben positiv (Tab. 15; Anhang Tab. 1a), bei denen allerdings der Nachweis von *E. sakazakii* auch nach alleiniger Anreicherung in GPW bereits möglich gewesen war.

Tabelle 15: Nachweis von *E. sakazakii* aus GPW und mLST

Anreicherung	n	n _{pos}	ESIA pos	ESIA neg
GPW	1253	37	35	2
mLST	77	9	9	0

n: Anzahl der untersuchten Proben; n_{pos}: Anzahl der insgesamt positiven Proben
pos: positiv; neg: negativ

4.4.2.1.2 Quantitative Untersuchung auf *Enterobacter sakazakii*

Vier der 37 positiven Proben enthielten weniger als 0,3 *E. sakazakii*/g. Bei 31 Proben lagen die Keimzahlen zwischen 0,3 und 24 *E. sakazakii*/g. Keimzahlen von 46 und 460 *E. sakazakii*/g wurden bei je einer Probe gefunden (Abb. 3).

4.4.2.1.3 Beziehung zwischen Coliformengehalt und *Enterobacter sakazakii*-positiven Proben

In Tab. 16 werden die Coliformengehalte den Ergebnissen der qualitativen und quantitativen Untersuchungen auf *E. sakazakii* einander gegenübergestellt. Für coliforme Keime ergaben sich Keimzahlen von < 3/g bis > 1100/g. Sieben *E. sakazakii*-positive Proben enthielten weniger als drei Coliforme/g (Nachweisgrenze). Bei den übrigen 30 *E. sakazakii*-positiven Proben wurden Coliforme gefunden, ohne dass sich in qualitativer oder quantitativer Hinsicht zwischen beiden Parametern deutliche Beziehungen zeigten. Insgesamt waren von den 1253 untersuchten Proben 163 wegen erhöhter Coliformenzahlen (> 100/g, Beanstandungskriterium des LGL für Plan- und Beschwerdeproben) beanstandet worden. Von diesen 163 Proben enthielten 13 auch *E. sakazakii* (Tab. 16). Bei den übrigen *E. sakazakii*-positiven Proben lagen die Coliformengehalte unter 100/g (17 Proben) bzw. unter der Nachweisgrenze von 3/g (7 Proben) (Tab. 16).

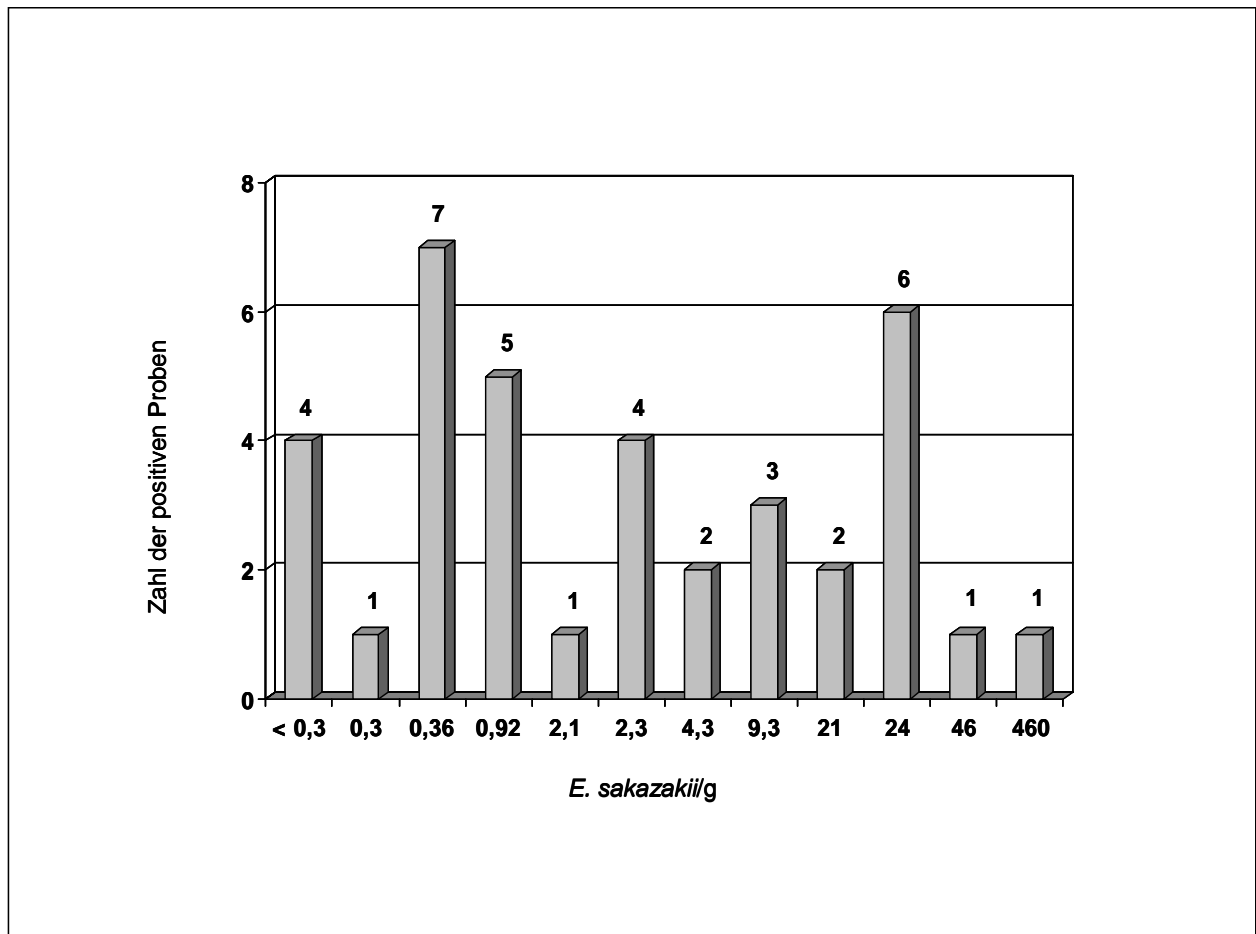


Abbildung 3: Ergebnisse der quantitativen Untersuchung von 37 *E. sakazakii*-positiven Speiseeisproben

Tabelle 16: Vergleich zwischen coliformen Keimen und *E. sakazakii*

Coliforme Keime/g	<i>E. sakazakii</i> -positive Proben (n = 37)	<i>E. sakazakii</i> /g
< 3	7	<0,3/ 0,36/ 0,36/ 0,36/ 0,36/ 0,92/ 0,92
3,6	2	<0,3/ 0,36
9,2	1	0,3
15	1	0,92
23	6	<0,3/ 2,1/ 2,3/ 2,3/ 2,3/ 9,3
43	4	0,36/ 21/ 21/ 24
75	1	46
93	2	4,3/ 9,3
150	2	2,3/ 24
240	5	0,74/ 0,92/ 4,3/ 9,3/ 24
460	1	24
1100	1	24
> 1100	4	<0,3/ 0,36/ 24/ 460

4.4.2.1.4 Biochemische Differenzierung der *Enterobacter sakazakii*-Isolate

Die Kolonien von 36 der 37 Isolate waren auf TSA-Agar gelb pigmentiert; bei einer Probe waren sie weiß. Bei der biochemischen Differenzierung der Isolate mit API 20 E lagen die Identifizierungswahrscheinlichkeiten zwischen 51,1 % und 99,5 %. Die Isolate mit einer Wahrscheinlichkeit von weniger als 98,4 % wurden mit dem BD Phönix nochmals biochemisch bestätigt und erreichten jeweils eine Wahrscheinlichkeit von 99 % für *E. sakazakii* (Anhang Tab. 1b).

4.4.2.2 Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchungen

Bei den 37 positiven Proben ergab sich nach der Untersuchung mit dem PCR-Verfahren nach Heuvelink et al. (2004) bei alleiniger Anreicherung in GPW folgendes Resultat:

In 29 Fällen war der Befund positiv, zwei Proben waren als nicht eindeutig positiv (jeweils eine Probe positiv und eine Probe negativ im Doppelansatz) zu beurteilen. Sechs Proben waren negativ bei nicht eindeutig interpretierbarem Ergebnis der internen Amplifikationskontrolle. Bei jeder dieser acht Proben wurde die DNA-Extraktion daraufhin auch mit einem kommerziellen Extraktionskit durchgeführt. Danach zeigten die beiden nicht eindeutig positiven Proben ein positives Ergebnis, und bei vier der sechs zunächst negativen Proben konnte *E. sakazakii* nun nachgewiesen werden. Zwei Proben blieben weiterhin negativ, bei eindeutig positiver interner Amplifikationskontrolle (Tab. 17). Die Untersuchung dieser beiden Proben mit dem PCR-Verfahren nach Liu et al. (2006) erbrachte allerdings einen positiven Befund. Auch bei der Untersuchung von neun *E. sakazakii*-positiven Eisproben, die zusätzlich in mLST angereichert worden waren (3.2.2.2.2), trat bei Anwendung des PCR-Verfahrens nach Heuvelink et al. (2004) ein falschnegatives Ergebnis auf. (Tab. 17; Tab. 19; Anhang Tab. 1a).

Dagegen wurden mit dem Verfahren nach Liu et al. (2006) nach Anreicherung in GPW alle 37 positiven Eisproben richtig erkannt. Zur DNA-Extraktion genügte der thermische Zellaufschluss (mit nur einem Reinigungsschritt). Auch in allen oben bereits erwähnten

neun Proben, die zusätzlich in mLST angereichert worden waren, konnte *E. sakazakii* nachgewiesen werden (Tab. 17; Tab. 19; Anhang Tab. 1a).

Tabelle 17: Ergebnisse der PCR-Untersuchungen

Anreicherung	n	n _{pos}	PCR (Heuv) pos	PCR (Heuv) neg	PCR (Liu) pos	PCR (Liu) neg
GPW	1253	37	35	2	37	0
mLST	77	9	8	1	9	0

n: Anzahl der untersuchten Proben; n_{pos}: Anzahl der insgesamt positiven Proben

Heuv: PCR nach Heuvelink et al. (2004); Liu: PCR nach Liu et al. (2006)

pos: positiv; neg: negativ

Die 37 positiven Eisproben konnten auch mit dem LightCycler-PCR-System aus allen unter 3.2.2.3.3 genannten Ansätzen bestätigt werden. Die durch thermischen Zellaufschluss (drei Reinigungsschritte) gewonnene DNA wies hier geringfügig niedrigere cp-Werte als die mittels kommerziellen Extraktionskits gewonnene DNA auf. Die aus Rückstellproben der GPW-Anreicherung mit Hilfe der speziellen LightCycler-Extraktion erhaltene DNA führte insgesamt zu noch niedrigeren cp-Werten.

Durch die Untersuchung mittels *ompA*-targeted PCR (3.2.2.3.4) wurden ebenfalls alle 37 Isolate als *E. sakazakii* bestätigt.

4.4.3 Gegenüberstellung unterschiedlicher Untersuchungsverfahren

4.4.3.1 PCR-Methoden und kultureller Nachweis nach Anreicherung in gepuffertem Peptonwasser

Nach Anreicherung in GPW stimmten in 33 Fällen die Ergebnisse des PCR-Verfahrens nach Heuvelink et al. (2004) und die des kulturellen Nachweises auf ESIA-Agar überein. In zwei Proben konnte *E. sakazakii* nur mittels PCR, in zwei weiteren nur kulturell nachgewiesen werden. Allerdings traten bei Anwendung des PCR-Verfahrens folgende Probleme auf. Bei einer Probe fiel der Doppelansatz positiv und negativ aus. Bei sechs negativen Proben war das Ergebnis der internen Amplifikationskontrolle nicht eindeutig

interpretierbar. Nach der zusätzlichen Extraktion mit einem kommerziellen Extraktionskit (High Pure foodproof 1, Roche Diagnostics) fiel das Ergebnis sowohl bei der nicht eindeutig positiven Probe, als auch bei vier der zunächst negativen Proben positiv aus. Zwei Proben blieben also, bei positiver interner Amplifikationskontrolle, negativ. Von den insgesamt 37 positiven Proben wurden demnach sowohl mit dem PCR-Verfahren als auch kulturell nur jeweils 35 gefunden. Mit der PCR-Methode nach Liu et al. (2006) wurden dagegen alle 37 positiven Proben detektiert. In Tab. 18 werden die Ergebnisse nochmals zusammengefasst.

Tabelle 18: Vergleich der verschiedenen Untersuchungsverfahren nach Anreicherung in GPW

n	Positive Proben	PCR- und kulturell positiv	Nur PCR-positiv	Nur kulturell positiv
1253	37	33 (Heuv.)	2 (Heuv.)	2 (Heuv.)
		35 (Liu)	2 (Liu)	0 (Liu)

n: Anzahl der insgesamt untersuchten Proben

Heuv.: PCR nach Heuvelink et al. (2004)

Liu: PCR nach Liu et al. (2006)

4.4.3.2 PCR-Methoden und kulturelle Untersuchung nach ISO/TS 22964 | IDF/RM 210 (2006)

Bei 77 der 1253 Eisproben wurden die Ergebnisse der Anreicherung in GPW mit den Ergebnissen der zusätzlichen Selektivanreicherung in mLST (ISO/TS 22964 | IDF/RM 210, 2006) verglichen. Achtundsechzig dieser 77 Proben erwiesen sich nach beiden Anreicherungen als negativ. Bei den neun positiven Proben ergab sich Folgendes:

Nach der zusätzlichen Selektivanreicherung konnte in allen neun Proben *E. sakazakii* auf ESIA-Agar nachgewiesen werden, also auch in den beiden nach alleiniger Anreicherung in GPW negativen Fällen (4.4.3.1).

Mit dem PCR-Verfahren nach Heuvelink et al. (2004) wurde *E. sakazakii* in acht, mit dem nach Liu et al. (2006) in allen der neun positiven Proben detektiert (Tab.19; Anhang Tab. 2b). In Tab. 19 werden die Ergebnisse nochmals zusammengefasst.

Tabelle 19: Vergleich der verschiedenen Untersuchungsverfahren nach Anreicherung in GPW bzw. zusätzlicher Selektivanreicherung in mLST

Methode	positiv (n = 77)
Nachweis (ESIA) aus GPW	7
Nachweis (ESIA) aus mLST	9
PCR aus GPW (Heuv.)	8
PCR aus mLST (Heuv.)	8
PCR aus GPW (Liu)	9
PCR aus mLST (Liu)	9

n: Anzahl der untersuchten Proben; 9 positive Proben entsprechen 100 %
 Heuv.: PCR nach Heuvelink et al. (2004); Liu: PCR nach Liu et al. (2006)

5 BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE UND DISKUSSION

5.1 Einleitung und Ziel der Arbeit

Enterobacter sakazakii ist zwar ein seltener Infektionserreger, insbesondere bei Frühgeburten und Säuglingen in den ersten Lebensmonaten, ruft aber häufig lebensbedrohliche Erkrankungen wie Meningoenzephalitiden, Septikämien oder nekrotisierende Enterokolitiden hervor (WHO/FAO, 2006). Etliche dieser Fälle und Ausbrüche traten nach dem Verzehr von kontaminierter Säuglingsnahrung auf Milchpulverbasis auf. Dementsprechend konzentrierten sich Erhebungen zum Vorkommen des Erregers in den letzten Jahren vor allem auf diese Erzeugnisse. Inzwischen liegen auch Daten zu einigen anderen Lebensmitteln vor, allerdings wurde im Schrifttum nur eine Untersuchung an Eismix-Proben gefunden, auf die weiter unten noch eingegangen wird. Darüber hinaus wird zurzeit die Internationale Methode ISO/TS 22964 | IDF RM 210 (2006) (2.2.1), die nur für die Untersuchung von Säuglingsnahrung auf Milchpulverbasis und Milchpulver konzipiert wurde, überarbeitet und auf andere Lebensmittel ausgedehnt. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, Datenmaterial zum Vorkommen von *E. sakazakii* in Speiseeis verfügbar zu machen und gleichzeitig zwei in

der Literatur beschriebene molekularbiologische Methoden hinsichtlich ihrer Eignung zum Nachweis des Erregers in derartigen Lebensmitteln zu überprüfen bzw. zu optimieren.

Zu diesem Zweck wurden am Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL) in Oberschleißheim im Zeitraum April bis Oktober 2006 1253 Speiseeisproben (Plan- und Beschwerdeproben) nach einer Anreicherung in gepuffertem Peptonwasser (GPW) mit den von Heuvelink et al. (2004) und Liu et al. (2006) entwickelten molekularbiologischen Methoden auf real-time-PCR-Basis untersucht. Siebenundsiebzig der Proben wurden außerdem mit dem oben erwähnten ISO/IDF-Verfahren in Kombination mit den beiden molekularbiologischen Methoden auf Anwesenheit von *E. sakazakii* geprüft.

5.2 Voruntersuchungen

5.2.1 Mikrobiologische Voruntersuchungen

In den mikrobiologischen Voruntersuchungen sollte festgestellt werden, ob als (Vor)anreicherungsmedium für *E. sakazakii* GPW verwendet werden kann, oder ob der Einsatz eines selektiven Mediums (*E. sakazakii* Selective Broth – ESSB) notwendig ist. In Untersuchungen mit Reinkulturen waren hinsichtlich der Leistungsfähigkeit der Medien keine Unterschiede zu registrieren. In beiden Medien wurden nach der Inkubation *E. sakazakii*-Zahlen von etwa 10^8 /ml gefunden (4.1.1). Bei Untersuchungen mit künstlich kontaminierten Speiseeisproben (Begleitflora) wurden nach einer Anreicherung in GPW in Abhängigkeit von der Eissorte *E. sakazakii*-Zahlen zwischen 10^8 /g und 10^4 /g (Milcheis) bzw. 10^7 /g (Fruchteis) nachgewiesen. Bei Anwesenheit einer hohen Begleitflora konnte allerdings in zwei Fruchteissorten der Erreger nach alleiniger Anreicherung in GPW auf einem festen Selektivnährboden nicht mehr isoliert werden. Ein Nachweis mittels PCR war dagegen auch in diesen Fällen möglich (Tab. 9). In den Hauptuntersuchungen wurde daher als Anreicherungsmedium für die nachfolgende PCR GPW verwendet. Bei Routineuntersuchungen bietet dieses Medium den Vorteil, dass parallel auch andere Erreger, insbesondere Salmonellen, nachgewiesen werden können, was bei Verwendung eines Selektivnährbodens nicht möglich ist.

5.2.2 Voruntersuchungen zur Optimierung der molekularbiologischen Verfahren für den Nachweis von *Enterobacter sakazakii* in Speiseeis

Für beide PCR-Verfahren waren Anpassungen an die apparative Ausstattung des Labors erforderlich. So wurde das Temperatur-Zeit-Profil von Heuvelink et al. (2004) für den Thermocycler ABI Prism 7000 (PE-Applied Biosystems) entwickelt, der eine andere ramp rate (Dauer der Temperaturänderung des Thermocyclers) besitzt, als der in der vorliegenden Arbeit verwendete Thermocycler Mx3000P (Stratagene). Dieses Temperatur-Zeit-Profil konnte nicht übernommen werden, da bei der Untersuchung an Reinkulturen (Anzucht in GPW) von Nicht-*E. sakazakii*-Bakterienspecies (Tab. 6) mit *Salmonella* spp. (7 Stämme) und *Escherichia coli* (11 Stämme) falschpositive Ergebnisse registriert wurden. Aus diesem Grund wurde das Temperatur-Zeit-Profil entsprechend modifiziert (3.2.1.2). Bei Anwendung des neuen Profils traten keine falschpositiven Resultate mehr auf. Bei der orientierenden Untersuchung von vier *E. sakazakii*-Isolaten wurden ebenso keine falschnegativen Ergebnisse beobachtet.

In den anschließenden Untersuchungen zur Nachweisgrenze von *E. sakazakii* in Speiseeis (künstlich kontaminierte Vanilleeiscreme) zeigte sich, dass eine befriedigende Empfindlichkeit mit dem laboreigenen Extraktionsverfahren (ein Reinigungsschritt) nicht erreicht werden konnte (Tab. 12). Daher war eine Modifikation auch des Extraktionsverfahrens notwendig. Die Einschaltung zweier weiterer Reinigungsschritte resultierte in einer rechnerisch ermittelten Nachweisgrenze von etwa 3 *E. sakazakii*/ml (Tab. 13). In den Hauptuntersuchungen zeigte sich allerdings, dass bei einigen Probenmaterialien trotz der aufwändigen Extraktion sowohl im Hinblick auf das PCR-Ergebnis selbst, als auch im Hinblick auf die interne Amplifikationskontrolle keine eindeutig interpretierbaren Resultate zu erzielen waren. Diese Inhibition konnte nur durch Anwendung eines kommerziellen Extraktionskits vermieden werden. Außerdem zeigten die Amplifikationskurven der Proben-DNA niedrigere ct-Werte (ungefähr 5 Zyklen) und waren besser zu interpretieren.

Das Temperatur-Zeit-Profil von Liu et al. (2006) wurde unter Berücksichtigung der technischen Gegebenheiten des Thermocyclers Smart Cycler II (Cepheid Co, USA) entwickelt. Dieses Gerät weist eine andere ramp rate auf als der in der vorliegenden Arbeit verwendete Thermocycler, weshalb auch für dieses PCR-Verfahren das

Temperatur-Zeit-Profil geändert wurde. Die Nachweisgrenze des Verfahrens nach Liu et al. (2006) wurde ebenfalls in künstlich kontaminierter Vanilleeiscreme rechnerisch ermittelt. Wie aus Tab. 14 hervorgeht, lag sie ebenfalls bei etwa 3 *E. sakazakii*/ml. Das laboreigene Extraktionsverfahren (ein Reinigungsschritt) war in den Hauptuntersuchungen für alle Probenmaterialien anwendbar.

5.3 Hauptuntersuchungen

5.3.1 Ergebnisse der Untersuchung von Speiseeis auf *Enterobacter sakazakii*

Wie aus Abb. 2 hervorgeht, wurden in erster Linie Proben der Speiseeissorte Milcheis untersucht (1091 von 1253 Proben). Dies ist zum einen darauf zurückzuführen, dass es sich bei dem Untersuchungsmaterial um Plan- und Beschwerdeproben des LGL handelte und daher die Zusammensetzung hinsichtlich der Sortenverteilung nicht beeinflusst werden konnte. Zum anderen handelt es sich nach Angaben des LGL bei Milcheis um die am häufigsten mikrobiell belastete Speiseeissorte, sodass beim Ziehen der Planproben auf ihr das Hauptgewicht liegt. Bei der Untersuchung von Milcheis erwiesen sich 33 Proben als mit *E. sakazakii* kontaminiert. Die restlichen positiven Proben verteilten sich auf die Sorten Fruchteis (3 von 55) und Sahneeis (1 von 1) (Abb. 2). Insgesamt wurde also in 37 (2,95 %) Proben *E. sakazakii* nachgewiesen. Bei den positiven Proben wurde zusätzlich zum qualitativen auch der quantitative Nachweis vorgenommen. Hierbei fanden sich *E. sakazakii*-Zahlen zwischen 0,3 und 460/g (Abb. 3). Bei vier der 37 positiven Proben lagen die Keimgehalte unterhalb der Nachweisgrenze des zur Quantifizierung eingesetzten MPN-Verfahrens (3.2.2.2.3), die 0,3/g betrug (Abb. 3).

Fünfunddreißig der 37 positiven Proben stammten aus Verkaufsstellen, in denen das Speiseeis handwerklich gefertigt wurde, die beiden übrigen Proben aus solchen, die ihr Eis von anderen Herstellern bezogen. Weder in Proben so genannten Bauernhofeises noch in industriell hergestelltem Speiseeis konnte *E. sakazakii* nachgewiesen werden (4.4.1). Allerdings kamen aus den beiden letztgenannten Bereichen nur 45 der 1253 Proben.

Im Schrifttum konnten keine für einen Vergleich mit den eigenen Ergebnissen geeigneten Studien gefunden werden, sieht man ab von den oben erwähnten Untersuchungen von Heuvelink et al. (2004), die 87 Eismix-Proben mittels PCR auf die Anwesenheit von *E. sakazakii* prüften, den Erreger aber in keinem Fall nachweisen konnten (2.1.5.2).

5.3.2 Kultureller Nachweis von *Enterobacter sakazakii*

Wie unter 5.2.1 ausgeführt, wurde als Anreicherungsmedium für die PCR-Verfahren GPW verwendet. Obwohl die gängigen kulturellen Nachweismethoden (FDA/CFSSAN, 2002 und ISO/TS 22964 | IDF/RM 210, 2006) eine zweistufige Anreicherung vorsehen (2.2.1), wurde in der vorliegenden Arbeit grundsätzlich aus der GPW-Kultur ein Ausstrich auf ESIA-Agar angelegt (Abb. 1). So konnten allerdings nur 35 der 37 positiven Proben erkannt werden (Tab. 15). Bei Anwendung des ISO/IDF-Verfahrens (77 Proben) gelang der Nachweis in allen neun positiven Fällen, worunter sich auch die beiden nach alleiniger Anreicherung in GPW negativen Proben befanden (Tab. 15). Wenn aufgrund der nur geringen Probenzahl keine abschließende Bewertung möglich ist, so deutet sich doch an, dass auch bei der Untersuchung von Speiseeis auf die Selektivanreicherung nicht verzichtet werden kann.

Im Hinblick auf die Revision des ISO/IDF-Standards (2.2.1), in der unter anderem vorgesehen ist die Gelbpigmentierung nicht mehr weiter als Identifizierungskriterium anzusehen, sollte erwähnt werden, dass eines der 37 Isolate aus den eigenen Untersuchungen keine Pigmentierung aufwies (4.4.2.1.4). Dies entspricht etwa den Angaben von Iversen und Forsythe (2007), wonach 2 % der *E. sakazakii*-Stämme kein gelbes Pigment produzieren.

5.3.3 Beziehung zwischen Coliformengehalt und *Enterobacter sakazakii*-positiven Proben

In Anhang 1, Kap. 2.2. der VO (EG) Nr. 2073/2005 werden *Enterobacteriaceae* in "getrockneter Säuglingsanfangsnahrung und getrockneten diätetischen Lebensmitteln für besondere medizinische Zwecke, die für Säuglinge unter 6 Monaten bestimmt sind" als Indexkeime für Salmonellen und *E. sakazakii* angesehen (bei Nachweis von

Enterobacteriaceae in einer von 10 Proben à 10 g muss auf die genannten Erreger untersucht werden). Da am LGL bei allen Eisproben routinemäßig der Gehalt an coliformen Keimen als Hygieneparameter ermittelt wurde, wobei als Beanstandungsgrenze 100 Coliforme/g gelten, sollte in der vorliegenden Arbeit überprüft werden, ob bei Speiseeis eine ähnliche Beziehung zwischen Coliformen und *E. sakazakii* besteht. Unter Zugrundelegung dieses Grenzwertes zeigte sich, dass 24 der 37 *E. sakazakii*-positiven Proben weniger als 100 Coliforme/g enthielten, sieben davon sogar weniger als 3 Coliforme/g. Nur bei dreizehn Proben lagen die Coliformengehalte über dem Grenzwert (Tab. 16). Damit war also bei 24 der 37 *E. sakazakii*-positiven Proben keine Beziehung zwischen dem Erreger und einer erhöhten Coliformenzahl gegeben ("falschnegative" Ergebnisse). Da insgesamt 163 der untersuchten 1253 Proben mehr als 100 Coliforme/g enthielten, aber nur 13 hiervon auch *E. sakazakii*, war bei 150 der erwähnten 163 Proben ebenfalls keine Beziehung zwischen beiden mikrobiologischen Parametern zu registrieren ("falschpositive" Ergebnisse). Auch unter Berücksichtigung der nur relativ geringen Zahl an mit *E. sakazakii* kontaminierten Proben, deutet sich an, dass coliforme Keime bei der Untersuchung von Speiseeis nicht als geeigneter Index für die gleichzeitige Kontamination mit dem Erreger anzusehen sind.

5.3.4 Molekularbiologischer Nachweis von *Enterobacter sakazakii*

Nach der Anreicherung in GPW wurde mit dem PCR-Verfahren nach Heuvelink et al. (2004) nur in 35 der 37 positiven Eisproben *E. sakazakii* detektiert. Die Ergebnisse der beiden übrigen Proben sind als falschnegativ anzusehen, da nach Ausstrichen aus den Anreicherungen auf ESIA-Agar der Erreger isoliert werden konnte. Andererseits waren bei Anwendung des PCR-Verfahrens zwei Proben positiv, in deren Anreicherung (GPW) *E. sakazakii* nicht gefunden werden konnte (5.3.2 und Tab. 18). Die Detektionsrate des PCR-Verfahrens nach Liu et al. (2006) lag dagegen bei 100 %.

Auch nach Einschalten eines weiteren Anreicherungsschrittes bei 77 der 1253 Speiseeisproben in mod. Laurylsulfat-Tryptose-Bouillon – mLST – (Abb. 1), wie sie in der ISO/IDF-Methode vorgesehen ist, trat bei Anwendung des PCR-Verfahrens nach Heuvelink et al. (2004) ein falschnegatives Ergebnis auf (nur acht von insgesamt neun

Proben positiv). Mit der PCR-Methode nach Liu et al. (2006) wurden alle neun positiven Proben richtig erkannt (Tab. 17; Tab. 19).

Im Hinblick auf die falschnegativen Ergebnisse bei der Untersuchung mit dem PCR-Verfahren nach Heuvelink et al. (2004) scheint eine Abhängigkeit vom Probenmaterial gegeben zu sein. In beiden Fällen handelte es sich dabei um das Milcheis Stracciatella. Trotz Modifizierung der DNA-Extraktion (3 Reinigungsschritte statt einem oder Extraktion mittels eines kommerziellen Kits) konnten keine positiven Resultate erzielt werden.

Grundsätzlich ist bezüglich der Auswertung des Verfahrens nach Heuvelink et al. (2004) nach Anreicherung in GPW anzumerken, dass die ct-Werte meist bei mehr als 35 Zyklen lagen, auch ct-Werte über 40 Zyklen mussten als positiv gewertet werden. Eine zusätzliche Selektivanreicherung in mLST hatte den Vorteil, dass die ct-Werte in der Regel unter 35 Zyklen sanken.

Bei den Untersuchungen mit der PCR-Methode nach Liu et al. (2006) war weder die Einschaltung zweier weiterer Reinigungsschritte bei der Extraktion noch die Verwendung eines kommerziellen Extraktions-Kits notwendig. Bei allen positiven Proben lagen die ct-Werte mit 15 bis 25 Zyklen deutlich unter denen des PCR-Verfahrens nach Heuvelink et al. (2004).

5.3.5 Zusammenfassende Bewertung der molekularbiologischen Verfahren im Hinblick auf den Einsatz in der Routinediagnostik

Grundsätzlich war das Verfahren nach Liu et al. (2006) für die Untersuchung von Speiseeis auf *E. sakazakii* nach einer 18 – 24-stündigen Inkubation des Probenmaterials in GPW besser geeignet als die Methode von Heuvelink et al. (2004), da mit letzterer, unabhängig vom Extraktionsverfahren, zwei falschnegative Resultate auftraten. Auch nach Einschaltung eines Selektivanreicherungsschrittes in mLST blieb eine der beiden Proben weiterhin trotz gleichzeitigem kulturellem Nachweis negativ. Gegenüber dem kulturellen Verfahren (ISO/TS 22964 | IDF/RM 210, 2006) erbringt die molekularbiologische Untersuchung einen erheblichen Zeitvorteil (etwa 24 h für die Anreicherung und etwa drei Stunden für den PCR-Nachweis gegenüber etwa 72 h beim

kulturellen Verfahren jeweils bei einem negativen Befund). Zumindest bei den 77 mit beiden Verfahren [PCR nach Liu et al. (2006) und ISO/IDF-Verfahren] vergleichend untersuchten Proben war eine völlige Übereinstimmung der Ergebnisse zu registrieren. Allerdings ist der apparative und finanzielle Aufwand zur Durchführung des PCR-Verfahrens relativ hoch, was aus Rentabilitätsgründen einen entsprechend hohen Probendurchsatz voraussetzt. Da, wie die vorliegenden Ergebnisse zeigen, die PCR nach Liu et al. (2006) nach einer Anreicherung in GPW durchgeführt werden kann, vereinfacht sich der kulturelle Teil der Gesamtuntersuchung, da auch andere Pathogene, insbesondere Salmonellen in diesem Medium angereichert werden können.

5.3.6 Ausblick

Ein Anteil an positiven Proben von etwa 3 % bei einer Probenzahl von 1253 erscheint zunächst nicht hoch. Wie aber bereits erwähnt, war das Untersuchungsmaterial hinsichtlich des Anteils der einzelnen Speiseeissorten trotz der hohen Probenzahl sehr uneinheitlich zusammengesetzt: 1091 Milcheis-, 97 Eiscreme- und 55 Fruchteisproben gegenüber nur 10 Proben anderer Speiseeissorten. Streng genommen gelten daher die Ergebnisse und Schlussfolgerungen für Milcheis, nur bedingt auch für Fruchteis und die übrigen in die Untersuchung einbezogenen Sorten, einschließlich Eiscreme, in der in keinem Fall *E. sakazakii* nachgewiesen wurde. Da Untersuchungen an einer entsprechend hohen Probenzahl auch der übrigen Eissorten den Rahmen der vorliegenden Arbeit gesprengt hätten, sind in diesem Zusammenhang noch weitere Studien notwendig. Ähnliches gilt auch für die Herkunft der Proben. Von den 567 Produktionsstätten, aus denen die Proben stammten, waren 513 solche, die das Eis selbst handwerklich fertigten. Nur 54 Produktionsstätten gehörten in den Bereich der industriellen Produktion oder den landwirtschaftlichen Bereich ("Bauernhofeis"), sodass auch hier noch weitere Untersuchungen notwendig sind. Wichtig wäre außerdem, Details über die Kontaminationsquellen zu ermitteln.

Solange keine genaueren Vorstellungen über die Pathogenitätsmechanismen von *E. sakazakii* bzw. die infektiöse Dosis bei den verschiedenen Konsumentengruppen bestehen, bliebe eine Risikobewertung der in der vorliegenden Arbeit ermittelten Keimzahlen des Erregers spekulativ. Allerdings wurden bisher keine Erkrankungsfälle durch *E. sakazakii* in Speiseeis bekannt.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Enterobacter sakazakii zählt zur Gruppe der bisher selten diagnostizierten lebensmittelassoziierten Infektionserreger. Auch wenn anscheinend eine Infektiosität für alle Altersgruppen gegeben ist, betrifft die Erkrankung überwiegend Frühgeborene und Neugeborene. Der Erreger verursacht u. a. Septikämie, Meningitis und nekrotisierende Enterokolitis und ist gerade bei den Risikogruppen mit einer hohen Letalität verbunden. Bisherige Erhebungen zum Vorkommen des Keimes in Lebensmitteln beschränkten sich im Wesentlichen auf Erzeugnisse für die oben genannten Risikogruppen. Angaben zum Vorkommen in Speiseeis fehlen nahezu ganz. Ziel der Arbeit war es daher, entsprechende Daten zu ermitteln und in diesem Zusammenhang eine molekularbiologische Nachweismethode für *E. sakazakii* für die Routinediagnostik von Speiseeis zu etablieren.

Zunächst wurde die Eignung von gepuffertem Peptonwasser (GPW) als Anreicherungsmedium für die PCR getestet. Da die Anreicherung in einem Selektivmedium (*Enterobacter sakazakii* Selektive Broth – ESSB) keine wesentlichen Vorteile aufwies, wurde GPW als Anreicherungsmedium gewählt.

Für den molekularbiologischen Nachweis mittels real-time-PCR wurden zwei TaqMan-PCR-Methoden (nach Heuvelink et al., 2004 und nach Liu et al., 2006), die ursprünglich für pulverförmige Lebensmittel entwickelt worden waren, hinsichtlich des Vorkommens falschpositiver und falschnegativer Ergebnisse getestet und dem verwendeten Thermocycler (Mx3000P, Stratagene) angepasst. Die DNA-Extraktion wurde ebenfalls entsprechend optimiert.

Mit den beiden Verfahren wurden am Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit im Zeitraum April bis Oktober 2006 1253 Speiseeisproben aus dem südbayerischen Raum untersucht. Bei 77 Proben wurde vergleichend ein kulturelles Nachweisverfahren für *E. sakazakii* (ISO/TS 22964 | IDF/RM 210, 2006) mitgeführt.

Insgesamt wurde der Erreger in 37 Proben, darunter in 33 von 1091 Milcheis- und in drei von 55 Fruchteisproben sowie in der einzig untersuchten Sahneeisprobe gefunden,

was einem Kontaminationsgrad von 2,95 % entspricht. Die Untersuchungen an Eiscreme (n = 97), Wassereis (n = 5), Cremeeis (n = 3) und Sorbet (n = 1) verliefen negativ. Die *E. sakazakii*-Zahlen in den positiven Proben lagen zwischen < 0,3 und 460/g.

Mit dem PCR-Verfahren nach Liu et al. (2006) wurden alle 37 positiven Proben detektiert. Bei Anwendung des Verfahrens nach Heuvelink et al. (2004) traten zwei falschnegative Ergebnisse auf. Bei den 77 vergleichend mit der ISO/IDF-Methode untersuchten Proben bestand bei Anwendung der PCR nach Liu et al. (2006) eine hundertprozentige Übereinstimmung zwischen kulturellem und molekularbiologischem Verfahren; bei Anwendung der PCR nach Heuvelink et al. (2004) trat ein falschnegatives Ergebnis auf.

Somit erwies sich das PCR-Verfahren von Liu et al. (2006) in Kombination mit der Anreicherung in GPW bei der Untersuchung auf *E. sakazakii* in Speiseeis als geeigneter Suchtest, der bei einem negativen Befund (nach den vorliegenden Untersuchungen in etwa 97 % der Fälle) einen erheblichen Zeitvorteil (etwa 27 h) gegenüber dem kulturellen Verfahren (72 h) erbringt.

7 SUMMARY

Real-time-PCR based studies on the occurrence of *Enterobacter sakazakii* in edible ice

Enterobacter sakazakii is a rare cause of food-borne infectious disease in all age groups especially in premature infants and neonates. The illness is often characterized by meningitis, septicemia or necrotizing enterocolitis and a high fatality rate. So far investigations into the occurrence of *E. sakazakii* in food are largely restricted to food intended for consumption by the above mentioned high-risk groups. Data about the occurrence of the pathogen in edible ice are almost completely missing. Therefore, the intention of the study presented here was to collect corresponding data and to establish a molecular biology based detection method for screening edible ice in routine examinations for the presence of *E. sakazakii*.

Initially the suitability of non-selective buffered peptone water (BPW) as an enrichment medium was tested. Since the use of a selective enrichment broth (*Enterobacter sakazakii* Selektive Broth – ESSB) did not show any clear advantages BPW was chosen for these purposes.

Two PCR based methods (Heuvelink et al., 2004 and Liu et al., 2006) primarily developed for the examination of powdered foods were tested for the incidence of false-negative and false-positive results and adapted to the Thermocycler Mx3000P (Stratagene). The DNA extraction method was also optimized.

Using both PCR methods 1253 samples of edible ices from the southern Bavarian region were examined between April and October 2006 in the laboratory of the "Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit" for the presence of *E. sakazakii*. Seventyseven of these samples were also analysed using a conventional culture technique (ISO/TS 22964 | IDF/RM 210, 2006) simultaneously.

All in all *E. sakazakii* was detected in 37 samples (2.95 %) including milk ice (33 out of 1091 samples positive), fruit ice cream (3 out of 55 samples positive) and cream ice

(1 of 1 sample positive). "Eiscreme" (97 samples), water ice (5 samples), "Cremeeis" (3 samples) and sorbet were negative. *E. sakazakii* counts ranged from < 0.3 to 460/g.

Using the PCR technique of Liu et al. (2006) all positive samples were detected, whereas the method of Heuvelink et al. (2004) yielded two false-negative results. Testing 77 samples both with the PCR technique of Liu et al. (2006) and the ISO/IDF method the results obtained were consistently. Using the method of Heuvelink et al. (2004) one positive sample was not detected.

To sum one can say that the PCR technique of Liu et al. (2006) combined with an enrichment in BPW is a suitable screening test for the detection of *E. sakazakii* in edible ice. Negative samples (97 % of all samples tested during the own investigations) will be detected after about 27 h whereas 72 h are needed to examine a negative sample using the ISO/IDF method.

8 LITERATURVERZEICHNIS

AMTLICHE SAMMLUNG VON UNTERSUCHUNGSVERFAHREN NACH § 64 LFGB (1991):

Untersuchung von Lebensmitteln. Bestimmung der coliformen Keime in Milch, Milchprodukten, Butter, Käse und Speiseeis. Verfahren mit flüssigem Nährmedium, L 01.00 – 2

AMTLICHE SAMMLUNG VON UNTERSUCHUNGSVERFAHREN NACH § 64 LFGB (1995):

Untersuchung von Lebensmitteln. Bestimmung der Keimzahl in Milch und Milchprodukten – Spatelverfahren, L 01.00 – 57

AMTLICHE SAMMLUNG VON UNTERSUCHUNGSVERFAHREN NACH § 64 LFGB (2006):

Untersuchung von Lebensmitteln. Allgemeine verfahrensspezifische Anforderungen zum Nachweis von Mikroorganismen mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) in lebensmitteln, L 00.00 – 45

AMTSBLATT DER EUROPÄISCHEN UNION (2005): L338

VERORDNUNG (EG) Nr. 2073/2005 DER KOMMISSION vom 15. November über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel.

<http://eur-lex.europa.eu>

ANONYMUS (2007):

API 20 E, REF 20100/20160.

BioMérieux, France

BAR-OZ, B., PREMINGER, A., PELEG, O., BLOCK, C., BLOCK, I. C., ARAD, I. (2001):

Enterobacter sakazakii infection in the newborn.

Acta Paediatr. **90**, 356-358

BARREIRA, E. R., COSTA DE SOUZA, D., DE FREITAS GOIS, P.; FERNANDES, J. C.; (2003):

Meningite por *Enterobacter sakazakii* em recém-nascido: relato de caso.

Pediatra **25**, 65-70

Zitiert nach FAO/WHO (2006)

BAYERISCHES LANDESAMT FÜR GESUNDHEIT UND LEBENSMITTELSICHERHEIT (2007):

Lebensmittelsicherheit: Warnungen und Informationen der Öffentlichkeit; Lfd. Nr. -1 vom 11.06.2007; Lfd. Nr. -2 vom 12.06.2007.

www.lgl.bayern.de/lebensmittel/rueckrufe/anzeige

BECKER, H. (2007):

Persönliche Mitteilung; Erarbeitung eines ISO-Standards zum Nachweis von *E. sakazakii* in Lebensmitteln.

Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch, Ludwig-Maximilians-Universität München

BOWEN, A. B., BRADEN, C. R. (2006):

Invasive *Enterobacter sakazakii* disease in infants.

Emerg. Infect. Dis. **12**, 1185-1189

BUSCH, U. (2006)

Persönliche Mitteilung: LGL-inhouse PCR-Schulung.

Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Dienststelle Oberschleißheim

CAUBILLA BARRON, J., FORSYTHE, S. J.(2007):

Dry stress and survival time of *Enterobacter sakazakii* and other *Enterobacteriaceae* in dehydrated powdered infant formula.

J. Food Prot. **70**, 2111-2117

CHAVEZ-LOPEZ, C., DE ANGELIS, M., MARTUSCELLI, M., SERIO, A.,
PAPARELLO, A., SUZZI, G. (2006):

Characterization of the *Enterobacteriaceae* isolated from an artisanal Italian ewe's cheese (Pecorino Abruzzese).

J. Appl. Microbiol. **101**, 353-360

[CLARK, N. C.](#), [HILL, B. C.](#), [O'HARA, C. M.](#), [STEINGRIMSSON, O.](#), [COOKSEY, R. C.](#)

(1990):

Epidemiologic typing of *Enterobacter sakazakii* in two neonatal nosocomial outbreaks.

[Diagn. Microbiol. Infect. Dis.](#) **13**, 467-472

COIGNARD, B., VAILLANT, V., VINCENT, J-P., LEFLÈCHE, A., MARIANI-KURKDJIAN, P., BERNET, C., L'HÉRITEAU, F., SÉNÉCHAL, H., GRIMONT, P., BINGEN, E., & DESENCLOS, J-C. (2006):

Infections sévères à *Enterobacter sakazakii* chez des nouveau-nés ayant consommé une préparation en poudre pour nourrissons.

Bulletin Épidémiologique Hebdomadaire Heft 2-3, 10-13

CORTI, G., PANUNZI, I., LOSCO, M., BUZZI, R. (2007):

Postsurgical osteomyelitis caused by *Enterobacter sakazakii* in a healthy young man.

J. Chemother. **19**, 94-96

DENNISON, S. K., MORRIS, J. (2002):

Multiresistant *Enterobacter sakazakii* wound infection in an adult.

Infect. Med. **19**, 533-535

DE SILVA, D., REISER, A., HERRMANN, M., TABITI, K., WITTEW, C. (1998): Rapid genotyping and quantification on LightCycler with hybridization probes.

Biochemica Heft **2**, 12-15

DIN EN ISO 16140 (2003):

Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln – Arbeitsvorschrift für die Validierung alternativer Verfahren.

DRUDY, D., O'ROURKE, M., MURPHY, M., MULLANE, N. M., O'MAHONY, R., KELLY, L., FISCHER, M., SANJAQ, S., SHANNON, P., WALL, P., O'MAHONY, M., WHYTE, P., FANNING, S. (2006):

Characterization of collection of *Enterobacter sakazakii* isolates from environmental and food sources.

Int. J. Food Microbiol. **110**, 127-134

EDELSON-MAMMEL, S. , PORTEOUS, M. K., BUCHANAN, R. L. (2006):

Acid resistance of twelve strains of *Enterobacter sakazakii*, and the impact of habituating the cells to an acide environment.

J. Food Sci. **71**, M201-M207

FAO/WHO (2004):

Enterobacter sakazakii and other mikroorganisms in powdered infant formula. Meeting report. Microbiological Risk Assessment Series 6.

http://www.fao.org/ag/agn/agns/jemra_riskassessment_enterobacter_en.asp

FAO/WHO (2006):

Enterobacter sakazakii and *Salmonella* in powdered infant formula: Meeting report. Microbiological Risk Assessment Series 10.

http://www.fao.org/ag/agn/agns/jemra_riskassessment_enterobacter_en.asp

FARMER, J. J., ASBURY, M. A., HICKMAN, F. W., BRENNER, D. J., ENTEROBACTERIACEAE STUDY GROUP (1980):

Enterobacter sakazakii. A new species of "*Enterobacteriaceae*" isolated from clinical specimens.

Int. J. Syst. Bacteriol. **30**, 569-584

FARMER, J. J., DAVIS, B. R., HICKMAN-BRENNER, F. W. (1985):

Biochemical identification of new species and biogroups of *Enterobacteriaceae* isolated from clinical specimens.

J. Clin. Microbiol. **21**, 46-76

FDA (2003):

FDA field survey of powdered formula manufacturing.

Zitiert nach FAO/WHO (2006)

FDA/CFSAN (2002):

Isolation and Enumeration of *Enterobacter sakazakii* from Dehydrated Powdered Infant Formula. July 2002; revised August 2002.

<http://www.cfsan.fda.gov/~comm/mmesakaz.html>

FRICKER, M., MESSELHÄUßER, U., BUSCH, U., SCHERER, S., EHLING-SCHULZ, M. (2007):

Diagnostic real-time pcr assays for the detection of emetic *Bacillus cereus* strains in foods and recent food-borne outbreaks.

Appl. Environ. Microbiol. **73**, 1892-1898

FRIEDEMANN, M. (2007):

Enterobacter sakazakii in food and beverages (other than infant formula and milk powder).

Int. J. Food Microbiol. **116**, 1-10

GONZALEZ, S., FLICK, G. J., ARRITT, F. M., HOLLIMAN, D., MEADOWS, B. (2006):

Effect of high-pressure processing on strains of *Enterobacter sakazakii*.

J. Food Prot. **69**, 935-937

GUILLAUME-GENTIL, O., SONNARD, V., KANDHAI, M. C., MARUGG, J. D., JOOSTEN, H. (2005):

A simple and rapid cultural method for detection of *Enterobacter sakazakii* in environmental samples.

J. Food Prot. **68**, 64-69

HAMILTON, J. V., LEHANE, M. J., BRAIG, H. R. (2003):

Isolation of *Enterobacter sakazakii* from midgut of *Stomoxys calcitrans*.

Emerg. Infect. Dis. **9**, 1355-1356

HAWKINS, R. E., LISSNER, C. R., SANFORD, J. P. (1991):

Enterobacter sakazakii bacteremia in an adult.

South Med. J. **84**, 793-795

HEUVELINK, A. E., ZWARTKRUIS-NAHUIS, J. T. M., VAN DER A, H., WIT, B., VAN OOSTEROM, R., DE BOER, E. (2003):

Handhavingsactie *Enterobacter sakazakii* in zuigelingenvoeding. Projektnummer: OT02108 p.

Zitiert nach FAO/WHO (2006)

HEUVELINK, A. E., MOES, H., TILBURG, J. J. H. C., DE BOER, E. (2004):

Handhavingsactie *Enterobacter sakazakii* in poedervormige producten.

Voedsel en Waren Autoriteit/Keuringsdienst van Waren Oost, Projektnummer: OT03H006

www.vwa.nl/cdlpub/servlet/CDLServlet?p_file_id=10443

ICMSF (INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS) (2002):

Microorganisms in food 7: Microbiological testing in food safety management.

Kluwer Academic/Plenum Publishers, Springer, The Netherlands

ISO/TS 22964 | IDF/RM 210 (2006)

Milk and milk products - Detection of *Enterobacter sakazakii*

IVERSEN, C., FORSYTHE, S. J. (2003):

Risk profile of *Enterobacter sakazakii*, an emergent pathogen associated with infant milk formula.

Trends Food Sci. Technol. **14**, 443-454

IVERSEN, C., FORSYTHE, S. (2004):

Isolation of *Enterobacter sakazakii* and other *Enterobacteriaceae* from powdered infant formula milk and related products.

Food Microbiol. **21**, 771-777

IVERSEN, C., FORSYTHE, S. J. (2007):

Comparison of media for the isolation of *Enterobacter sakazakii*.

Appl. Environ. Microbiol. **73**, 48-52

IVERSEN, C., DRUGGAN, P., FORSYTHE, S. J. (2004a):

A selective differential medium for *Enterobacter sakazakii*, a preliminary study.

Int. J. Food Microbiol. **96**, 133-139

IVERSEN, C., LANE, M., FORSYTHE, S. J. (2004b):

The growth profile, thermotolerance and biofilm formation of *Enterobacter sakazakii* grown in infant formula milk.

Lett. Appl. Microbiol. **38**, 378-382

IVERSEN, C., WADDINGTON, M., ON, S. L. W., FORSYTHE, S. J. (2004c):

Identification and phylogeny of *Enterobacter sakazakii* relative to *Enterobacter* and *Citrobacter* species.

J. Clin. Microbiol. **42**, 5368-5370

IVERSEN, C., LEHNER, A., MULLANE, N., BIDLAS, E., CLEENWERCK, I., MARUGG, I., FANNING, S., STEPHAN, R., JOOSTEN, H. (2007):

The taxonomy of *Enterobacter sakazakii*: proposal of a new genus *Cronobacter* gen. nov. and descriptions of *Cronobacter sakazakii* comb. nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. *sakazakii*, comb. nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. *malonaticus* subsp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov. and *Cronobacter* genomospecies 1.

www.biomedcentral.com/1471-2148/7/64

JUNG, M.-K., PARK, J. H. (2006):

Prevalence and thermal stability of *Enterobacter sakazakii* from unprocessed ready-to-eat agricultural products and powdered infant formulas.

Food Sci. Biotechnol. **15**, 152-157

KÄMPF, P. (2006)

Persönliche Mitteilung: Rückruf von Kindernahrung nach Nachweis von *Enterobacter sakazakii*.

Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Dienststelle
Oberschleißheim

KANDHAI, M. C., REIJ, M. W., GORRIS, L. G. M., GUILLAUME-GENTIL, O., VAN SCHOTHORST, M. (2004):

Occurrence of *Enterobacter sakazakii* in food production environments and households.
Lancet **363**, 39-40

KANDHAI, M. C., REIJ, M. W., GROGNOU, C., VAN SCHOTHORST, M., GORRIS, L. G. M., ZWIETERING, M. H. (2006):

Effects of preculturing conditions on lag time and specific growth rate of *Enterobacter sakazakii* in reconstituted powdered infant formula.

Appl. Environ. Microbiol. **72**, 2721-2729.

KIM, H., BEUCHAT, L. R. (2005):

Survival and growth of *Enterobacter sakazakii* on fresh-cut fruits and vegetables and in unpasteurized juices as affected by storage temperature.

J. Food Prot. **68**, 2541-2552

KIM, H., RYU, J. H., BEUCHAT, L. R. (2006):

Attachment of and biofilm formation by *Enterobacter sakazakii* on stainless steel and enteral feeding tubes.

Appl. Environ. Microbiol. **72**, 5846-5856

KRESS, C., ESTUNINGSIH, E., HASSAN, A., AKINEDEN, Ö., SCHNEIDER, E., BECKER, H., USLEBER, E. (2004): Bedeutung und Nachweis von *Enterobacter sakazakii* in Säuglingsnahrung.

Tagungsbericht der 45. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes "Lebensmittelhygiene" der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft, Garmisch-Partenkirchen, 28. Sept. – 1. Okt., pp. 235-240

KUZINA, L. V., PELOQUIN, J. J., VACEK, D. C., MILLER, T. A. (2001):

Isolation and identification of bacteria associated with adult laboratory Mexican fruit flies, *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae)

Curr. Microbiol. **42**, 290-294

LAI, K. K.; (2001):

Enterobacter sakazakii infections among neonates, infants, children, and adults. Case reports and a review of the literature.

Medicine **80**, 113-122

LECLERCQ, A., WANEGUE, C., BAYLAC, P. (2002):

Comparison of fecal coliform agar and violet red bile lactose agar for fecal coliform enumeration in foods.

Appl. Environ. Microbiol. **68**, 1631-1638

LEHNER, A., STEPHAN, R. (2004):

Microbiological, epidemiological and food safety aspects of *Enterobacter sakazakii*.

J. Food Prot. **67**, 2850-2857

LEHNER, A., RIEDEL, K., EBERL, L., BREEUWER, P., DIEP, B., STEPHAN, R. (2005):

Biofilm formation, extracellular polysaccharide production, and cell-to-cell signaling in various *Enterobacter sakazakii* strains: aspects promoting environmental persistence.

J. Food Prot. **68**, 2287-2294

LEITSÄTZE FÜR SPEISEEIS UND SPEISEEISHALBERZEUGNISSE vom 19. Oktober 1993.

Zuletzt geändert durch Leitsatz-Änd. vom 27. 11. 2002. (GMBI S. 150)

LENATI, R., HERBERT, K., HOUGHTON, L., O'CONNOR, D. L., FARBER, J. M., PAGOTTO, F. (2005):

The survival and growth of *Enterobacter sakazakii* in human breast milk and powdered infant formula.

J. Food Prot. **68** Sup. A, 83

Zitiert nach FAO/WHO (2006)

LENATI, R., LIN, M., FARBER, J. M., PAGOTTO, F. (2006):

Development of a non-primate animal model for *Enterobacter sakazakii* infection. Abstract IAFP Annual meeting, Calgary, Alberta, 13.-16. August 2006

Zitiert nach FAO/WHO (2006):

LIU, Y., CAI, X., ZHANG, X., GAO, Q., YANG, X., ZHENG, Z., LUO, M., HUANG, X. (2006):

Real time PCR using TaqMan and SYBR Green for detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula.

J. Microbiol. Meth. **65**, 21-31

MANGE, J. P., STEPHAN, R., BOREL, N., WILD, P., KIM, K. S., POSPISCHIL, A., LEHNER, A. (2006):

Adhesive properties of *Enterobacter sakazakii* to human epithelial and brain microvascular endothelial cells.

BMC Microbiol. **6**, 58 ff.

MESSELHÄUßER, U., FRICKER, M., EHLING-SCHULZ, M., ZIEGLER, H., ELMER-ENGELHARD, D., KLEIH, W., BUSCH, U. (2007):

Real-Time-PCR-System zum Nachweis von *Bacillus cereus* (emetischer Typ) in Lebensmitteln.

J. Verbraucherschutz Lebensmittelsicherheit **2**, 191-193

MONROE, P. W., TIFT, W. L. (1979):

Bacteremia associated with *Enterobacter sakazakii* (yellow-pigmented *Enterobacter cloacae*).

J. Clin. Microbiol. **10**, 850-851

MOSSO, D. L. A., DA LA ROSA, M. D. C., VIVAR, C., MEDINA, M. D. R. (1994):

Heterotrophic bacterial populations in the mineral waters of thermal springs in Spain. J.

Appl. Bacteriol. **77**, 370-381

MUYTJENS, H. L., ROELOFS-WILLEMSE, H., JASPAR, G. H. (1988):

Quality of powdered substitutes for breast milk with regard to the members of the family *Enterobacteriaceae*.

J. Clin. Microbiol., **26**, 743-746

MUYTJENS, H. L., VAN DER ROS-VAN DE REPE, J., VAN DRUTEN, H. A. M. (1984):

Enzymatic profiles of *Enterobacter sakazakii* and related species with special reference to the alpha-glucosidase reaction and reproducibility of the test system.

J. Clin. Microbiol. **20**, 684-686

MUYTJENS, H. L., ZANEN, H. C., SONDERKAMP, H. J., KOLEE, L. A., WACHSMUTH, I. K., FARMER, J. J. (1983):

Analysis of eight cases of neonatal meningitis and sepsis due to *Enterobacter sakazakii*.

J. Clin. Microbiol. **18**, 115-120

NAIR, M. K. M., VENKITANARAYANAN, K. S. (2006):

Cloning and sequencing of the *ompA* Gene of *Enterobacter sakazakii* and development of an *ompA*-targeted PCR for rapid detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula.

Appl. Environ. Microbiol. **72**, 2539-2546

NAZAROWEC-WHITE, M., FARBER, J. M. (1997a):

Thermal resistance of *Enterobacter sakazakii* in reconstituted dried-infant formula.

Lett. Appl. Microbiol. **24**, 9-13

NAZAROWEC-WHITE, M., FARBER, J. M. (1997b):

Incidence, survival, and growth of *Enterobacter sakazakii* in reconstituted dried-infant formula.

J. Food Prot. **60**, 226-230

NAZAROWEC-WHITE, M., FARBER, J. M. (1999):

Phenotypic and genotypic typing of food and clinical isolates of *Enterobacter sakazakii*.

J. Med. Microbiol. **48**, 559-567

PAGOTTO, F. J., NAZAROWEC-WHITE, M., BIDAVID, S., FARBER, J. M. (2003):
Enterobacter sakazakii: infectivity and enterotoxin production in vitro and in vivo.
J. Food Prot. **66**, 370-375

RESTAINO, L., FRAMPTON, E. W., LIONBERG, W. C., BECKER, R. J. (2006):
A chromogenic plating medium for the isolation and identification of *Enterobacter sakazakii* from food, food ingredients, and environmental sources.
J. Food. Prot. **69**, 315-322

SAGNER, G., GOLDSTEIN, C., VAN MILTENBURG, R. (1999):
Detection of multiple reporter dyes in real-time, online PCR analysis with the LightCycler system.
Biochemica Heft 2, 7-11

SANTOS, R. (2006):
Determination of *Enterobacter sakazakii* in powdered infant formula, reconstituted and utensils used in baby's bottle preparation.
Poster P1-38. IAFP (International Association for Food Protection), 13. – 16. Aug. 2006, Calgary, Canada
Zitiert nach FAO/WHO (2006)

SCHINDLER, P. (2006):
Persönliche Mitteilung: Aufstellung der "häufigsten" coliformen Bakterienarten ohne *E. coli* in unterschiedlichen Wasserproben aus Südbayern,
Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Dienststelle Oberschleißheim

SECURITE ALIMENTAIRE – GRAND-DUCHE DE LUXEMBOURG (2005):
Laits en poudre contaminés par *Enterobacteriaceae*.
http://www.securite-alimentaire.public.lu/actualites/alertes/2005/10/laits_enterobacteries/index.html?highlight=Enterobacteriaceae

SEE, K. C., THAN, H. A., TANG, T. (2007):

Enterobacter sakazakii bacteraemia with multiple splenic abscesses in a 75-year-old woman: a case report.

Age Aging July 23, 2007; Epub ahead of print

Zitiert nach PubMed, PMID: 17646217

SIMMONS, B. P., GELFAND, M. S., HAAS, M.; METTS, L., FERGUSON, J. (1989):

Enterobacter sakazakii infections in neonates associated with intrinsic contamination of a powdered infant formula.

Infect. Control Hosp. Epidemiol. **10**, 398-401

STOLL, B. J., HANSEN, N., FANAROFF, A. A., LEMONS, J. A. (2004):

Enterobacter sakazakii is a rare cause of septicemia or meningitis in VLBW infants.

J. Pediatr., **144**, 821-823

STREYER, L. (1996):

Der molekulare Bauplan des Lebens - die Erforschung der Gene.

In: STREYER, L. (1999): Biochemie (1. korrigierter Nachdruck 1999 der 4. Auflage 1996) 123-152, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg - Oxford - Berlin

TOWNSEND, S., CAUBILLA BARRON, J., LOC-CARRILLO, C., FORSYTHE, S. (2007):

The presence of endotoxin in powdered infant formula milk and the influence of endotoxin and *Enterobacter sakazakii* on bacterial translocation in the infant rat.

Food Microbiol. **24**, 67-74

URMENYI, A. M. C., FRANKLIN, A. W. (1961):

Neonatal death from pigmented coliform infection.

Lancet **1**, 313-315

VAN ACKER, J., DE SMET, F., MUYLDERMANS, G., NAESSENS, A., LAUWERS, S. (2001):

Outbreak of necrotizing enterocolitis associated with *Enterobacter sakazakii* in powdered milk formula.

J. Clin. Microbiol. **39**, 293-297

Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 der Kommission vom 15. November 2005 über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel.

Amtsblatt der Europäischen Union, L 338/1, 22.12.2005, DE

ZOGAJ, X., BOKRANZ, W., NIMTZ, M., RÖMLING, U. (2003):

Production of cellulose and curli fimbriae by members of the family *Enterobacteriaceae* isolated from the human gastrointestinal tract.

Infect. Immun. **71**, 4151-4158

9 ANHANG

Tabelle 1a: Positive Eisproben: Übersicht der Einzeluntersuchungen

Probennummer	Eissorte	Kultureller Nachweis auf ESIA-Agar		real-time-PCR nach Heuvelink et al., 2004		real-time-PCR nach Liu et al., 2006	
		aus GPW	aus mLST	aus GPW	aus mLST	aus GPW	aus mLST
46	ME Zabaione	+	n.d.	+/+	n.d.	+/+	n.d.
59	ME Amarena-Kirsch	+	n.d.	+/+	n.d.	+/+	n.d.
90	ME Joghurt	+	n.d.	+/+	n.d.	+/+	n.d.
91	ME Latte macchiato	+	n.d.	+/+	n.d.	+/+	n.d.
179	ME Melone	+	n.d.	+/+	n.d.	+/+	n.d.
181	ME Kokos	+	n.d.	+/+	n.d.	+/+	n.d.
191	ME Schokolade	+	n.d.	+/+	n.d.	+/+	n.d.
195	ME Mozartkugel	+	n.d.	+/+	n.d.	+/+	n.d.
289	ME Walnuss	+	n.d.	+/+	n.d.	+/+	n.d.
290	ME Mozartkugel	+	n.d.	+/+	n.d.	+/+	n.d.
329	ME Krokant	+	n.d.	+/+	n.d.	+/+	n.d.
333	ME Amarena-Kirsch	+	n.d.	+/+	n.d.	+/+	n.d.
437	FE Apfelsine	+	n.d.	+/+	n.d.	+/+	n.d.
456	ME Joghurt	+	n.d.	+/+	n.d.	+/+	n.d.
529	ME Stracciatella	+	n.d.	-/-	n.d.	+/+	n.d.
530	ME Joghurt	+	n.d.	+/+	n.d.	+/+	n.d.
634	ME Cappuccino	+	n.d.	+/+	n.d.	+/+	n.d.
635	ME Gianduja	+	n.d.	+/+	n.d.	+/+	n.d.
687	ME Raffaello	+	n.d.	+/+	n.d.	+/+	n.d.
688	ME Red Bull	+	n.d.	+/+	n.d.	+/+	n.d.
703	ME Orange	+	n.d.	+/+	n.d.	+/+	n.d.
705	ME Stracciatella	+	+	-/-	-/-	+/+	+/+
706	ME Malaga	+	+	+/+	+/+	+/+	+/+
770	Sahneeis	+	n.d.	+/+	n.d.	+/+	n.d.
870	ME Weiße Schokolade	+	n.d.	+/+	n.d.	+/+	n.d.
871	ME Malaga	+	n.d.	+/+	n.d.	+/+	n.d.
911	ME Nuss	+	n.d.	+/+	n.d.	+/+	n.d.
927	ME Kokos	+	n.d.	+/+	n.d.	+/+	n.d.
943	ME Malaga	-	+	+/+	+/+	+/+	+/+
947	ME Mozartkugel	+	+	+/+	+/+	+/+	+/+
970	ME Vanille	+	n.d.	+/+	n.d.	+/+	n.d.
1015	ME Heidelbeere	-	+	+/+	+/+	+/+	+/+
1036	ME Vanille	+	+	+/+	+/+	+/+	+/+
1094	ME Melone	+	n.d.	+/+	n.d.	+/+	n.d.
1109	FE Kiwi mit Milch	+	+	+/+	+/+	+/+	+/+
1115	ME Amarena-Kirsch	+	+	+/+	+/+	+/+	+/+
1152	ME Pistazie	+	+	+/+	+/+	+/+	+/+

ME: Milcheis GPW: gepuffertes Peptonwasser
 FE: Fruchteis mLST: mod.. Laurylsulfat-Tryptose-Bouillon

+/+ : positiv im Doppelansatz
 + : positiv
 n.d. : nicht durchgeführt

Tabelle 1b: Positive Eisproben: Übersicht der Einzeluntersuchungen

Probennummer	Eissorte	API (%)	Phönix (%)	TSA
46	ME Zabaione	98,4	n.d.	gelb
59	ME Amarena-Kirsch	82,1	n.d.	gelb
90	ME Joghurt	98,4	n.d.	gelb
91	ME Latte macchiato	98,4	n.d.	gelb
179	ME Melone	98,4	n.d.	gelb
181	ME Kokos	69,1	99,0	gelb
191	ME Schokolade	51,1	99,0	gelb
195	ME Mozartkugel	51,1	99,0	gelb
289	ME Walnuss	98,4	99,0	gelb
290	ME Mozartkugel	51,1	99,0	gelb
329	ME Krokant	98,4	99,0	gelb
333	ME Amarena-Kirsch	51,1	99,0	gelb
437	FE Apfelsine	51,1	99,0	gelb
456	ME Joghurt	99,5	99,0	gelb
529	ME Stracciatella	60,3	99,0	gelb
530	ME Joghurt	60,3	99,0	gelb
634	ME Cappuccino	98,4	n.d.	gelb
635	ME Gianduja	98,4	n.d.	gelb
687	ME Raffaello	98,4	n.d.	gelb
688	ME Red Bull	98,4	n.d.	gelb
703	ME Orange	98,4	n.d.	gelb
705	ME Stracciatella	51,1	99,0	gelb
706	ME Malaga	51,1	99,0	gelb
770	Sahneeis	51,1	99,0	gelb
870	ME Weiße Schokolade	51,1	99,0	gelb
871	ME Malaga	51,1	99,0	gelb
911	ME Nuss	51,1	99,0	weiß
927	ME Kokos	98,4	n.d.	gelb
943	ME Malaga	98,4	n.d.	gelb
947	ME Mozartkugel	51,1	99,0	gelb
970	ME Vanille	51,1	99,0	gelb
1015	ME Heidelbeere	98,4	n.d.	gelb
1036	ME Vanille	98,4	n.d.	gelb
1094	ME Melone	98,4	n.d.	gelb
1109	FE Kiwi mit Milch	98,4	n.d.	gelb
1115	ME Amarena-Kirsch	98,4	n.d.	gelb
1152	ME Pistazie	98,4	99,0	gelb

Legende siehe Tab. 1a

Tabelle 2a: Kultureller Vergleich bei 77 Proben - alleinige Anreicherung in GPW bzw. Selektivanreicherung mLST

Probennummer	ESIA aus GPW	Bgl. Flora GPW	ESIA aus mLST	Bgl. Flora mLST
705	(+)	+++	+	+
706	++	++	+++	++
941	-	+++	-	+++
943	-	+++	++	+
944	-	+++	-	+++
945	-	+++	-	++
946	-	++	-	++
947	+++	-	+++	-
953	-	++	-	++
954	-	+++	-	++
955	-	+++	-	+++
976	-	+++	-	+++
977	-	+++	-	+++
978	-	++	-	+++
998	-	+	-	+++
999	-	-	-	-
1000	-	-	-	-
1001	-	++	-	++
1002	-	+	-	-
1009	-	-	-	+
1010	-	+	-	-
1011	-	-	-	-
1012	-	++	-	++
1013	-	++	-	+++
1014	-	+++	-	+++
1015	-	+++	+++	++
1016	-	+++	-	+++
1017	-	++	-	+++
1018	-	++	-	+++
1034	-	-	-	+
1035	-	+	-	+++
1036	+++	+	+++	+
1037	-	+++	-	+++
1038	-	+++	-	++
1039	-	+++	-	+++
1040	-	+++	-	+++
1041	-	+	-	-
1042	-	++	-	+++
1043	-	+++	-	+++
1052	-	-	-	-
1053	-	+	-	+
1059	-	+++	-	+++
1060	-	-	-	+

1061	-	+	-	-
Probennummer	ESIA aus GPW	Bgl. Flora GPW	ESIA aus mLST	Bgl. Flora mLST
1062	-	+	-	++
1063	-	+	-	+
1084	-	++	-	++
1085	-	+++	-	++
1086	-	+++	-	++
1087	-	+++	-	++
1088	-	+++	-	++
1098	-	+	-	++
1099	-	+	-	+++
1100	-	+++	-	+++
1101	-	++	-	++
1102	-	+++	-	+++
1103	-	++	-	++
1104	-	++	-	++
1105	-	-	-	-
1106	-	++	-	++
1107	-	+++	-	+++
1108	-	++	-	+
1109	++	+	+++	+
1110	-	++	-	++
1111	-	++	-	++
1112	-	++	-	++
1113	-	-	-	-
1114	-	+++	-	+++
1115	++	+	+++	+
1116	-	+	-	-
1117	-	-	-	-
1128	-	-	-	-
1129	-	-	-	-
1152	++	+	++	+
1153	-	++	-	-
1154	-	+	-	+
1155	-	+	-	-

GPW: gepuffertes Peptonwasser
 mLST: mod. Laurylsulfat-Tryptose-Bouillon
 Bgl. Flora: Begleitflora ++: 31 – 190 Kolonien
 (+): 1 – 3 Kolonien +++: > 190 Kolonien
 +: 4 – 30 Kolonien -: negativ

Tabelle 2b: PCR-Vergleich bei 77 Proben – alleinige Anreicherung in GPW bzw. Selektivanreicherung mLST

Probennummer	real-time-PCR nach Heuvelink et al., 2004		real-time PCR nach Liu et al., 2006	
	aus GPW	aus mLST	aus GPW	aus mLST
705	-/-	-/-	+/+	+/+
706	+/+	+/+	+/+	+/+
941	-/-	-/-	-/-	-/-
943	+/+	+/+	+/+	+/+
944	-/-	-/-	-/-	-/-
945	-/-	-/-	-/-	-/-
946	-/-	-/-	-/-	-/-
947	+/+	+/+	+/+	+/+
953	-/-	-/-	-/-	-/-
954	-/-	-/-	-/-	-/-
955	-/-	-/-	-/-	-/-
976	-/-	-/-	-/-	-/-
977	-/-	-/-	-/-	-/-
978	-/-	-/-	-/-	-/-
998	-/-	-/-	-/-	-/-
999	-/-	-/-	-/-	-/-
1000	-/-	-/-	-/-	-/-
1001	-/-	-/-	-/-	-/-
1002	-/-	-/-	-/-	-/-
1009	-/-	-/-	-/-	-/-
1010	-/-	-/-	-/-	-/-
1011	-/-	-/-	-/-	-/-
1012	-/-	-/-	-/-	-/-
1013	-/-	-/-	-/-	-/-
1014	-/-	-/-	-/-	-/-
1015	+/+	+/+	+/+	+/+
1016	-/-	-/-	-/-	-/-
1017	-/-	-/-	-/-	-/-
1018	-/-	-/-	-/-	-/-
1034	-/-	-/-	-/-	-/-
1035	-/-	-/-	-/-	-/-
1036	+/+	+/+	+/+	+/+
1037	-/-	-/-	-/-	-/-
1038	-/-	-/-	-/-	-/-
1039	-/-	-/-	-/-	-/-
1040	-/-	-/-	-/-	-/-
1041	-/-	-/-	-/-	-/-
1042	-/-	-/-	-/-	-/-
1043	-/-	-/-	-/-	-/-
1052	-/-	-/-	-/-	-/-
1053	-/-	-/-	-/-	-/-
1059	-/-	-/-	-/-	-/-

Probennummer	real-time-PCR nach Heuvelink et al., 2004		real-time PCR nach Liu et al., 2006	
	aus GPW	aus mLST	aus GPW	aus mLST
1060	-/-	-/-	-/-	-/-
1061	-/-	-/-	-/-	-/-
1062	-/-	-/-	-/-	-/-
1063	-/-	-/-	-/-	-/-
1084	-/-	-/-	-/-	-/-
1085	-/-	-/-	-/-	-/-
1086	-/-	-/-	-/-	-/-
1087	-/-	-/-	-/-	-/-
1088	-/-	-/-	-/-	-/-
1098	-/-	-/-	-/-	-/-
1099	-/-	-/-	-/-	-/-
1100	-/-	-/-	-/-	-/-
1101	-/-	-/-	-/-	-/-
1102	-/-	-/-	-/-	-/-
1103	-/-	-/-	-/-	-/-
1104	-/-	-/-	-/-	-/-
1105	-/-	-/-	-/-	-/-
1106	-/-	-/-	-/-	-/-
1107	-/-	-/-	-/-	-/-
1108	-/-	-/-	-/-	-/-
1109	+/+	+/+	+/+	+/+
1110	-/-	-/-	-/-	-/-
1111	-/-	-/-	-/-	-/-
1112	-/-	-/-	-/-	-/-
1113	-/-	-/-	-/-	-/-
1114	-/-	-/-	-/-	-/-
1115	+/+	+/+	+/+	+/+
1116	-/-	-/-	-/-	-/-
1117	-/-	-/-	-/-	-/-
1128	-/-	-/-	-/-	-/-
1129	-/-	-/-	-/-	-/-
1152	+/+	+/+	+/+	+/+
1153	-/-	-/-	-/-	-/-
1154	-/-	-/-	-/-	-/-
1155	-/-	-/-	-/-	-/-

GPW: gepuffertes Peptonwasser
mLST: mod. Laurylsulfat-Tryptose-Bouillon
+/+: positiv im Doppelansatz
+/-: positiv/negativ im Doppelansatz
-/-: negativ im Doppelansatz

Tabelle 3: Aufteilung der positiven Proben nach Eissorten und Geschmacksrichtungen

Eissorte	Probenanzahl gesamt	Probenanzahl positiv
ME Schokolade	104	1
ME Vanille	91	2
ME Stracciatella	87	2
ME Nuss	63	1
ME Malaga	53	3
ME Amarena-Kirsch	41	3
ME Joghurt	40	3
ME Pistazie-Geschmack	30	1
ME Walnuss	22	1
ME Mozartkugel	21	3
ME Cappuccino	20	1
ME Kokos	14	2
ME Zabaione	10	1
ME Latte macchiato	9	1
ME Weiße Schokolade	7	1
ME Krokant	6	1
ME Gianduja	2	1
ME Raffaello	1	1
ME Orange	1	1
ME Heidelbeere	1	1
ME Red Bull	1	1
ME Melone	1	1
FE Melone	3	1
FE Apfelsine	1	1
FE Kiwi mit Milch	1	1
Sahneeis	1	1

ME: Milcheis
FE: Fruchteis

DANKSAGUNG

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Erwin Märtlbauer für die Möglichkeit, dieses Thema zu bearbeiten.

Sehr herzlich danke ich Herrn Dr. Heinz Becker für die fachliche Betreuung und engagierte Hilfestellung bei der Abfassung und Fertigstellung dieser Arbeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. Ute Messelhäuser für die umfassende Betreuung, vor allem bei Fragen rund um die PCR, sowie die stets gewährte Unterstützung und Aufmunterung.

Danken möchte ich auch Herrn Dr. Peter Kämpf, der die Idee zu dieser Dissertation hatte, sowie Herrn Dr. Wolfgang Kleih. Durch ihre Unterstützung wurde mir das Arbeiten im Milch- und Lebensmittellabor ermöglicht. Mein Dank gilt des Weiteren Frau Prof. Christiane Höller, die mir die Möglichkeit gegeben hat, die Dissertation in ihrem Sachgebiet anzufertigen.

Allen Mitarbeiterinnen des Milch- und Lebensmittellabors, vor allem Frau Barbara Wagner und Frau Brigitte Blümlein danke ich für die beratende Unterstützung bei der praktischen Durchführung dieser Arbeit.

Von ganzem Herzen danke ich meiner Mama und meiner Oma, die mich schon immer unterstützt haben.

LEBENS LAUF

Name: Iris Barbara Kraemer

Geburtsdatum: 8. Januar 1977

Geburtsort: München

Eltern: Lucia Kraemer, geb. Kraus
Klaus Kraemer

Schul Ausbildung: 1983 - 1987 Grundschule St. Korbinian, Freising
1987 - 1996 Cammerloher-Gymnasium, Freising

Ausbildung: 1996 - 1998 Ausbildung zur Tierarzthelferin
in der Tierärztlichen Klinik
Dr. med. vet. P. Skorski
Dr. med. vet. F. X. Wittmann

Berufsschule für Tierarztpraxen, München

1998 - 2005 Studium der Tiermedizin an der Tierärztlichen
Fakultät der LMU, München

Staatsexamen: 21. April 2005

Approbation: 19. Mai 2005

Dissertation: seit September 2005 am Bayerischen Landesamt für
Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Dienststelle
Oberschleißheim