

Justus-Liebig-Universität Gießen

Fachbereich Veterinärmedizin

Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde

***Cronobacter* spp. in Lebensmitteln: Vorkommen, Nachweis
und Bedeutung für die Lebensmittelsicherheit unter
besonderer Berücksichtigung von Säuglingsnahrung**

Habilitationsschrift

zur Erlangung der Lehrbefähigung für die Fächer

Milchhygiene und Lebensmittelhygiene

im Fachbereich Veterinärmedizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Dr. med. vet. Ömer Akineden

Gießen 2025

Meiner wunderbaren Tochter Ayla



Inhalt

Inhaltsverzeichnis	I
Tabellen- und Abbildungsverzeichnis	IV
1 Einleitung	1
1.1 Genus <i>Cronobacter</i> spp.	3
1.1.1 Taxonomische Einordnung von <i>Cronobacter</i> spp.	3
1.1.2 Morphologie, kulturelle und biochemische Eigenschaften	6
1.1.3 Serotypen.....	10
1.1.4 Tenazität	13
1.1.5 Biofilmbildung.....	17
1.1.6 Virulenzfaktoren, Pathogenität	19
1.1.7 Adhäsion und Invasion	24
1.1.8 Außenmembranproteine.....	26
1.1.9 Endo- und Enterotoxine	28
1.1.10 Hämolyisin	29
1.1.11 Antibiotika-Resistenzentwicklung	30
1.2 Die Bedeutung von <i>Cronobacter</i> spp. als bakterielle Gefahr für die öffentliche Gesundheit	31
1.2.1 Definition der gefährdeten Bevölkerungsgruppe	34
1.2.2 Infektionen bei Säuglingen oder Neugeborenen.....	34
1.2.3 Infektionen bei Erwachsenen	41
1.3 Vorkommen	42
1.3.1 Vorkommen in Säuglingsnahrungsmitteln	42
1.3.2 Rechtliche Einordnung und Nationale Vorschriften für Säuglingsanfangsnahrung.....	44
1.3.3 Vorkommen in der Umwelt und in Lebensmitteln.....	47

1.4 Nachweis von <i>Cronobacter</i> spp.	57
1.4.1 Kulturelle Isolierungsmethoden	57
1.4.2 Identifizierungsmethoden	60
1.4.2.1 Biochemische Identifizierung	60
1.4.2.2 PCR basierte Identifizierungsverfahren	61
1.4.2.3 Enzym-Immuno-Assay-Methoden	64
1.4.2.4 MALDI-TOF MS	65
1.5 Typisierung von <i>Cronobacter</i> -Isolaten	66
1.5.1 Biotypisierung anhand von phänotypischen Tests	67
1.5.2 O-Antigen Serotypisierung	67
1.5.3 Multilocus Sequence Typing	69
1.5.4 <i>fusA</i> -Allele Sequenzierung	75
1.5.5 <i>rpoB</i> -Allele Sequenzierung	75
1.5.6 Makrorestriktionsfragmentanalyse mittels Pulsfeld Gelelektrophorese	75
1.5.7 Ganzgenomsequenzierung	76
1.5.8 DNA-Microarray	76
2 Konzeption dieser Arbeit und Liste der verwendeten Publikationen	78
2.1 Konzeption dieser Arbeit	78
2.2 Liste der verwendeten Publikationen	79
2.2.1 Vorkommen und Typisierung der <i>Cronobacter</i> spp. in Säuglingsnahrungsmitteln und Lebensmitteln	79
2.2.2 Entwicklung von Schnellnachweisverfahren von <i>Cronobacter</i> spp. in Säuglingsnahrungsmitteln	80
3 Ergebnisse und Diskussion	81
3.1 Vorkommen und Typisierung der <i>Cronobacter</i> spp. in Säuglingsnahrungsmitteln und Lebensmitteln	81
3.2 Entwicklung von molekularbasierten Schnellnachweisverfahren von <i>Cronobacter</i> spp. in Säuglingsnahrungsmitteln	104

4 Zusammenfassung	113
5 Summary	118
6 Literaturverzeichnis	123
7 Anhang	165
Danksagung	220

Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

Tabelle 1: Taxonomische Einteilung von <i>Cronobacter</i> spp.	5
Tabelle 2: Phänotypische Eigenschaften zur Differenzierung von <i>Cronobacter</i> spp. (Zusammengestellt nach Farmer <i>et al.</i> , 1980; Ivesen <i>et al.</i> , 2006, 2008; Stephan <i>et al.</i> , 2007, 2008; Joseph <i>et al.</i> , 2012; Jackson <i>et al.</i> , 2015) unter Berücksichtigung der derzeit (Juli 2024) gültigen Taxonomie	9
Tabelle 3: Zusammenfassung der Isolate von <i>Cronobacter</i> - und Nicht- <i>Cronobacter</i> -Serotypen in der PubMLST <i>Cronobacter</i> -Datenbank (Letzte Zugriff 30.04.2024)	12
Tabelle 4: Chronologische Auflistung von <i>Cronobacter</i> spp.-Erkrankungen bei Neugeborenen weltweit und deren Auswirkungen (Auswahl)	40
Tabelle 5: Auswahl weltweiter Untersuchungen auf Vorkommen von <i>Cronobacter</i> spp. in Säuglingsnahrungsmitteln, Lebensmitteln tierischen und pflanzlichen Ursprungs und Umweltsproben (basierend auf Friedemann, 2007).....	51
Tabelle 6: Zusammenfassung der <i>Cronobacter</i> -Isolate in der <i>Cronobacter</i> -PubMLST-Datenbank (Aktualisierte Fassung vom Juli 2024 zu Ogrodzki & Forsythe, 2017)	73
Abbildung 1: Typisches Wachstum vom <i>C. sakazakii</i> Stamm DSM 4485 auf Trypton Soja Agar (Quelle: Eigene Aufnahme).....	7
Abbildung 2: Typisches Wachstum vom <i>C. sakazakii</i> Stamm DSM 4485 auf DFI-Agar (Quelle: Eigene Aufnahme).....	8

1 Einleitung

Cronobacter-Infektionen betreffen überwiegend Erwachsene, jedoch -historisch gesehen- haben diese in den letzten Jahrzehnten aufgrund ihrer direkten Assoziation mit lebensbedrohlichen Infektionen, insbesondere bei Neugeborenen, erhöhte Aufmerksamkeit erlangt. Die ersten dokumentierten Fälle traten 1958 in England auf und führten zum Tod zweier Säuglinge (Urmenyi & Franklin, 1961). Zwischen 1961 und 2018 wurden weltweit in der veröffentlichten Literatur 183 Fälle von Infektionen mit *Cronobacter* spp. gemeldet, von denen 67 % (100/150) Neugeborene betrafen und mindestens 42 % (42/112) tödlich endeten (Strysko *et al.*, 2020). Auch in Deutschland wurde im Jahr 2021 ein *Cronobacter*-Ausbruch bei Frühgeborenen mit einem Todesfall in einem Krankenhaus gemeldet (BVL –RKI Gemeinsamer Nationaler Bericht, 2021). Invasive *Cronobacter*-Infektionen (am häufigsten verursacht durch *C. sakazakii*) bei Säuglingen, einschließlich Sepsis und Meningitis, können zu neurologischen Behinderungen und sogar zum Tod führen; die gemeldete Sterblichkeitsrate liegt bei bis zu 40 % (Bowen & Braden, 2006). Da in den meisten Ländern keine Meldepflicht besteht, ist die tatsächliche Inzidenz invasiver *Cronobacter*-Infektionen bei Säuglingen nicht bekannt. Die geschätzte Inzidenz liegt bei etwa einer Infektion mit *Cronobacter* spp. pro 100.000 Säuglinge pro Jahr und in 95 % der Fälle sind Säuglinge in den ersten beiden Lebensmonaten betroffen (Strysko *et al.*, 2020). Bei Säuglingen mit sehr geringem Geburtsgewicht (<1.500 g) steigt diese Rate auf 9,4 pro 100.000 (FAO und WHO, 2006). Im Jahr 2008 meldete die Weltgesundheitsorganisation (WHO) eine jährliche Inzidenz von mindestens 0,14 pro 100.000 Säuglingen auf den Philippinen und 1,76 pro 100.000 Säuglingen in England und Wales, obwohl es sich hierbei vermutlich um Unterschätzungen handelt (FDA/WHO, 2008). Da Infektionen mit *Cronobacter* spp. in Deutschland nicht meldepflichtig sind, muss mit einer Dunkelziffer gerechnet werden. Die Internationale Kommission für mikrobiologische Spezifikationen für Lebensmittel (ICMSF) kategorisierte *Cronobacter* spp. im Jahr 2002 als eine ernsthafte Gefahr für beschränkte Populationen, die zu lebensbedrohlichen oder chronischen Krankheiten führen können (ICMSF, 2002). Das Auftreten von *Cronobacter*-Infektionen führte schließlich dazu, dass die Ernährungs- und Landwirtschaftsorganisation/Weltgesundheitsorganisation (FAO/WHO) bei ihren Risikobewertungssitzungen Änderungen an den mikrobiologischen Kriterien für pulverförmige Säuglingsanfangsnahrungsmittel vornahm. Diese Änderungen betonten die Bedeutung guter Praktiken während des Rekonstitutionsprozesses von Säuglingsnahrung (FAO/WHO, 2004, 2006, 2008; CAC 2008). Obwohl die FAO/WHO-Risikobewertungstreffen bereits 2004 begannen, wurden die mikrobiologischen Kriterien der Europäischen Union erst 2007 in der Verordnung (EG) Nr. 1441/2007 der Kommission vom 5. Dezember geändert. Diese gelten nun für Säuglingsanfangsnahrung mit einer Zielgruppe bis zu 6 Monaten. Die Kriterien wurden jedoch nicht für Säuglingsnahrung "Folgemilch" geändert, die in der Entwöhnungsphase (>6

Monate) verwendet wird. Daher besteht die Notwendigkeit einer verbesserten Erforschung des Bakteriums, um Aspekte wie Vorkommen, Taxonomie und Virulenz besser zu verstehen. Obwohl *Cronobacter*-Infektionen nicht sehr häufig sind, besteht ein großer Bedarf, die Öffentlichkeit über die damit verbundenen Risiken aufzuklären, um angemessene Maßnahmen zu ergreifen. Da Säuglingsnahrung bei einer Reihe von Infektionen als Vehikel in Frage kommt, sind besondere Vorsicht und Sensibilisierung erforderlich, um die mikrobiologische Sicherheit von Säuglingsnahrung und ähnlichen Produkten zu gewährleisten. *Cronobacter* spp. sind ubiquitär in der Umwelt verbreitet und wurden bisher weltweit in verschiedenen Lebensmitteln, insbesondere in trockenen und getrockneten Produkten, sowie in der Lebensmittelproduktion, auf Oberflächen im klinischen Umfeld, im privaten Bereich und in weiteren verschiedenen Quellen isoliert (Yemis *et al.*, 2020). Seit einem Ausbruch im Jahr 2002 in den USA, der durch pulverförmige Säuglingsanfangsnahrungsmittel verursacht wurde (Himelright *et al.*, 2002), steht Säuglingsnahrung verstärkt im Fokus. In den meisten Ausbrüchen, bei denen eine Quelle identifiziert werden konnte, war kontaminierte Säuglingsnahrung auf Milchpulverbasis die Hauptinfektionsquelle (79 %, 81/102) (Bowen & Braden, 2006; Stryko *et al.*, 2020).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, zunächst eine Übersicht über das Vorkommen von *Cronobacter* spp. (ehemals *E. sakazakii*) in diversen Säuglingsnahrungsmitteln und verschiedenen getrockneten Lebensmitteln aus dem Einzelhandel zu geben, um die Exposition des Verbrauchers abzuschätzen und die daraus gewonnenen Stämme, welche seit Jahren aus verschiedenen Lebensmitteln, insbesondere Säuglingsnahrungsmitteln, isoliert werden konnten, zu charakterisieren. Dazu wurden neben Untersuchungen zur phänotypischen Diversität von gewonnenen Stämmen auch molekularbiologische Analysen durchgeführt, um insbesondere systematische Fragestellungen in Bezug auf die Entwicklung und Etablierung schneller moderner Nachweismethoden basierend auf spezies-spezifischer Identifizierung und Differenzierung der einzelnen Spezies innerhalb der Gattung *Cronobacter* mittels molekularbiologischer Techniken beantworten zu können. Eine anschließende vergleichende Makrorestriktions- und Sequenzanalyse sämtlicher Isolate bildete die Grundlage, um erstmals zusammenhängende Fragen zum Speziesvorkommen sowie zur intra- und interspezifischen Variabilität einzelner *Cronobacter*-Spezies in unterschiedlichen Lebensmitteln beantworten zu können. Tatsächlich konnten die Daten dieser Arbeit eine vergleichsweise hohe Heterogenität der nachgewiesenen *Cronobacter*-Spezies und -Isolaten aufzeigen, die zukünftig auch diagnostisch mittels der in dieser Arbeit entwickelten spezies-spezifischen Nachweismethoden genutzt werden können.

1.1 Genus *Cronobacter* spp.

1.1.1 Taxonomische Einordnung von *Cronobacter* spp.

Die Gattung *Cronobacter* spp. besteht aus einer vielfältigen Gruppe von gramnegativen, opportunistisch pathogenen Bakterien aus der Familie der *Enterobacteriaceae*. Die Familie *Enterobacteriaceae* gehört nach dem phylogenetischen System zur neu etablierten Ordnung der Enterobacterales in der Klasse der Gammaproteobacteria in der Abteilung (Divisio, bei den Prokaryoten auch als *Phylum* bezeichnet) Proteobacteria (Adeolu *et al.*, 2016). Die Taxonomie von *Cronobacter* wurde seit der Umbenennung in die neue Gattung *Cronobacter* (Iversen *et al.*, 2007) mehrfach überarbeitet. *Cronobacter* spp. waren bis zum Jahr 2007 als die eigenständige Spezies *Enterobacter sakazakii* bekannt und wurden in der Literatur erstmals im Jahr 1929 als „gelb-pigmentierte Coliforme“ beschrieben, isoliert aus der septikämischen Blutkultur einer Frau, die an einer fiebrigen Infektion in Folge einer Kürettage litt (Pangalos, 1929). Im Jahr 1958 wurde zum ersten Mal ein „pigmentiertes coliformes Bakterium“ in Zusammenhang mit einer tödlich endenden, generalisierten Sepsis und Meningitis bei zwei Neugeborenen im Osterhills Hospital (St. Albans City Hospital) in England erwähnt (Urmenyi & Franklin, 1961). Der zweite dokumentierte Fall von Meningitis, der sich durch „gelb-pigmentierte Coliforme“ bei einem Kind ereignete, wurde in einem Bericht im Odensee Hospital, Dänemark festgehalten und endete ebenfalls tödlich (Joker *et al.*, 1965). Der Begriff "gelb-pigmentierte Coliforme" war ein nicht nomenklaturkonformer Begriff, der vor 1970 in Veröffentlichungen verwendet wurde, um *Enterobacteriaceae*-Stämme, die ein gelbes Pigment produzieren, Laktose fermentieren und während dieser Fermentation Gas bilden, zu beschreiben. Anschließende Untersuchungen zur Speziesbestimmung zeigten, dass es sich bei diesen Kulturen um „gelb-pigmentierte *Enterobacter* (*E.*) *cloacae*“ handelte. Im Jahr 1972 konnte Brenner (1974) mittels DNA-DNA-Hybridisierung jedoch feststellen, dass diese „gelb-pigmentierten *E. cloacae*“ und *E. cloacae* zwar eng miteinander verwandt waren, aber nicht eng genug, um als zur selben Spezies gehörend eingestuft zu werden. Auf Grundlage der umfassenden Untersuchungen von Farmer *et al.* (1980) erfolgte schließlich im Jahr 1980 die Klassifizierung als eigene Spezies. Sie beschrieben, basierend auf maßgeblichen Unterschieden zu *E. cloacae* bezüglich der DNA-Zusammensetzung, der biochemischen und phänotypischen Eigenschaften sowie der Antibiotika-Sensibilität und der Pigmentierung, die neue Spezies erstmal unter dem Namen *Enterobacter sakazakii*. Der Speziesname „*Enterobacter sakazakii*“ wurde zu Ehren des japanischen Tierarztes und Mikrobiologen Riichi Sakazaki gewählt. Bereits zu diesem Zeitpunkt war zu erkennen, dass die Isolate dieser neuen Spezies im Hinblick auf biochemische und genetische Eigenschaften nicht einheitlich waren. Darauf folgend führte die biochemische Differenzierung der Isolate zur ersten Beschreibung von 15 Biogruppen (Farmer *et al.*, 1980), wobei eine weitere Biogruppe 2006 hinzugefügt wurde (Iversen *et al.*, 2006). In den folgenden Jahren wurde die damalige Annahme, dass die

1 Einleitung

Taxonomie der neuen Spezies sehr komplexer sein könnte, durch mehrere Untersuchungen über die phylogenetische Verwandtschaft zwischen den *E. sakazakii*-Isolaten bestätigt. Iversen *et al.* (2004) untersuchten die phylogenetischen Beziehungen von *E. sakazakii* mit den eng verwandten *Citrobacter* Spezies anhand von 16S rDNA- und *hsp60*-Gensequenzen. Diese Studie ergab vier verschiedene 16S rDNA-Cluster unter den *E. sakazakii*-Stämmen, die jeweils potenziell neue Arten darstellen. In einer Folgestudie wurde eine Korrelation zwischen diesen 16S rDNA-Clustern und den bereits beschriebenen Biotypen von Farmer *et al.* (1980) hergestellt. In dieser Studie wurde auch eine neue Biogruppe Nr. 16 charakterisiert (Iversen *et al.*, 2006).

Im Jahr 2007 wurde *Cronobacter* als Gattungsname vorgeschlagen, um die zuvor als *E. sakazakii* klassifizierten Organismen einzuschließen. Der Name „*Cronobacter*“ leitet sich aus der griechischen Mythologie ab. Der Titan Cronos (dt. Kronos, röm. Saturn) fraß seine Kinder, die späteren olympischen Götter. Die Namensgebung spielt auf die Tatsache an, dass *Cronobacter* spp. vor allem bei Säuglingen zu oft tödlichen Infektionskrankheiten führen. Diese Klassifizierung wurde anhand der Überprüfung von mehreren *E. sakazakii*-Stämmen im Hinblick auf ihre genetische und biochemische Diversität begründet (Iversen *et al.*, 2007a). Folgende Speziesbezeichnungen wurden in der Originalarbeit vorgeschlagen: *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. und *Cronobacter* genomospecies I.

Bereits ein Jahr später erfolgte die Reklassifizierung der Spezies *Enterobacter sakazakii* als Genus *Cronobacter* und die Beschreibung der neuen Spezies *C. sakazakii*, *C. malonaticus*, *C. muytjensii*, *C. dublinensis* mit den Subspezies *dublinensis*, *lausannensis* und *lactaridi*, *C. turicensis* und *C. genomospecies I* (Iversen *et al.*, 2008a), auf Basis von molekularbiologischen Untersuchungen, wie Fluorescent Amplified Fragment-Length Polymorphism (f-AFLP) Analyse, Ribotypisierung, DNA-DNA-Hybridisierung („Goldstandard“ Methode zur Beschreibung neuer Spezies) und Gensequenzierung der 16S rRNA. Die beiden Subspezies von *C. sakazakii* wurden aufgrund weitergehender Analysen als eigene Spezies, *C. sakazakii* und *C. malonaticus*, klassifiziert (Baldwin *et al.*, 2009). Nachfolgend wurde im Jahr 2011 die neue Spezies *C. condimenti* zur Gattung *Cronobacter* hinzugefügt und *C. genomospecies 1* in *C. universalis* umbenannt (Joseph *et al.*, 2012).

Bei weiteren Untersuchungen mittels Multi-Locus-Sequenzanalyse (MLSA), basierend auf nur vier Loci (*atpD*, *gyrB*, *infB* und *rpoB*), wurden 2013 drei weitere apathogene *Enterobacter* Spezies (*E. helveticus*, *E. pulveris*, und *E. turicensis*) als drei neue *Cronobacter* Spezies (*C. helveticus*, *C. pulveris* und *C. zurichensis*) der Gattung *Cronobacter* zugeordnet (Brady *et al.*, 2013). Allerdings lag bei dieser Reklassifizierung das Niveau der Sequenzanalyse unterhalb

1 Einleitung

des üblicherweise akzeptierten Niveaus zur Benennung neuer Arten und wurde durch umfangreiche Genomanalysen und biochemische Charakterisierungen von Stephan *et al.* (2014) dementiert, indem sie zeigten, dass diese Spezies weder der Gattung *Enterobacter* noch der Gattung *Cronobacter* zuzuordnen waren. Stephan *et al.* (2014) schlugen daher vor, die drei *Enterobacter*-Arten (*E. helveticus*, *E. pulveris* und *E. turicensis*) in zwei neue Gattungen, *Franconibacter* und *Siccibacter*, zu unterteilen (*Franconibacter pulveris* comb. nov., *Franconibacter helveticus* comb. nov. und *Siccibacter turicensis* comb. nov.). Die derzeit aktuelle taxonomische Klassifizierung von *Cronobacter* spp. stellt sich somit wie folgt dar (Tabelle 1):

Tabelle 1: Taxonomische Einteilung von *Cronobacter* spp.

Taxon	Bezeichnung	Biogruppe	Referenz
Ordnung	<i>Enterobacteriales</i>		Adeolu <i>et al.</i> (2016)
Familie	<i>Enterobacteriaceae</i>		Rahn (1937)
Gattung	<i>Cronobacter</i>		Iversen <i>et al.</i> (2008)
Spezies	<i>C. sakazakii</i>	1, 2, 3, 4, 7, 8, 11, 13	
Spezies	<i>C. malonaticus</i>	5, 9, 14	
Spezies	<i>C. dublinensis</i>	6, 10, 12	
Subspezies	<i>C. dublinensis</i> subsp. <i>dublinensis</i>	12	
Subspezies	<i>C. dublinensis</i> subsp. <i>lausannensis</i>	10	
Subspezies	<i>C. dublinensis</i> subsp. <i>lactaridi</i>	6	
Spezies	<i>C. muytjensii</i>	15	
Spezies	<i>C. turicensis</i>	16, 16a, 16b	
Spezies	<i>C. condimenti</i>		Joseph <i>et al.</i> (2012)
Spezies	<i>C. universalis</i>		

Die taxonomische Reklassifizierung der Gattung *Cronobacter* im Jahr 2007 führte zu einer weitverbreiteten Verwirrung, sodass frühere *E. sakazakii*-Stämme zum Teil automatisch in *C. sakazakii* umbenannt wurden. Demzufolge wurden einige Laborstämme von *E. sakazakii* fälschlicherweise einfach in *C. sakazakii* umbenannt. Beispielsweise wurden die zuvor als antibiotikaresistente *C. sakazakii* identifizierten Stämme später als *E. hormaechei* reidentifiziert (Poirel *et al.*, 2007). Der ehemalige *E. sakazakii* Preceptrol™ (Qualitätskontrolle) Stamm ATCC 51329 wurde als *C. muytjensii* Typ Stamm umklassifiziert. Dieser Stamm wurde möglicherweise aufgrund der häufigen Verwendung im Labor in einigen Veröffentlichungen als *C. sakazakii* bezeichnet. Folglich besteht Unsicherheit der Relevanz dieser Studien, da *C. muytjensii* nur selten mit klinischen *Cronobacter*-Infektionen in Verbindung gebracht wurde. Ein zuvor als *C. sakazakii* identifizierter Stamm CMCC 454002 stellte sich als *C. malonaticus* heraus (Blazkova *et al.*, 2015). Anhand chemischer Strukturanalysen des O-Polysaccharids

1 Einleitung

eines zu *C. sakazakii* umbenannten Stammes konnte dieser später als *E. ludwiggi* identifiziert werden (Szafranek *et al.*, 2005).

Aufgrund der hohen Ähnlichkeit der 16S rDNA-Gensequenzen zwischen den Arten, die zwischen 97,8 % und 99,7 % liegt, und der Überlappung der biochemischen Profile, ist die Taxonomie der Gattung *Cronobacter* besonders komplex (Dauga & Breuwer, 2008). Die Existenz von Mikroheterogenitäten in der 16S rDNA-Gensequenz ist ein weiterer Faktor, der bei bestimmten Stämmen von *C. sakazakii* und *C. malonaticus* berichtet wurde, die auf der Grundlage dieser Sequenzen nicht unterschieden werden konnten. Darüber hinaus wurden Verwechslungen mit anderen *Enterobacteriaceae*-Stämmen berichtet, darunter einer Reihe von *E. cloacae*- und *E. hormaechei*-Stämmen, welche anhand phänotypischer Tests fälschlicherweise als *Cronobacter* spp. identifiziert wurden (Caubilla-Barron *et al.*, 2007; Townsend *et al.*, 2008). Die Gattung *Cronobacter* umfasst auch Stämme, die ursprünglich als *Prashechia flavescens* und *Azotobacteriaceae* in Kultursammlungen hinterlegt wurden, darunter ein klinisches Isolat von einem Neunjährigen mit Pleuropneumonie (Weisglass & Krznaric-Sucic, 1979).

1.1.2 Morphologie, kulturelle und biochemische Eigenschaften

Das Genus *Cronobacter* umfasst fakultativ anaerobe, gramnegative, Oxidase-negative, Katalase-positive, nicht sporenbildende Stäbchen mit einer Größe von etwa 3 µm x 1 µm, die im Allgemeinen beweglich sind. Der Wachstumstemperaturbereich liegt bei 2,2 - 48,9 °C mit einer optimalen Vermehrungstemperatur von 37 - 43 °C. Er kann auch in feuchtigkeitsarmen Umgebungen überleben, z. B. in Säuglingsnahrung, mit einer Wasseraktivität von 0,30 bis 0,83 für bis zu 12 Monate (Kandhai *et al.*, 2006).

Zu den typischen Charakteristika von *Cronobacter* spp. zählte lange Zeit auch die Bildung des gelben Pigments auf dem festen Nährmedium Trypton Soja Agar (TSA), das ursprünglich zur Differenzierung von anderen *Enterobacter* Spezies verwendet wurde (Farmer *et al.*, 1980). Die gelbe Pigmentbildung (Abbildung 1) trägt zum Schutz des Organismus gegen die UV-Strahlen und damit zur Erleichterung des Überlebens in der Umwelt bei (Caubilla-Barron & Forsythe, 2007). Die gelbe Pigmentbildung variiert in Abhängigkeit von Licht, Temperatur sowie verwendetem Nährmedium (Farmer *et al.*, 1980; Block *et al.*, 2002; Guillaume-Gentil *et al.*, 2005). Bei einer Bebrütungstemperatur von 25 °C für 48 h ist sie am deutlichsten ausgeprägt (Farmer *et al.*, 1980), war allerdings in seltenen Fällen (2%) nur schwer erkennbar oder nicht vorhanden. Muijtjens *et al.* (1984) fanden die gelbe Pigmentbildung bei allen 129 getesteten *Cronobacter* spp. (*E. sakazakii*)-Stämmen, aber bei keinem der 97 anderen *Enterobacter*-Stämmen. Ein *Cronobacter* (*E. sakazakii*)-Stamm, der 1993 in Israel im Verlauf einer

1 Einleitung

neonatalen Bakteriämie isoliert wurde, besaß ebenfalls kein Pigmentbildungsvermögen (Block *et al.*, 2002). Ein Gelbpigmentbildungsvermögen wurde weiterhin bei den Kolonien von *E. agglomerans* (Nazarowec-White & Farber, 1997) sowie *Acinetobacter* spp., *Escherichia hermannii*, *Cedacea lapagei* und *Leclercia adecarboxylata* beschrieben. Iversen und Forsythe (2007) zeigten, dass die gelbe Pigmentierung nicht als ein Differenzierungskriterium zur Speziesidentifizierung genutzt werden sollte.

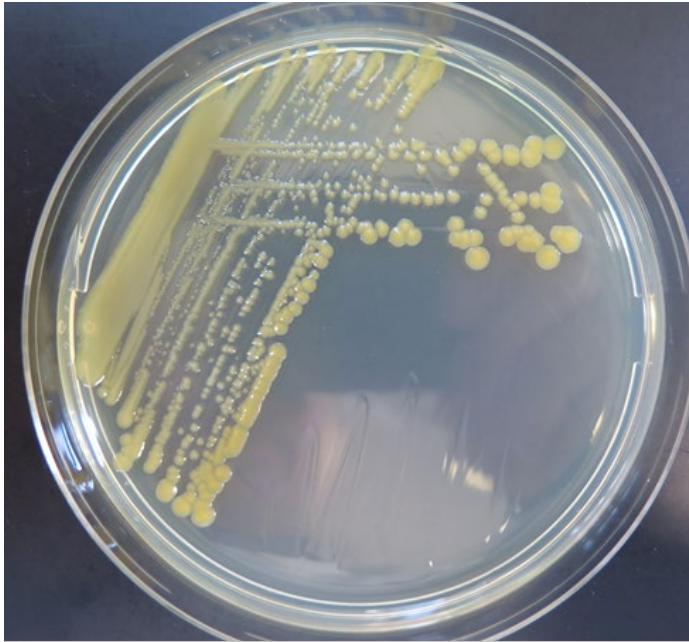


Abbildung 1: Typisches Wachstum vom *C. sakazakii* Stamm DSM 4485 auf Trypton Soja Agar (Quelle: Eigene Aufnahme)

Die Isolate von *Cronobacter* (*E. sakazakii*) wachsen auf festen Nährböden in zwei verschiedenen Kolonietypen. Die erste Koloniemorphologie (Typ A) wird als entweder trockener oder muköser Typus mit einer konvexen oder konkaven, gummiartigen Oberfläche, die sich nur schlecht mit einer Öse vom Agar abnehmen lässt, beschrieben. Die zweite Koloniemorphologie (Typ B) hingegen ist von weicher, schleimiger Konsistenz. Einzelne Kolonien lassen sich mit Hilfe einer Impföse leicht entnehmen (Farmer *et al.*, 1980). Bei Subkultivierungen wurde gezeigt, dass sich Typ A in Typ B umwandeln kann und beide Koloniemorphologien in einer Kultur auftreten können (Farmer *et al.*, 1980). Diese Charaktereigenschaften dürften auf die Produktion von Heteropolysacchariden zurückzuführen sein (Harris & Oriel, 1989). Diese zwei Typen werden in den neueren Studien als „matt“ oder „glänzend“ in Abhängigkeit von Nährmedium und Stamm beschrieben (Iversen & Forsythe, 2003). Hinsichtlich der Virulenzeigenschaften sind keine Unterschiede zwischen diesen beiden Kolonietypen bekannt (Nazarowec-White & Farber, 1997). Ein weiteres

1 Einleitung

kulturelles Charakteristikum ist die Eigenschaft zur Sedimentbildung, die bei der Kultivierung von *Cronobacter* in Nährbouillon beobachtet werden kann (Farmer *et al.*, 1980; Nazarowec-White & Farber, 1997). Eine weitere charakteristische Eigenschaft von *Cronobacter* spp. ist die α -Glucosidase-Aktivität. *Cronobacter* exprimiert konstitutiv α -Glucosidase. Dies ist die Grundlage für die Verwendung von chromogenem Agar (z.B. CCI-Agar, DFI-Agar (Abbildung 2) und ESIA-Agar) für die Isolierung des Organismus und ermöglicht eine schnelle und sichere Differenzierung zwischen *Cronobacter*- und *Enterobacter*-Spezies (Muytjens *et al.*, 1984).

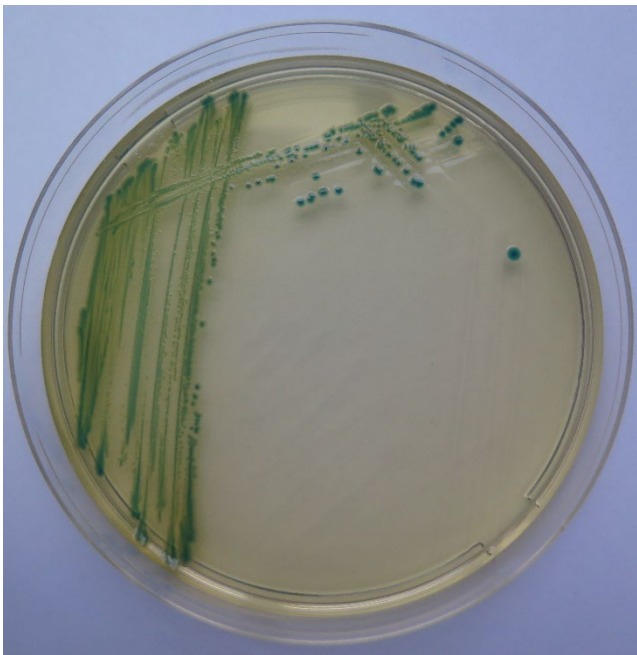


Abbildung 2: Typisches Wachstum vom *C. sakazakii* Stamm DSM 4485 auf DFI-Agar (Quelle: Eigene Aufnahme)

Zu den biochemischen Eigenschaften gehören eine negative Oxidase-Reaktion, eine positive Katalase-Reaktion, die Hydrolyse von Äsculin und Arginin, die Säurebildung durch Fermentation aus D-Glucose, D-Sucrose, D-Raffinose, D-Melibiose, D-Cellobiose, D-Mannitol, D-Mannose, L-Rhamnose, L-Arabinose, D-Xylose, D-Trehalose, Galacturonat und D-Maltose, sowie eine positive L-Ornithin und n-Dekarboxylase- Reaktion (Iversen *et al.*, 2007a; Lehner *et al.*, 2013). *Cronobacter* spp. sind in der Lage, Nitrat zu Nitrit zu reduzieren, positiv auf den Voges-Proskauer-Test zu reagieren und negativ auf den Methylrot-Test zu reagieren (Tabelle 2; ISO, 2017; Iversen *et al.*, 2007a). Die Acetoinproduktion ist bei 91% der Stämme positiv (Lehner *et al.*, 2013). *C. sakazakii* kann exogene Sialinsäure als einzige Kohlenstoffquelle nutzen (Joseph *et al.*, 2013).

1 Einleitung

Tabelle 2: Phänotypische Eigenschaften zur Differenzierung von *Cronobacter* spp. (Zusammengestellt nach Farmer *et al.*, 1980; Ivesen *et al.*, 2006, 2008; Stephan *et al.*, 2007, 2008; Joseph *et al.*, 2012; Jackson *et al.*, 2015) unter Berücksichtigung der derzeit (Juli 2024) gültigen Taxonomie

Spezies	Biotyp	SP	β-NAG	Mot	VP	H ₂ S	Ind	ODC	NO ₃	MR	Kohlenhydratverwertung												
											Sialin	Gas	Glukose	Saccharose	Dul	Mal	Melezitose	Ino	Aconitsäure	Arabitol	Lactulose	Putrescine	
<i>C. sakazakii</i>	1	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	
	2 / 2a	-	+	v	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	3	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+
	4 / 4a	-	+	v	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+
	7	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+
	8 / 8a	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	v	-	-	-	+	+
	8b / 8c	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	v	-	-	-	+	+
	11	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
	13 / 13a	-	+	v	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+
	13b / 13c	-	+	+	-	-	-	v	+	v	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+
<i>C. malonaticus</i>	5 / 5a	+	+	v	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	v	+	
	9 / 9a	+	+	+	v	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	v	+	
	14 / 14a	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	v	+	-	+	-	v	+	
<i>C. turicensis</i>	16 / 16a	+	+	v	+	-	-	+	+	-	v	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+
	16b / 16c	+	+	v	+	-	-	v	+	-	v	+	+	+	+	v	+	+	-	-	-	+	+
<i>C. muytjensii</i>	15	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	
<i>C. dublinensis</i> subsp. <i>dublinensis</i>	12	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	
<i>C. dublinensis</i> subsp. <i>lausannensis</i>	10	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	
<i>C. dublinensis</i> subsp. <i>lactaridi</i>	6	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	
<i>C. condimenti</i>	k. A.	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	
<i>C. universalis</i>	k. A.	+	+	v	+	-	-	+	+	k. A.	-	v	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	

SP = Saure Phosphatase; β-NAG = N-Acetyl-β-D-Glucosaminidase; Mot = Motilität bei 37 ° C; VP = Voges-Proskauer Acetoinproduktion; H₂S = H₂S Produktion; Ind = Indolproduktion; ODC = Ornithinverwertung; NO₃ = Nitratreduktion; MR = Methylrot; Sialin = Sialinsäure; Gas = Gasproduktion aus D-Glukose; Säure = Säureproduktion aus D-Glukose; Saccharose: Säureproduktion aus Saccharose; Dul = Säureproduktion aus Dulcitol; Mal = Malonatverwertung; Melezitose = Säureproduktion aus Melezitose; Ino = myo-Inositol; Aconitsäure = Bildung *trans*-Aconitsäure; Arabitol = Zuckeralkohol; Lactulose = Säureproduktion aus Lactulose; Putrescine = Decarboxylierung; k. A. = keine Angabe; + = positiv; - = negativ; v = variabel

1.1.3 Serotypen

Die serologische Einordnung von Mikroorganismen basiert auf dem Aufbau der Zellmembran. Die äußere Membran gramnegativer Bakterien ist doppelschichtig und asymmetrisch aufgebaut. Während die innere Schicht der äußeren Membran durch Phospholipide gebildet wird, besteht die äußere Schicht aus einem Lipopolysaccharid (LPS) (Rietschel *et al.*, 1994). Das LPS kann in drei Bestandteile unterteilt werden: der Lipid A-Region, dem Kernoligosaccharid und der O-Antigen-Region. Das hoch konservierte und überwiegend hydrophobe Lipid A integriert das LPS in der Zellwand und ist über glykosidische Bindung mit dem Kernoligosaccharid aus Ketodesoxyoctonat, Heptosen, Glucose, Galactose und N-Acetylglucosamin verbunden. Die äußere Schicht des LPS besteht aus O-Antigen-Ketten, welche sich aus wiederholenden Oligosaccharideinheiten (repeating units) zusammensetzen. Diese bestehen hauptsächlich aus Hexosen, deren Abfolge, Art der glykosidischen Bindung und chemische Zusammensetzung nicht nur auf Gattungsebene, sondern auch auf Speziesebene stark variiert. Die Einteilung einer Spezies in Serotypen ist auf die Zusammensetzung dieser hoch variablen O-Antigen-spezifischen Seitenkette zurückzuführen. Die Unterschiede dieser Struktur beruhen auf der Zusammensetzung und der chemischen Verbindung von repetitiven und oft verzweigten Polysacchariden, welche aus 3-6 verschiedenen Zuckerresten bestehen (Wang *et al.*, 2010). Bei der Mehrzahl der zahlreichen Vertreter der *Enterobacteriaceae* (*E. coli*, *Salmonella*, *Shigella*, etc.) erwies sich das O-Antigen als hochgradig polymorph (Reeves *et al.*, 1996). Die traditionelle Antiserum-basierte Serotypisierung wird auch heutzutage noch routinemäßig eingesetzt, wobei das LPS-Biosynthese-Cluster als Grundlage für die molekularbiologische Einteilung in Serotypen fungiert (Wang *et al.*, 2007). Die an der O-Antigensynthese beteiligten Gene befinden sich im *rfb*-Lokus zwischen den flankierenden Genen *gnd* und *galF* (Gilmour *et al.*, 2007). Der Locus ist für jeden Serotyp unterschiedlich groß, je nach Zuckerzusammensetzung und Komplexität der Struktur. Diese Gene kodieren Enzyme, die an der Synthese von Zuckern beteiligt sind, die die O-Antigen-Untereinheit bilden, für Gene, die Glykosyltransferasen kodieren und für Gene wie *wzx* und *wzy*. Letztere kodieren die Transporter- und Polymeraseproteine, die für die Verarbeitung und den Zusammenbau des O-Antigens aus den Untereinheiten erforderlich sind. Die Einteilung einiger *Cronobacter*-Spezies in Serotypen wurde in verschiedenen Veröffentlichungen mittels molekularer Methoden (Mullane *et al.*, 2008; Jarvis *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2012; Blažková *et al.*, 2015) sowie Strukturstudien (Sun *et al.*, 2012; Arbatsky *et al.*, 2010; Czerwicka *et al.*, 2010; MacLean *et al.*, 2009) beschrieben. Für *C. sakazakii* entwickelten Sun *et al.* (2011) ein auf der Agglutination von Kaninchenserum basierendes Serotypisierungsschema für die bereits von Mullane *et al.* (2008) beschriebenen Serotypen Csak O:1 und O:2 sowie für fünf neue *C. sakazakii* Serotypen Csak O:3 - SO:7, mit dem 119 *C. sakazakii*-Stämme serotypisiert werden konnten. Dabei wurden die von Mullane *et al.*

1 Einleitung

(2008) zuerst beschriebenen Serotypen Csak O:1 und O:2 mit insgesamt 69,7 % der untersuchten Stämme am häufigsten identifiziert. Im Rahmen der phylogenetischen Analyse der O-Antigensequenzen von 810 Eintragungen in der Cronobacter PubMLST-Datenbank postulierten Wang *et al.* (2021) 11 neue potentielle O-Serotypen; vier von *C. dublinensis*, drei von *C. turicensis*, zwei von *C. malonaticus* und jeweils einer von *C. muytjensii* und *C. sakazakii*, allerdings wurden diese bisher teilweise mit den entsprechenden *Cronobacter*-Isolaten bestätigt (Joley *et al.*, 2018).

Für das Genus *Cronobacter* sind derzeit 40 Serotypen in der PubMLST *Cronobacter*-Datenbank bekannt (Blažková *et al.*, 2015; Yan *et al.*, 2015; Joley *et al.*, 2018). Für *C. sakazakii* wurden acht Serotypen Csak O:1-O:8, für *C. turicensis* sieben Serotypen Ctur O:1-O:4 und O:6-O:8, für *C. dublinensis* sieben Serotypen Cdub O:1-O:2 und O:4-O:8, für *C. malonaticus* fünf Serotypen Cmal O:1-O:3 und Cmal O:5-O:6, für *C. muytjensii* sechs Serotypen Cmuyt O:1-O:6, für *C. universalis* drei Serotypen Cuni O:1-O:3 und für *C. condimentii* ein Serotyp Ccon O:1 beschrieben (Mullane *et al.*, 2008; Jarvis *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2012; Blažková *et al.*, 2015). In Lebensmitteln und klinischen Fällen waren die vorherrschenden *Cronobacter* O-Serotypen (> 60 % der gesamten Gattung) *C. sakazakii* O:1 und O:2 (Blažková *et al.*, 2015; Jaradat *et al.*, 2022; Li *et al.*, 2023; Wang *et al.*, 2021). Gopinathe *et al.* (2018) zeigten, dass Malonat positive *C. sakazakii*-Stämme von Serotyp O:2 (von Sequence Type ST64) pathogen sind. Alsonosi *et al.* (2015) zeigten, dass die von Patienten isolierten *Cronobacter*-Stämme zu Serotypen Csak O:2 und Cmal O:2 gehörten. Darüber hinaus sind Cmal O:2, Csak O:2, Csak O:4 und Csak O:1 klinisch signifikant und wahrscheinlich mit menschlichen Infektionen verbunden (Blažková *et al.*, 2015; Scharinger *et al.*, 2017).

1 Einleitung

Tabelle 3: Zusammenfassung der Isolate von *Cronobacter*- und Nicht-*Cronobacter*-Serotypen in der PubMLST *Cronobacter*-Datenbank (Letzte Zugriff 30.04.2024)

<i>Cronobacter</i> Spezies (Gesamtzahl der Isolate/prozentualer Anteil)	Anzahl der serotypisierten Isolate	Serotypen	Anzahl der Isolate
<i>C. sakazakii</i> (2979; 71,3 %)	1360	Csak O:1	465
		Csak O:2	597
		Csak O:3	101
		Csak O:4	112
		Csak O:5	4
		Csak O:6	3
		Csak O:7	77
		Csak O:8	1
<i>C. malonicus</i> (459; 11,0 %)	197	Cmal O:1	37
		Cmal O:2	122
		Cmal O:3	26
		Cmal O:5	2
		Cmal O:6	1
		Ctur O:2	1
		Nicht zuzuordnen	8
<i>C. muytjensii</i> (82; 2,0 %)	23	Cmuyt O:1	6
		Cmuyt O:2	10
		Cmuyt O:3	3
		Cmuyt O:4	2
		Cmuyt O:5	1
		Cmuyt O:6	1
<i>C. turicensis</i> (179; 4,3 %)	62	Ctur O:1	21
		Ctur O:2	1
		Ctur O:3	22
		Ctur O:4	2
		Ctur O:6	4
		Ctur O:7	1
		Ctur O:8	6
		Nicht zuzuordnen	5
<i>C. dublinensis</i> (280; 6,7 %)	88	Cdub O:1a	19
		Cdub O:1b	11
		Cdub O:2	32
		Cdub O:4	1
		Cdub O:5a	2
		Cdub O:5b	2
		Cdub O:6	5
		Cdub O:7	3
		Cdub O:8	2
		Nicht zuzuordnen	11
<i>C. universalis</i> (24; 0,6 %)	14	Cuni O:1	11
		Cuni O:2	1
		Cuni O:3	1
		Cmal O:2	1
<i>C. condimentii</i> (5; 0,1 %)	3	Ccon O:1	3
<i>Citrobacter koseri</i>	4	Cmal O:1	1
		Cmal O:1, Csak O:4	3

1.1.4 Tenazität

Cronobacter spp. besitzen eine hohe Tenazität gegenüber Hitze, Trockenheit (Caubilla-Barron & Forsythe, 2007) und osmotischem Stress (Breeuwer *et al.*, 2003; Edelson-Mammel *et al.*, 2005; Riedel & Lehner, 2007).

Die Thermotoleranz ist ein weiteres Merkmal des Organismus, das eingehend untersucht wurde. Dies ist auch für die Herstellung von Säuglingsnahrungsmitteln von Relevanz. Einige Untersuchungen zur Tenazität gegenüber Hitze wurden u.a. von Breeuwer *et al.* (2003), Iversen *et al.* (2004) und Nazarowec-White & Farber (1997) in rekonstituierter Säuglingsnahrung durchgeführt. Dabei lag die optimale Wachstumstemperatur zwischen 37 und 43 °C. Die dezimalen Reduktionszeiten (D-Wert) für Hitzebehandlungen wurden bei D54 °C mit Werten zwischen $10,2 \pm 3,56$ und $16,4 \pm 0,67$ Minuten und bei D62 °C mit Werten zwischen $0,2 \pm 0,13$ und $0,4 \pm 0,08$ Minuten angegeben (Iversen *et al.*, 2004a). Basierend auf dem D60 °C-Wert von 1,1 Minuten und einem z-Wert von 5,7 °C, wurde für die Kurzzeitpasteurisierung bei 71,7 °C über 15 Sekunden eine Reduktion der Keimzahl um 21-log Stufen berechnet. Im Vergleich zu den D-Werten anderer *Enterobacteriaceae* erwiesen sich *Cronobacter* spp. als vergleichsweise hitzetolerante Organismen dieser Gruppe (Nazarowec-White & Farber, 1997).

Bei der Rekonstitution pulverförmiger Säuglingsnahrungsmittel kann sich der Organismus schnell vermehren und das rekonstituierte Produkt zu einem gesundheitlichen Risiko machen (Osaili & Forsythe, 2009). Zur Reduktion bakterieller Belastung und somit der Minimierung der Infektionsrisiken durch *Cronobacter* empfehlen die FAO/WHO (2004, 2006) und die WHO (2007) die Rekonstitution der Säuglingsnahrungsmittel auf Milchbasis mit heißem Wasser (>70 °C).

Es wurde festgestellt, dass die Hitzeresistenz zwischen den Stämmen von *Cronobacter* variiert, obwohl alle Stämme bei Pasteurisierungstemperaturen von 72°C inaktiviert werden konnten (Nazarowec-White & Farber 1997; Iversen *et al.*, 2004b; Breeuwer *et al.*, 2003; Nazarowec-White *et al.*, 1999). Diese Beobachtung wurde zur Überarbeitung der Leitlinien für die Rekonstitution von Säuglingsnahrungsmitteln herangezogen, um das Risiko durch den Organismus zu reduzieren (FAO-WHO 2004, 2006). In jüngerer Zeit wurde festgestellt, dass eine Kombination aus Temperatur und Ultraschallparametern die Anzahl von *C. sakazakii* in rekonstituierter Säuglingsnahrung deutlich verringert (Adekunte *et al.*, 2010).

In einer Studie von Shaker *et al.* (2008) wurden die Auswirkungen der Austrocknung sowie anderer Stressfaktoren (Nährstoffmangel, Hitze und Kälte) auf die thermische Inaktivierung von zwei *Cronobacter* spp. (*C. sakazakii* und *C. muytjensii*) in rekonstituierter Säuglingsnahrung untersucht. Gestresste Zellen wurden für verschiedene Zeiträume

1 Einleitung

Temperaturen von 52-58 °C ausgesetzt. Die D-Werte für nicht-gestresste *Cronobacter* bei 52, 54, 56 und 58 °C lagen im Vergleich bei 15,33 Minuten, 4,53 Minuten, 2 Minuten und 0,53 Minuten. Austrocknungs- und Hitzestress, nicht aber Nährstoffmangel oder Kältestress, verursachten eine signifikante ($p < 0,05$) Reduzierung der D-Werte. Somit wurde festgestellt, dass die Hitzetoleranz von *Cronobacter* in rekonstituierter Säuglingsnahrung durch Austrocknung und Hitze beeinflusst wurde. Die z-Werte von ausgetrockneten, ausgehungerten, hitze- und kältegestressten *Cronobacter* unterschieden sich allerdings nicht signifikant von den z-Werten der nicht gestressten Zellen (4,22 °C).

Edelson-Mammel & Buchanan (2004) führten ebenfalls Versuche zur Hitzetoleranz in rekonstituierter Säuglingsnahrung durch. Hierbei konnten zwischen den zwölf untersuchten Stämmen deutlich zwei Gruppen unterschieden werden. Die D_{58 °C}-Werte lagen bei sechs Stämmen zwischen $30,5 \pm 0,1$ und $47,9 \pm 1,0$ Sekunden, bei sechs weiteren Stämmen zwischen $307,8 \pm 6,7$ und $591,9 \pm 49,9$ Sekunden. Genauere Untersuchungen dieser Stämme ergaben, dass ein bestimmtes Protein bei diesen sechs resistenten Stämmen nachweisbar war, dessen Sequenz schließlich als Biomarker vorgeschlagen wurde (Williams *et al.*, 2005).

Osaili *et al.* (2008) untersuchten die Auswirkungen von verschiedenen Umweltbelastungen auf die thermische Inaktivierung von zwei *Cronobacter* Spezies (*C. sakazakii* und *C. muytjensii*) in Säuglingsnahrung auf Milchbasis und stellten fest, dass diese Belastungen die thermische Widerstandsfähigkeit der *Cronobacter*-Stämme verringerten und auch, dass eine längere Trockenlagerung die Anfälligkeit gegenüber Hitze während der Rehydrierung mit heißem Wasser erhöht. Trotz erheblicher Unterschiede bezüglich der Thermotoleranz zwischen den verschiedenen *Cronobacter*-Stämmen (Edelson-Mammel & Buchanan, 2004) führten Untersuchungen zur Hitzetoleranz sowohl von Nazarowec-White & Farber (1997), als auch von Iversen *et al.* (2004) zu der Annahme, dass die gängigen Pasteurisierungsverfahren in der Lage sind, *Cronobacter* zuverlässig abzutöten. Die Kontamination der Säuglingsanfangsnahrung muss dementsprechend im Herstellungsbetrieb nach der Pasteurisierung, bei der späteren Rekonstitution oder bei der Lagerung der rekonstituierten Säuglingsnahrung erfolgen (Drudy *et al.*, 2006).

Cronobacter spp. zeigten ein besseres Überleben bei osmotischem Stress als andere aus pulverförmiger Säuglingsnahrung isolierte Organismen wie *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. und *Citrobacter* spp. (Breeuwer *et al.*, 2003). Eine Reihe von möglichen Gründen für diese Stressresistenz wird angeführt. Riedel & Lehner (2007) führten eine Proteomstudie durch, um 53 verschiedene Proteingruppen zu identifizieren, die an der osmotischen Stressreaktion von *Cronobacter* spp. beteiligt sind.

Obwohl die Thermotoleranz von Mikroorganismen durch ihren physiologischen Zustand beeinflusst wird (Lou & Yousef, 1996; Wesche *et al.*, 2005), wurden in den meisten Studien

1 Einleitung

zur thermischen Inaktivierung von *Cronobacter* spp. in rekonstituierter Säuglingsnahrung unter optimalen Laborbedingungen gezüchtete Referenzstämme verwendet (Breeuwer *et al.*, 2003; Edelson-Mammel & Buchanan, 2004; Iversen *et al.*, 2004a; Nazarowec-White & Farber, 1997). Daher wurde die Eigenschaft der Thermotoleranz der vorgestressten, d.h. dehydrierten *Cronobacter*-Zellen -wie sie vor der intrinsischen Kontamination von Säuglingsanfangsnahrungen auftreten würden- in weiteren Lagerungsversuchen untersucht. Lin & Beuchat (2007) und Gurtler & Beuchat (2007) untersuchten das Überleben von *Cronobacter* spp. in Säuglingsnahrung und Säuglingscerealien unter verschiedenen Lagerungsbedingungen für bis zu 12 Monate. Bei beiden Produkttypen war die Überlebensrate von *Cronobacter* spp. bei niedrigen Wasseraktivitäten und einer niedrigen Lagertemperatur (4 °C) größer. Der Organismus überlebte tendenziell seltener in Säuglingsanfangsnahrung mit höheren Wasseraktivitäten (a_w 0,43-0,50 im Vergleich zu a_w 0,25-0,30). Die Persistenz des Bakteriums in Säuglingsanfangsnahrung nahm mit steigender Lagertemperatur (4, 21 und 30 °C) ab. Die Bakterien überlebten in Säuglingscerealien bei 4 °C bis zu 12 Monate bei niedrigen Wasseraktivitäten (a_w 0,30-0,69), aber ihre Lebensfähigkeit nahm bei höheren Wasseraktivitäten (0,82-0,83) ab. Die Überlebensfähigkeit wurde auch durch die Lagertemperatur beeinflusst, wobei eine höhere Anzahl von *Cronobacter* spp. in Getreide (a_w 0,63-0,83) überlebte, das bei 4 °C gelagert wurde, als bei 21 oder 31 °C. Ähnlich wie das Überleben von *Cronobacter* spp. in Säuglingsnahrung wurde das Überleben in Säuglingscerealien nicht durch die Zusammensetzung beeinflusst.

Breeuwer *et al.* (2003) und Shaker *et al.* (2008) verwendeten ähnliche Verfahren zur Herstellung getrockneter Kulturen von *C. sakazakii* und *C. muytjensii* und stellten fest, dass das Trocknungsverfahren die Lebensfähigkeit von *Cronobacter* um 1 log₁₀ verringerte und nach 4 Tagen Lagerung der Keimgehalt von *Cronobacter* spp. um ≤ 1 log₁₀/ml sank. Im Weiteren wurde festgestellt, dass gegenüber erniedrigten Wasseraktivitäten *Cronobacter* spp. resistenter als andere *Enterobacteriaceae* waren. So nahmen z. B. die Keimzahlen von zwei *Cronobacter*-Stämmen (*C. sakazakii* und *C. muytjensii*) bei einem a_w -Wert von 0,81 innerhalb von zwei Wochen um drei bis vier, die von anderen verwendeten *Enterobacteriaceae*-Stämmen (*Salmonellen*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia rubidea* und *Citrobacter freundii*) dagegen um mehr als sechs Zehnerpotenzen ab. Eine vergleichbare Keimzahlreduktion wurde auch bei einer längeren Trocknung und Lagerung festgestellt. Nach einer Bebrütung in der stationären Phase getrockneter *Cronobacter*-Zellen bei 25 °C über 46 Tage war der Keimgehalt um ein bis eineinhalb, der von *E. coli* um vier Zehnerpotenzen gesunken. Ähnliche Ergebnisse wurden für eine Überlebensfähigkeit von 30 Monaten in Säuglingsfertignahrung auf Milchpulverbasis dokumentiert (Caubilla-Barron & Forsythe, 2007). Der Keimgehalt von *Cronobacter* spp. verringerte sich während des ersten Monats unter trockenen Bedingungen im Durchschnitt um 0,58 log₁₀ KbE/ml (Bereich, 0,26 bis 1,15

1 Einleitung

log₁₀ KBE/ml), wobei ein Gesamtrückgang lebensfähiger Organismen bei 4,52 log₁₀ Stufen im ausgetrockneten Zustand lag. Dieses Ergebnis entsprach den zuvor veröffentlichten Werten von 0,5 und 0,6-log₁₀-Reduktionen pro Monat (Edelson-Mammel *et al.*, 2005; Gurtler & Beuchat, 2005).

Die Untersuchungen von Breeuwer *et al.* (2003) haben gezeigt, dass sich die hohe Thermotoleranz von *Cronobacter* spp. eventuell mit der Anhäufung von Trehalose, die die Phospholipidmembran und Proteine stabilisiert, während der stationären Wachstumsphase erklären lassen könnte. Daneben scheinen auch die Akkumulation bestimmter protektiv wirkender Proteine bzw. eine Kapselbildung eine Rolle zu spielen.

González *et al.* (2006) untersuchten die Keimzahl in rekonstituierter Säuglingsnahrung unter Hochdruckbedingungen. Dabei beobachteten sie, dass innerhalb einer Minute bei einem Druck von 600 MPa und 25 °C eine Keimreduktion von 3 bis 6,84 log₁₀ Stufen erreicht wurde.

Bei einigen *Cronobacter*-Stämmen wurde eine mäßige Resistenz gegenüber Säure bis zu einem pH-Wert von 3,0 nachgewiesen, wobei diese Resistenz durch eine vorherige Exposition gegenüber non-lethal sauren Bedingungen verstärkt wird (Edelson-Mammel *et al.*, 2006). Studien haben auch gezeigt, dass das Überleben von *Cronobacter* spp. in einer Reihe von sauren Obst- und Gemüsesorten bei 25°C für bis zu 48 Stunden möglich ist (Kim & Beuchat, 2005). Säuren sind Schlüsselfaktoren für die Konservierung von Lebensmitteln, und in letzter Zeit haben sich die Studien auf die Nutzung der bakteriostatischen Eigenschaften dieser Säuren als antimikrobielle Mittel gegen *Cronobacter* spp. konzentriert, insbesondere in Säuglingsnahrungsmitteln und Babynahrungsprodukten. Die organischen Säuren wie Propionsäure und Essigsäure haben eine hohe Hemmwirkung auf das Wachstum und Überleben von *Cronobacter* Stämmen in Flüssigkeiten wie Fruchtsäften und Babynahrung gezeigt (Back *et al.*, 2009). Säfte aus roter Muskatnuss (*Vitis rotundifolia*) haben ebenfalls eine antimikrobielle Aktivität gegen *C. sakazakii* gezeigt, die auf der kombinierten Aktivität von Apfelsäure, Weinsäure und Gerbsäure in ihren Inhaltsstoffen beruht (Kim *et al.*, 2010). Die Kombination von Milchsäure und Kupfer in subletalen Konzentrationen hat ebenfalls eine Inaktivierung von *Cronobacter* spp. in Säuglingsnahrung zur Folge (Al-Holy *et al.*, 2010).

Als ein weiterer Mechanismus, der zum Überleben von *Cronobacter* spp. in Produkten mit niedrigem aw-Wert beiträgt, wurde der Übergang in das viable but nonculturable (VBNC)-Stadium diskutiert (Li *et al.*, 2014). Dabei handelt es sich um eine stressbedingte Anpassungsreaktion, bei der intrazelluläre Stoffwechselprozesse auf ein Minimum reduziert werden. Aufgrund der verringerten Metabolisierungsrate sind VBNC-Zellen resistenter gegen physikalische und chemische Umwelteinflüsse (Oliver, 2010). Zwar ist die Virulenz von VBNC-Zellen bei *C. sakazakii* noch weitestgehend unbekannt, jedoch könnten sie ähnlich wie bei

anderen Bakterien durch kurze Reaktivierungsprozesse ihre Virulenz zurückerlangen (Li *et al.*, 2014).

1.1.5 Biofilmbildung

Als Reaktion auf ihre wechselnde Wachstums Umgebung können Bakterien zur Erhöhung ihrer Tenazität so genannte Biofilme bilden. Bei Biofilmen handelt es sich um eine Aggregation von Bakterienzellen, die an abiotischen und biotischen Oberflächen gebunden sind (Lehner *et al.*, 2005). Dies ist eine wichtige Anpassungsüberlebensstrategie, mit der sich die Zellen, unter anderem lebensmittelrelevante Krankheitserreger, vor schädlichen Umwelteinflüssen wie UV-Strahlung, osmotischem Stress, Hitze, Nährstoffmangel, Desinfektionsmitteln und anderen antimikrobiellen Substanzen sowie der Immunantwort schützen können (Costerton *et al.*, 1995; O'Toole *et al.*, 2000; Prosser *et al.*, 2007). Die Biofilmphase wird mittlerweile als Standard-Lebensweise von Bakterien angesehen, und man geht davon aus, dass freilebende planktonische Bakterienzellen nur ein Übergangsstadium im bakteriellen Leben darstellen (Kragh *et al.*, 2016).

Die Biofilmbildung von *Cronobacter* ist ein komplexer und dynamischer Prozess mit einer Abfolge von Ereignissen, die das Anhaften, die Reifung und die Ausbreitung umfassen (Ling *et al.*, 2020) und von zahlreichen Faktoren, wie dem Vorhandensein von Nährstoffen, der Temperatur und der Oberflächenstruktur, abhängig sind (Kim *et al.*, 2006). Die freien planktonischen Zellen haften zunächst an der Oberfläche des Trägers und scheiden große Mengen extrazellulärer Polymere aus. Die Zellen klumpen zusammen und bilden eine polysaccharidhaltige extrazelluläre Matrix, die aus unterschiedlichen Substanzen wie Polysacchariden, Lipiden, Proteinen, extrazellulärer DNA und niedermolekularen Signalmolekülen besteht. Das Wachstum des Biofilms erreicht nach 72 Stunden sein Maximum. Im Zuge des weiteren Wachstumsprozesses kommt es ungefähr nach 96 Stunden durch Abspaltung einiger Aggregate von der Oberfläche zur Rekolonisation des Biofilms sowie zum kontinuierlichen Austritt planktonischer Zellen in die Umgebung (Ling *et al.*, 2018).

Die Kontamination von Lebensmitteln mit *Cronobacter* ist weitgehend auf die Bildung von Biofilmen auf mit Lebensmitteln in Berührung kommenden Oberflächen zurückzuführen. Solche Oberflächen können ein solides Substrat für die Entwicklung und Persistenz von Biofilmen in der gesamten Lebensmittelverarbeitungskette bilden. Diese Biofilme lassen sich nur schwer entfernen, was zu einer bakteriellen Kontamination von Lebensmitteln und potenziellen Gesundheitsrisiken für die Verbraucher führt (Lehner *et al.*, 2005, Hartmann *et al.*, 2010; Ling *et al.*, 2020). Anheften an verschiedene Oberflächen kann bereits nach einer Kontaktzeit von 24 h bei 37°C erfolgen. Insbesondere sind Materialien wie Polycarbonat,

Polyvinylchlorid (PVC), Latex, Silikon, in geringerem Ausmaß Edelstahl (Iversen *et al.*, 2004a) oder Glas (Lehner *et al.*, 2005) betroffen. Kim *et al.* (2006) stellten fest, dass bei der Anheftungsfähigkeit und der Biofilmbildung an Edelstahl und Magensonden aus Polyvinylchlorid Temperatur und Nährstoffangebot eine entscheidende Rolle spielen. Der Organismus heftete sich an beide Materialien bei 25 °C an und bildete nach der Anheftung Biofilme in Anwesenheit von rekonstituierter Säuglingsnahrung. Biofilme von *Cronobacter* auf Magensonden können für Neugeborene zu einem erhöhten Expositionsrisiko führen (Hurrell *et al.*, 2009a). In der intensivmedizinischen Versorgung von Frühchen mittels Magensonden bieten die Verabreichung von Säuglingsnahrungsmitteln dabei günstigere Voraussetzungen für das Wachstum von *C. sakazakii* und die Bildung des Biofilms (Hurrell *et al.*, 2009a). Einige Aggregate werden von der Oberfläche der Magensonde abgelöst und gelangen in den Gastrointestinaltrakt des Säuglings (Kim *et al.*, 2006).

Das Biofilmbildungsvermögen von *Cronobacter* hängt von der Produktion von extrazellulären polymeren Substanzen, Zellulosefasern und Curli-Fimbrien ab (Zogaj *et al.*, 2003; Hartmann *et al.*, 2010), wobei die Zellulosefasern eine extrazelluläre Komponente in Biofilmen darstellen (Lehner *et al.*, 2005). Hartmann *et al.* (2010) zeigten, dass neben dem Vorhandensein von Zellulose und extrazellulärer DNA auch intakte Flagellen für die Biofilmbildung von Bedeutung sind. Die Synthese der Zellulose spielt bei der Anhaftung zwar keine Rolle, jedoch führt der Verlust der Flagellen zu einer erkennbaren Reduktion des Adhäsionspotentials an Caco-2-Zellen (Hartmann *et al.*, 2010). Dancer *et al.* (2009) untersuchten die Biofilmbildungsfähigkeit von 72 *Cronobacter*-Stämmen im Rahmen der Herstellung von Magermilch. Hierbei beeinflussen Milchbestandteile ebenfalls die Biofilmbildung von *Cronobacter* spp. Molkenprotein und Kasein haben nachweislich einen stärkeren Einfluss auf die Biofilmbildung von *Cronobacter* in Magermilch als Laktose, und die Stickstoffquelle erwies sich als wichtiger als die Kohlenhydrate (Dancer *et al.*, 2009).

Ein wichtiger Bestandteil von Biofilmen sind Exopolysaccharide, die das Grundgerüst der Biofilmmatrix bilden und vor Umwelteinflüssen wie Hitze, Austrocknung oder der Immunantwort des Wirts schützen. Die Biofilmbildung und die Exopolysaccharidproduktion von *C. sakazakii* unterscheiden sich je nach Umweltbedingungen wie Kontaktflächeneigenschaften, Nährstoffverfügbarkeit und relative Luftfeuchtigkeit (Jung *et al.*, 2013). Beuchat *et al.* (2009) fanden heraus, dass Zellen in Biofilmen von *C. sakazakii* persistenter waren, wenn sie einer geringeren Feuchtigkeit ausgesetzt sind. In Milchproduktionsbetrieben wurde der Organismus in der Umwelt (d. h. auf Luftfiltern, Böden, Schuhen Lastwagen und Dächern) und in der Verarbeitungsausrüstung (z. B. in Walzentrocknern und Luftfiltern) gefunden und kann mehrere Monate lang persistieren.

1 Einleitung

Die Eigenschaft zur Biofilmbildung von *Cronobacter* begünstigt das Überleben insbesondere während der gesamten Haltbarkeitsdauer von pulverförmigen Säuglingsnahrungsmitteln und spielt insbesondere im Hinblick auf die Wirksamkeit von Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen eine Rolle (Iversen & Forsythe, 2003; Lehner *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2006; Grimm *et al.*, 2008).

Ye *et al.* (2015) untersuchten das Biofilmbildungsvermögen von aus Säuglingsnahrungsmitteln isolierten 23 *C. sakazakii*-Isolaten unter unterschiedlichen Konditionen wie pH-Werten, Temperaturen und Inkubationszeiten, und stellten fest, dass die Biomasse und die Eigenschaften der Polysaccharide bei der Biofilmbildung von *C. sakazakii*-Isolaten sehr stammspezifisch waren und von der Mikroumgebung der Kultur beeinflusst wurden. Im Weiteren untersuchten diese Autoren die Auswirkungen von Ca^{2+} und Mg^{2+} auf die Biofilmbildung von den *C. sakazakii*-Isolaten und stellten fest, dass die Kationenkonzentrationen die Bildung der Gesamtbiofilme beeinflussten, wobei 1,50% MgCl_2 und 0,25% CaCl_2 optimale Wachstumsbedingungen boten.

1.1.6 Virulenzfaktoren und Pathogenität

Cronobacter spp. besitzen eine Vielzahl einzigartiger Merkmale, die die Fähigkeit des Organismus unterstützen, unter verschiedenen stressigen Wachstumsbedingungen zu überleben. Diese Eigenschaften können auch für den Organismus von Vorteil sein, wenn sie mit dem Menschen interagieren (Yan *et al.*, 2015; Lehner *et al.*, 2018). Virulenzfaktoren können einerseits Strukturelemente, wie z.B. Zellwandkomponenten, andererseits auch Stoffwechselprodukte, wie z.B. Enterotoxine, sein. Sie führen zur Besiedlung des Wirtsorganismus und/oder Schädigung des Wirts, was sich in klinischen Symptomen äußert. Virulenzfaktoren bestimmen somit beispielsweise die Infektiosität, die Gewebeaffinität und die Toxizität. Auch wenn Infektionen mit *Cronobacter* spp. nicht sehr häufig sind, wurden in den letzten Jahren aufgrund der klinischen Bedeutung von *Cronobacter* spp. insbesondere für Säuglinge eine Vielzahl von *in vitro*- und *in vivo*-Modellen zur Untersuchung der durch *Cronobacter* ausgelösten Erkrankungen verwendet. Allerdings sind die Pathogenitätsmechanismen von *Cronobacter* spp. noch immer größtenteils unbekannt (Hunter *et al.*, 2008; Richardson *et al.*, 2009). Bis heute wurde eine Reihe von Berichten über die mutmaßlichen Virulenzfaktoren, wie Toxinproduktion, Adhäsion und Invasion, Anpassung an Stressfaktoren, das Vorhandensein von Virulenzgenen und die Antibiotikaresistenz veröffentlicht.

Epidemiologische und *in-vitro*-Zellkulturstudien haben gezeigt, dass *Cronobacter*-Spezies unterschiedliche Virulenzfähigkeiten aufweisen (Caubilla-Barron *et al.*, 2007; Townsend *et al.*,

1 Einleitung

2007a, 2008; Almajed & Forsythe, 2016). Dennoch wurden alle *Cronobacter*-Spezies außer *C. condimenti* mit menschlichen Krankheiten in Verbindung gebracht und es wurde auch festgestellt, dass die Virulenz der verschiedenen Spezies unterschiedlich stark ausgeprägt ist. *C. sakazakii* ist die Typspezies der Gattung und war bisher am häufigsten bei Infektionen assoziiert, gefolgt von *C. malonaticus* und *C. turicensis* (Kucerova *et al.*, 2010). Allerdings wurde der *C. muytjensii*-Typstamm ATCC 51329^T in der Mehrzahl der Virulenzstudien an Laborversuchstieren verwendet, wobei dieser Qualitätskontrollstamm vor der taxonomischen Klassifizierung als *E. sakazakii* bekannt war (Mittal *et al.*, 2009). Bisher wurden keine klinischen Fälle für diese *Cronobacter*-Spezies gemeldet, so dass die Relevanz der Studien ungewiss ist.

C. sakazakii ist die dominierende *Cronobacter*-Spezies, die mit Erkrankungen bei Säuglingen und Erwachsenen in Verbindung gebracht wird (Iversen & Forsythe, 2003; FAO/WHO, 2004, 2008; Lai, 2001; Bowen & Braden, 2006; Alsonosi *et al.*, 2015). Dieses Bakterium ist stark mit schweren und oft tödlichen Fällen von nekrotisierender Enterokolitis und Meningitis bei Neugeborenen und Säuglingen assoziiert. Unter Verwendung des Multi-Locus-Sequenztypisierungs-(MLST)-Schemas (Baldwin *et al.*, 2009) zeigten Joseph *et al.* (2012) und Joseph & Forsythe (2012), dass bestimmte *C. sakazakii*-Sequenztypen (ST) mit spezifischen Krankheitserscheinungen in Verbindung stehen. Beispielsweise wurde *C. sakazakii* ST4 mit Fällen von infantiler Sepsis und Meningitis assoziiert (Hariri *et al.*, 2013). Weitere klinisch bedeutsame Sequenztypen von *C. sakazakii* sind ST1, ST8, ST12, ST15, ST40, ST107, ST110 und ST111. Interessanterweise bilden die ST-Profile ST15, ST97, ST107, ST108 und ST110 eng mit dem ST4-Allelprofil einen klonalen Komplex, CC4 (Joseph & Forsythe, 2012). Alsonosi *et al.* (2015) berichteten von einer Dominanz von *C. sakazakii* ST4-Stämmen bei Pneumonie, Wundinfektionen und Harnwegsinfektionen bei Erwachsenen. Darüber hinaus wurde *C. sakazakii* mit ST12-Allelen in Verbindung mit Fällen von nekrotisierender Enterokolitis gebracht (Forsythe *et al.*, 2014). Neben den klinisch bedeutsamen ST1-, ST4- und ST8-Stämmen, die auch in Herstellungsumgebungen von pulverförmigen Säuglingsanfangsnahrungsmitteln in Nordamerika, Europa und China isoliert wurden, sind ST31, ST40, ST64, ST83, ST103, ST196, ST194 und ST190 weitere wichtige Sequenztypen (Müller *et al.*, 2013; Pightling & Pagotto, 2014). Interessanterweise zeigte die Analyse der Ganzgenomsequenzierung, dass *C. sakazakii* einen nanAKT-Gencluster besitzt, der die Nutzung von exogener Sialinsäure als Kohlenstoffquelle und das Wachstum auf dem Gangliosid GM1 ermöglicht (Joseph *et al.*, 2013). Ernährungsphysiologisch steht Sialinsäure mit der Entwicklung des Gehirns in Verbindung und kommt üblicherweise in Muttermilch, Darmmucin und Gangliosiden im Gehirn vor. Daher ist Sialinsäure auch ein Bestandteil von pulverförmigen Säuglingsanfangsnahrungsmitteln. Dies könnte eine wichtige evolutionäre Wirtsanpassung sein.

C. malonaticus-Infektionen wurden bei ca. einem Drittel der Krankheitsfälle im Zusammenhang mit *Cronobacter*, jedoch unabhängig vom Alter, nachgewiesen und spielen eventuell eine größere epidemiologische Bedeutung für Atemwegsinfektionen, als bisher angenommen (Alsonosi *et al.*, 2015). Der Sequenztyp der isolierten Stämme war zu Cmal ST7 zugeordnet. Eine Abfrage der *Cronobacter* MLST-Datenbank (zuletzt abgerufen am 26.06.2024) bezüglich der *C. malonaticus* STs, die in klinischen Fällen beteiligt waren, zeigte eine Vorherrschaft von Cmal ST7-Stämmen (214/459, 47 %), gefolgt von ST11-, ST60-, ST307- und ST84-Stämmen.

Die klinisch bedeutsamen Sequenztypen von *C. turicensis* sind ST5, ST19, ST309, ST350 und ST636. Die Meistens dieser STs stammten aus Europa. Es waren 181 *C. turicensis*-Einträge auf der *Cronobacter*-MLST-Datenbank (zuletzt abgerufen am 26.06.2024) registriert, die aus verschiedenen Quellen stammten, darunter Milchpulver, Wasser, Gewürze, Tee, Gemüse, Insekten, Herstellungsumgebungen und verzehrfertige Lebensmittel.

In den letzten Jahren (bis zu dieser Veröffentlichung) beschäftigten sich einige Studien mit der Ganzgenomsequenzierung verschiedener *Cronobacter*-Stämme, um einige potentielle Virulenzfaktoren als Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen aufzeigen (Kucerova *et al.*, 2010; Stephan *et al.*, 2011). Die sequenzierten Ganzgenome von *Cronobacter*-Spezies besitzen eine Reihe von Adhäsinen, Außenmembranproteinen, Effluxsystemen, Eisenaufnahmemechanismen, Hämolytinen und Typ-VI-Sekretionssystemen, die zur Virulenz des Organismus beitragen könnten (Grim *et al.*, 2012; Joseph *et al.*, 2012a; Kucerova *et al.*, 2010, 2011; Stephan *et al.*, 2010). Kucerova *et al.* (2010) veröffentlichten die Genomsequenz des aus Säuglingsanfangsnahrung isolierten *C. sakazakii* Stamm ATCC® BAA-894, der mit der klinischen Infektion und dem Tod eines Neugeborenen in Tennessee 2001 in Verbindung steht (Himmelright *et al.*, 2002). Das Genom von *C. sakazakii* BAA-894 besitzt ca. 4382 Gene, von denen 223 Gene als virulenz- und krankheitsrelevant annotiert wurden. Mittels comparative genomic hybridization (CGH) wurde das Genom von *C. sakazakii* BAA-894 mit den Genen zehn verschiedener Stämme der anderen *Cronobacter*-Spezies *C. malonaticus*, *C. turicensis*, *C. muytjensii* und *C. dublinensis* verglichen. Einige Gene wurden ausschließlich in den *Cronobacter*-Spezies *C. sakazakii*, *C. turicensis* und *C. malonaticus* gefunden, die mit neonatalen Infektionen in Verbindung gebracht wurden, wobei die Mehrheit dieser gemeinsamen Gene (ca. 43%) für essentielle Zellfunktionen wie Proteinbiosynthese, Energiemetabolismus, Zellteilung und Membrantransportmechanismen kodiert. Darunter ein Gen-Cluster *cusC* das für ein Kupfer/Silber-Resistenz-System kodiert, welches bekanntermaßen bei der Invasion des *E. coli*- Stammes K1, ebenfalls einem Verursacher von Neugeborenen-Meningitis, von Bedeutung ist (Kucerova *et al.*, 2010). Es wurde festgestellt, dass die kodierten Proteine von den 21 Genen, die ausschließlich bei *C. sakazakii* vorkommen, bei Pilusaufbau, Phototransferase-Systemen sowie Säure- und Toxin/Antitoxin-Transportsystemen eine Rolle spielen (Kucerova *et al.*, 2010).

1 Einleitung

Basierend auf Gesamtgenomsequenzierungsstudien von Ogrodzki & Forsythe (2015) wurde ein wichtiges Kapseltypisierungsschema unter Verwendung des K-Antigens und der Colaninsäure-(CA)-Biosyntheseregionen beschrieben. Es basierte auf Untersuchungen aus der Analyse von 104 *Cronobacter*-Stämmen auf das Vorhandensein einer zuvor nicht charakterisierten *Cronobacter*-Kapselregion (kps). Diese Region ähnelt dem gut beschriebenen K-Antigen-Gencluster von *Escherichia coli*. und besteht aus drei Regionen: K-Antigen-Region 1 (kpsEDCS) und Region 3 (kpsTM) sind im gesamten *Cronobacter* spp. konserviert. Es wurden zwei Varianten der Region 2 gefunden. Gene, die mit dem K-Antigen-Typ 1 assoziiert sind, sind in allen sieben *Cronobacter* spp. vorhanden. Die Prävalenz und Verteilung des K-Antigen-Typs 2 (insbesondere das Kapselprofil K-Antigen-Gencluster 2–Colaninsäure-Gencluster 2–zellulosepositives Profil) sind jedoch nicht so verbreitet in allen sieben Arten, da dieses Profil nur in *C. sakazakii*, *C. malonaticus*, *C. turicensis* und *C. dublinensis* vorkommt. Das Vorhandensein dieses Kapseltyps verleiht speziell in *C. sakazakii*- und *C. malonaticus*-Stämmen einen vorteilhaften Phänotyp und führt zu Austrocknungsresistenz, Persistenz und Serumresistenz sowie einer erhöhten Überlebensfähigkeit in Makrophagen (Ogrodzki & Forsythe, 2015).

Obwohl die einzelnen Mechanismen bisher noch nicht vollständig geklärt sind, wurden aus der vollständigen Genomsequenzierung des aus einer neonatalen Erkrankung isolierten *C. turicensis* -Stammes LMG 23827 (Ctu 3032), mehrere potenzielle Virulenzfaktor-Kandidaten postuliert (Stephan *et al.*, 2011). Der klinische Stamm Ctu 3032 wurde aus dem Blut eines Neugeborenen in einem Züricher Kinderkrankenhaus isoliert und war für den Tod von zwei Neugeborenen verantwortlich (Mange *et al.*, 2006). Das Genom von *C. turicensis* LMG 23827 (Ctu 3032) besitzt ca. 4382 Gene, von denen 223 Gene als virulenz- und krankheitsrelevant annotiert wurden. Das Genom des klinischen Stammes Ctu 3032 besitzt ca. 4455 kodierende Gensequenzen, von denen ca. 223 Gene mithilfe der öffentlichen Sequenzierungsdatenbanken als virulenz- und krankheitsrelevant annotiert wurden. So kodieren sie beispielsweise für einen putativen O-Antigen-Cluster, für Gene der Exopolysaccharidbiosynthese oder für kapsuläre Polysaccharide.

Wie bei vielen enteropathogenen Erregern besitzen *Cronobacter* spp. ein weiteres gemeinsames Merkmal: Plasmide, die zur genomischen Plastizität, bakteriellen Virulenz und dem Überleben beitragen (Johnson & Nolan, 2009). Im Allgemeinen kodieren solche Plasmide bei *Enterobacteriaceae* eine Vielzahl von Virulenzfaktoren, wie z. B. Gene für Antibiotikaresistenz, Toxine, Adhärenzfaktoren und Sekretionssysteme. Es wird angenommen, dass Plasmid-getragene Virulenzgene (oder Gencluster) durch horizontalen Gentransfer erworben werden (Juhas *et al.*, 2008). Tatsächlich war die Gruppe um Muijtjens *et al.* (1983) die erste, die Plasmide bei klinischen *Cronobacter*-Stämmen (ehemals *E. sakazakii*) im Kontext von neonataler Meningitis und Sepsis identifizierte und charakterisierte.

Andere Studien zeigten ebenfalls, dass solche Stämme (ehemals *E. sakazakii*) Plasmide unterschiedlicher Größe besaßen (Biering *et al.*, 1989; Simmons *et al.*, 1989; Clark *et al.*, 1990). Diese Stämme wurden bei erkrankten Säuglingen, auf Utensilien zur Zubereitung von Säuglingsnahrung und in PIF-Behältern isoliert. In den Jahren 2010 – 2011 wurden die ersten Ganzgenomsequenzierungen vom *C. sakazakii*-Stamm BAA-894 und *C. turicensis*-Stamm LMG23827^T durchgeführt (Kucerova, *et al.*, 2010; Stephan *et al.*, 2011). Franco *et al.* (2011) charakterisierten diese Plasmide pESA3 (131 kbp) und pCTU1 (138 kbp) und zeigten, dass sie jeweils ein einziges und gemeinsames RepFIB-ähnliches (Inkompatibilitätsklasse) Ursprungsgen der Replikation, *repA*, sowie zwei Eisenaufnahme-Gencluster, *eitCBAD* (ABC-Ferric-Eisen-Transporter) und *iucABCD/iutA* (Hydroxamat-Typ Siderophor Aerobactin, genannt Cronobactin), kodieren (Kucerova, *et al.*, 2010; Stephan *et al.*, 2011). Der *iucABCD/iutA*-Gencluster wurde als der einzige bekannte *Cronobacter*-Siderophor, ein multiples Eisenaufnahmesystem, bei allen sieben *Cronobacter*-Spezies beschrieben (Grimm *et al.*, 2012). Diese Redundanz in den Eisenaufnahme-Genen könnte die Nischendiversität widerspiegeln, die von *Cronobacter*-Arten besetzt wird (wie eukaryotische Pflanzen, PIF-Herstellungsanlagen und Fliegen, um nur einige zu nennen), sowie die Verfügbarkeit und Bioverfügbarkeit verschiedener Eisenquellen in diesen einzigartigen Umgebungen.

Als eine weitere Virulenzeigenschaft von *Cronobacter* wurden fünf Sekretionssysteme identifiziert, die molekulare Nanomaschinerien in der Zellhülle von Bakterien darstellen, die die Freisetzung von Molekülen ermöglichen und eine zentrale Rolle bei der Interaktion mit der Umwelt spielen (Filloux, 2011). Die Sekretionssysteme sind oft an symbiontischen oder pathogenen Wechselwirkungen beteiligt (Tseng *et al.*, 2009). Bei *Cronobacter* spp. sind bisher fünf Typen von Sekretionssystemen (Typ-1, -2, 4, 5 und 6) bekannt (Filloux, 2011). Das Typ-VI-Sekretionssystem transportiert das Effektorprotein in Wirtszellen oder in das Umgebungsmilieu, indem es eine nach außen gerichtete phagenähnliche Struktur zur Sekretion verwendet. Viele der Effektorproteine (wie hemolysin co-regulated protein 1 (Hcp1) und valine-glycine repeat G protein (VgrG)) sind Toxine, die eine Rolle bei der bakteriellen Pathogenese und dem Überleben in der Umwelt spielen. Dies geschieht durch die Erhöhung der Konkurrenzfähigkeit, indem sie die Wirt-Pathogen-Interaktionen von der Pathogenese weg und hin zu einem kommensalen oder mutualistischen Zustand lenken oder durch die Vermittlung kooperativer Interaktionen zwischen Bakterien (Franko *et al.*, 2011). Mehrere Typ-VI-Sekretionssystem-Gencluster wurden unter den verschiedenen *Cronobacter* Spezies identifiziert, die sich sowohl im Kern-Genom als auch auf dem Plasmid in *C. sakazakii* befinden (Franko *et al.*, 2011). Kürzlich wurde über zwei Typ-VI-Sekretionssystemen in einem *C. sakazakii*-Stamm 12868 berichtet. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass das Sekretionssystem-1 zu interbakteriellen Konkurrenzprozessen beitragen könnte, was *C. sakazakii* ermöglichen könnte, besser mit anderen Arten in bestimmten Nischen zu

konkurrieren, und dass das Sekretionssystem-2 während der Wirt-Interaktion wichtig sein könnte.

Als weitere Virulenzdeterminante wurde eine Zink-Metalloprotease beschrieben. Die zellgebundene Metalloprotease könnte einen engen Kontakt zwischen Bakterien und Wirtszellen erfordern, um die zytopathischen Effekte durch den Abbau löslicher Proteine zu initiieren (Kothary *et al.*, 2007). Die Rolle dieser Protease bei Krankheiten könnte in ihrer Beteiligung an Nekrosen und Zellschäden bei Neugeborenen mit nekrotisierender Enterokolitis liegen; sie könnte auch für die bei Meningitis beobachtete Pathologie verantwortlich sein (Pagotto *et al.*, 2003).

1.1.7 Adhäsion und Invasion

Gastrointestinale Krankheitserreger wie *Cronobacter* spp. verursachen in der Regel Erkrankungen, indem sie eine Reihe von physikalischen, chemischen, mikrobiellen und immunologischen Barrieren des Wirts überwinden. Wie bei den meisten gastrointestinalen Krankheitserregern ist die menschliche Schleimhaut oder Schleimhautmembran die erste Kontaktstelle, die es auch *Cronobacter* spp. ermöglicht, ein gut bekanntes bakterielles Infektionsschema zu verfolgen: (i) Kolonisierung an einer Schleimhautstelle, z. B. an Darm-, Atemwegs- oder Harnwegsepithelien, (ii) Umgehung, Unterwanderung und Ausnutzung der Wirtsabwehr, z. B. Invasion von Darmepithelzellen oder Internalisierung und Überleben in phagozytischen Zellen, was auch dem Erreger eine Nische mit geringerer Konkurrenz durch andere Mikroorganismen bieten kann, sowie die Bereitstellung von (iii) systemischer Ausbreitung und Vermehrung, z. B. im Blut, in Phagozyten, oder an extraintestinalen Stellen wie den Hirnhäuten, und (iv) Schädigung des Wirts, z. B. durch Expression von Exoproteinen wie Toxinen und/oder Schäden aufgrund einer entzündungsfördernden Modulation des Immunsystems des Wirts (Jang *et al.*, 2020). *Cronobacter* kodieren viele Virulenzfaktoren, die bei den Prozessen wie Adhäsion, Invasion und Störung der Darm- und Blut-Hirn-Schranke beteiligt sind. Trotz zahlreicher Untersuchungen zum Adhäsions- und Invasionsvermögen von *Cronobacter* spp. in den letzten Jahren ist der genaue Invasions-Mechanismus noch immer unbekannt. Es wurde vermutet, dass die hohe Infektionsrate von *Cronobacter* bei Neugeborenen auf die unreife Darmbarriere zurückzuführen ist, die anfällige Darmschleimhaut führt bei *Cronobacter* zu einer bakteriellen Translokation in andere Gewebe (Townsend *et al.*, 2007). In Verbindung mit einer Dysfunktion des Darmimmunsystems kann das Flagellum von *Cronobacter* eine Reihe von entzündlichen Zytokinen wie IL-8, TNF und IL-10 bzw. eine Entzündungskaskade induzieren, die zu weiteren Darmentzündungen und schließlich zur Darmnekrose führt (Cruz-Córdova *et al.*, 2012).

1 Einleitung

Einer der am besten konservierten Phänotypen von *Cronobacter* ist ihre Fähigkeit, die Darmschleimhaut zu besiedeln und trotz der Peristaltik mit dem Darmmikrobiom um Nährstoffe zu konkurrieren (Jaradat *et al.*, 2014). Die Expression von Adhärenzfaktoren wie Fimbrien oder Pili und Adhäsinsproteinen der äußeren Membran ist ein gemeinsames Merkmal aller *Cronobacter*-Stämme und repräsentiert verschiedene Klassen von sekretierten und polymerisierten Exoproteinen (Jaradat *et al.*, 2014; Kucerova *et al.*, 2010).

Nach erfolgreicher Anheftung von *Cronobacter* spp. an Darmzellen dringt der Erreger in die Zellen ein, wobei er die Darmgewebescheiden durchquert, in Makrophagen persistiert und in den Blutkreislauf (Bakteriämie) gelangt, in mikrovaskuläre Endothelzellen des Gehirns eindringt und die Blut-Hirn-Schranke überwindet, was zu extraintestinalen Infektionen wie Sepsis und lebensbedrohlicher Meningitis führt (Nair & Venkitanarayanan, 2007; Almajed & Forsythe, 2016; Townsend *et al.*, 2007, 2008).

Die Adhäsion von *Cronobacter* an Rezeptoren des Wirtsgewebes ist der erste Schritt der Erkrankung, z. B. durch die Verwendung von Fimbrien zur Anheftung an die Oberfläche von Darmepithelzellen (Eshwar *et al.*, 2015), gefolgt von der Invasion der Wirtszellen (Mange *et al.*, 2006). Die Fimbrien werden durch den *sfp*-Gencluster kodiert (Cui *et al.*, 2019), und P-Fimbrien erhöhen die Infektionsrate der neonatalen Meningitis (Grim *et al.*, 2013).

Liu *et al.* (2013) und Zogaj *et al.* (2003) zeigten, dass *Cronobacter* den Gastrointestinaltrakt besiedeln kann, ohne eine Krankheit zu verursachen. Es sind jedoch mehr epidemiologische Informationen erforderlich, um die Funktion von *Cronobacter* als Mitglied der Darmmikrobiota zu verstehen und um festzustellen, ob sein Vorhandensein eine vorübergehende Besiedlung bestimmter Stämme oder anderer Arten von Wirtsassoziationen darstellt und wie sich verschiedene Bakterien daran anpassen und weiterentwickeln. In-vitro-Studien haben gezeigt, dass die Anheftung und die Invasion von *Cronobacter* an Säugetier-Darmzellen, das Überleben in Makrophagen und die Serumresistenz mit denen von *E. cloacae* und *Citrobacter freundii* vergleichbar sind, aber weniger mit denen von *Salmonella* Typhimurium (Forsythe 2018).

Um in Makrophagen persistieren bzw. proliferieren zu können, müssen die *Cronobacter* einen Virulenzmechanismus gegen bakterizide Abwehrmechanismen der Makrophagen aufweisen. Dieser Mechanismus konnte bis zum heutigen Tag jedoch nicht aufgedeckt werden. Auch eine direkte Korrelation zwischen in vitro-Studien und dem klinischen Verlauf konnte bislang nicht gezeigt werden (Mange *et al.*, 2006; Townsend *et al.*, 2008). Die invasive Fähigkeit von *Cronobacter* wurde von mehreren Forschern anhand von Säugetierzelllinien untersucht. Townsend *et al.* (2008) untersuchten vier verschiedene *C. sakazakii*-Isolate aus einem tödlichen Ausbruch auf einer Neugeborenen-Intensivstation in Frankreich und stellten fest, dass alle untersuchten Isolate sich an Intestinalzellen (Caco-2) und Endothelzellen der

Hirnkapillaren sowohl anheften als auch in diese eindringen konnten. Eine stärkere Invasivität wurde bei den aus den tödlichen Meningitis- und Darmnekrose-Fällen isolierten Stämmen vergleichbar mit einem meningitischen *E. coli* K1-Stamm beobachtet (Townsend *et al.*, 2007; 2008). Hartmann *et al.* (2010) fanden heraus, dass verschiedene *C. sakazakii*-Transposoninsertionsmutanten mit defekter oder gar fehlender Flagellenstruktur eine verminderte Adhäsionsfähigkeit an Caco-2-Zellen aufweisen. Kim & Loessner (2008) fanden heraus, dass das Eindringen und die Invasion von *Cronobacter* in Caco-2-Zellen ein aktiver Prozess ist, der eine de-novo-Proteinsynthese erfordert, und dass Aktinfilamente, Mikrotubuli-Strukturen und die Unterbrechung der tight junctions bei den Adhäsions- und Invasionseigenschaften des Organismus eine Rolle spielten. Giri *et al.* (2012) bestätigten, dass *Cronobacter*-Isolate in der Lage sind, durch dichte Monoschichten von Caco-2-Zellen und humanen mikrovaskulären Hirnepithelzellen zu transzytieren, und ahmten damit die Fähigkeit nach, in vivo den Darm und anschließend die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden und eine Meningitis zu verursachen. Mange *et al.* (2006) charakterisierten die Adhäsionseigenschaften der *Cronobacter* in-vitro unter Verwendung von HeLa- und Caco-2-Epithelzellen sowie humanen mikrovaskulären Hirnepithelzelllinien und fanden heraus, dass die Adhäsion multifaktoriell war und am höchsten während der späten exponentiellen Wachstumsphase. Jüngste in-vitro-Studien wiesen die Rolle von dendritischen Zellen bei der Gewebeschädigung während der Darmnekrose nach (Emami *et al.*, 2011). Singamsetty *et al.* (2008) legten nahe, dass humane, mikrovaskuläre Hirnepithelzellen anfälliger für die Invasion von *Cronobacter* spp. waren, und wiesen eine höhere Invasionshäufigkeit bei humanen mikrovaskulären Hirnepithelzellen nach als bei Endothel- und Epithelzellen unterschiedlicher Gewebsherkunft.

1.1.8 Außenmembranproteine

Weitere Virulenzfaktoren sind die multifunktionellen Außenmembranproteine A und X (*outer membrane protein* OmpA and OmpX), welche in mehreren Bakterienzellen wie auch in *Enterobacteriaceae* vorkommen. Sie sind an der Adhärenz, der Invasion von Epithelzellen des Darms und von Endothelzellen des Gehirns durch Bindung der Bakterienzellen an das Fibronectin der Wirtzellen beteiligt. Das ompA ist ein wichtiger und vergleichsweise gut charakterisierter Virulenzfaktor der *Cronobacter* spp. (Nair *et al.*, 2009). Das Glykoprotein Fibronectin ist ein Teil der extrazellulären Matrix eukaryotischer Zellen, und spielt eine zentrale Rolle bei der Adhäsion verschiedener pathogener Keime unter anderem *Cronobacter* an den Rezeptor für das Porin OmpA (Nair & Venkitanarayanan, 2007, Kim *et al.*, 2010, Mange *et al.*, 2006, Smith *et al.*, 2007). Die β -barrel-Faltstruktur des ompA Proteins dient als wichtiger Rezeptor für verschiedene Bakteriocine und Bakteriophagen und als Vermittler der bakteriellen Konjugation und Virulenz (Krishnan & Prasadarao, 2012). In einer Reihe von Studien wurde

1 Einleitung

der Zusammenhang zwischen dem ompA und der Virulenz von *Cronobacter* spp. nachgewiesen, sodass OmpA nicht nur für die Invasion in die Darmendothelzellen sondern auch in mikrovaskuläre Hirnendothelzellen von großer Bedeutung ist (Smith *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2010).

Die Bedeutung von OmpA für die Schädigung der Zellbarriere bei nekrotisierender Enterokolitis wurde bereits für andere enteroinvasive *Enterobacteriaceae* wie *Escherichia coli* beschrieben. Nair & Venkitanarayanan (2007) haben gezeigt, dass ompA zusammen mit zellulären Mikrotubuli und Mikrofilamenten eine Rolle bei der Invasion von *Cronobacter* auf Darmepithelzellen spielt. Hunter *et al.* (2008) analysierten die Stickstoffmonoxid-Produktion intestinaler Epithelzellen von Ratten nach einer Infektion mit *C. sakazakii* und stellten fest, dass die Infektion zu einer erhöhten Stickstoffmonoxid-Produktion führt und folglich die Apoptose der Epithelzellen verursacht. Emami *et al.* (2011) untersuchten im nekrotisierende Enterokolitis-Maus-Modell die Wechselwirkung zwischen *C. sakazakii*-Stämmen und dendritischen Zellen und stellten fest, dass die ompA-positiven Stämme zu einer Erhöhung des inflammatorischen Mediators Stickstoffmonoxid führten, der bei der Entstehung der nekrotisierenden Enterokolitis durch den zytopathischen Effekt auf die Blut-Darm-Barriere entscheidend beitragen konnte (Emami *et al.*, 2011). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Schädigung der Zellbarriere bei *C. sakazakii*-Infektionen in einem direkten Zusammenhang mit der Mobilisierung dendritischer Zellen und der Unterdrückung ihrer Reifung stehen, so führt dies zur Zerstörung von zellulären *tight junctions*, einer erhöhten Membranpermeabilität und letztendlich zur Apoptose intestinaler Epithelzellen. Dies scheint für die Pathogenese der nekrotisierenden Enterokolitis eine wesentliche Rolle zu spielen (Emami *et al.*, 2011).

Ein zentrales Ereignis in der Pathogenese einer durch *Cronobacter* spp. verursachten Meningitis stellt die Interaktion der ompA-positiven *Cronobacter* spp. mit den Zellen der menschlichen Blut-Hirn-Schranke dar. Endothelzellen der Hirnkapillaren sind durch das Vorhandensein sog. *tight junctions* charakterisiert, die einen passiven parazellulären Durchtritt aller sonst kapillargängigen Stoffe verhindern und eine selektive Permeabilität gewährleisten. OmpA bindet an die Fibronektinrezeptoren der Zelloberfläche und ermöglicht so die Invasion des Keims (Nair *et al.*, 2009; Kim & Loessner 2008, Kim *et al.*, 2010). In verschiedenen Zelllinien wurde eine Reduzierung der Invasionsrate um mehr als 80 % für OmpA-Deletionsmutanten im Vergleich zum *C. sakazakii* mit intaktem OmpA in vitro beobachtet (Nair *et al.*, 2009, Kim *et al.*, 2010). Singamsetty *et al.* (2008) führten Studien mit OmpA-positiven *Cronobacter* spp. durch, um die Rolle des Proteins bei der Verursachung von Meningitis durch Vermehrung im Blut und Überwindung der Blut-Hirn-Schranke nachzuweisen. Darüber hinaus konnten Mittal *et al.* (2009) die Bedeutung des OmpA für das Überleben von *C. sakazakii* in einem Meningitis-Tiermodell (neugeborene Ratten) nachweisen und stellten fest, dass die

1 Einleitung

beiden ompA-negativen und -positiven *C. sakazakii*-Stämme zwar in dendritischen Zellen aufgenommen werden, jedoch nur Stämme mit intaktem OmpA in dendritischen Zellen persistieren und replizieren können. Die OmpA-positiven Stämme banden an SIGN Proteine in dendritischen Zellen, induzierten die Bildung immunsuppressiver Faktoren wie IL-10 und TGF- β und unterdrückten letztlich die Reifung der dendritischen Zellen (Mittal *et al.*, 2009). OmpA spielt also auch eine wichtige Rolle in der Umgehung der primären Immunantwort.

Andere Faktoren wie z.B. fkpA (auch bekannt als Makrophagen-Infektivitäts-Potenzierer-ähnliches Protein) sind ein Virulenzfaktor, der *Cronobacter* die Fähigkeit verleiht, innerhalb von Makrophagen zu überleben, sich zu replizieren und möglicherweise auch zu einer Persistenz in Umgebungen mit hoher Stressbelastung beiträgt (Brady *et al.*, 2013; Holý & Forsythe, 2014). Pathogen-gerichtete Demethylierung, Dephosphorylierung und Acetylierung von Histonen wurden für *Cronobacter* noch nicht vollständig untersucht, wie es bei Infektionen mit *Bacillus anthracis*, *Escherichia coli* und *Helicobacter pylori* der Fall ist (Craven *et al.*, 2010).

1.1.9 Endo- und Enterotoxine

Einer der ersten Versuche, die Pathogenität von *Cronobacter* zu verstehen, wagte die Arbeit von Pagotto *et al.* (2003), die die Enterotoxin-Produktion verschiedener *Cronobacter*-Stämme mit Hilfe des Mäusesäuglingstestes untersuchte. Pagotto *et al.* (2003) beschrieben erstmals, dass vier von 18 *Cronobacter*-Isolaten enterotoxinähnliche Verbindungen produzierten, die zusammen mit Lipopolysacchariden eine Entzündung auslösten. Diese enterotoxinähnlichen Verbindungen erhöhten den Gehalt an zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) in den Darmepithelzellen, die daraufhin kontinuierlich Wasser, Natrium, Chlor und Kaliumbicarbonat in das Darmlumen sezernierten und dadurch Durchfall verursachten. Raghav & Aggarwal (2007) identifizierten eine enterotoxinähnliche Verbindung mit einem Molekulargewicht von 66 kDa, die nach einer 30-minütigen Wärmebehandlung bei 90 °C im Tiermodell noch aktiv war. Yang *et al.* (2009) untersuchten im *suckling mouse model* die Wirkung von *Cronobacter*-Enterotoxinen und stellten fest, dass die Überlebensrate der Mäuse nach 72 Stunden nur 33 % betrug, wenn 10^4 - 10^5 KBE/ml *Cronobacter* injiziert wurden, wobei ab 10^7 KBE/ml alle Mäuse starben (Yang *et al.*, 2009). Dennoch sind die Gene, die für das Toxin kodieren, immer noch unbekannt, so dass weitere Forschungen zu den Eigenschaften und dem Bildungsmechanismus von *Cronobacter*-Enterotoxin erforderlich sind. Aufgrund der bisherigen Datenlage bleibt die Produktion von Enterotoxinen bei *Cronobacter* spp. umstritten. Neben der Produktion von Enterotoxinen waren *Cronobacter* auch in der Lage, proteolytische Enzyme abzusondern, die bei denselben Mäusen die Zellzerstörung an der Infektionsstelle bewirken (Pagotto *et al.*, 2003).

Song *et al.* (2023) haben eine vergleichende Analyse der intrazellulären und extrazellulären Enterotoxinkonzentrationen von *Cronobacter*-Isolaten mit unterschiedlichem Grad an Antibiotikaresistenz durchgeführt. Die in der Studie verwendeten *Cronobacter*-Isolate zeigten die Fähigkeit zur Enterotoxinproduktion, was mit den Virulenzfaktoren übereinstimmt, die in der überwiegenden Mehrheit der *Cronobacter*-Isolate vorkommen, wie von Holy *et al.* (2019) beschrieben.

Cronobacter spp. besitzen wie die anderen Gram-negativen Bakterien in der äußeren Zellmembran lokalisierte Endotoxine, sogenannte Lipopolysaccharide (LPS) (siehe Kap. 1.1.3 Serotypen). Die Endotoxine werden häufig in Folge des Absterbens der Bakterienzellen freigesetzt und induzieren durch die Interaktion mit LPS-sensitiven Zellen die Produktion endogener Entzündungsmediatoren, wie TNF α . Zum einen führt das freigewordene Lipid A zu starken Entzündungsreaktionen, mitunter sogar zur Sepsis (MacLean *et al.*, 2009). Zum anderen wurde gezeigt, dass die Endotoxine die Translokation von *C. sakazakii* in die Blut-Hirn-Schranke verstärken und wahrscheinlich zelluläre *tight junction* zerstören (Moriez *et al.*, 2005; Townsend *et al.*, 2007). Dies könnte zu einer Erhöhung der Durchlässigkeit der Epithel- und Endothelbarrieren für Bakterien führen (Kim & Loessner, 2008). Darüber hinaus wurde festgestellt, dass Endotoxine die Migration von Enterozyten und die epitheliale Restitution hemmen, was die Adhäsionsfähigkeit der Zellen erhöht und die Durchlässigkeit der Epithel- und Endothelzellen für Bakterien steigert (Cetin *et al.*, 2004).

1.1.10 Hämolyisin

Von unterschiedlichen Hämolyisinen und hämolysebezogenen Genen wurde in *Cronobacter*-Stämmen berichtet, wobei die meisten Stämme zwei Kopien des Hämolyisin-Gens und des Gens für den Hämolyisin-Aktivator-Protein-Vorläufer besaßen (Joseph & Forsythe, 2012). Cruz *et al.* (2011) identifizierten das Hämolyisin-Gen (*hly*) als Hämolyisin III-Homolog (COG1272), und Jang *et al.* (2020) zeigten in einer Studie mit 390 Stämmen, dass alle sieben getesteten Spezies das Hämolyisin III COG1272-Gen-Homolog besaßen. Allerdings konnten die von Cruz *et al.* (2011) beschriebenen PCR-Primer nicht alle COG1272-Orthologe in jeder *Cronobacter*-Spezies gleichmäßig nachweisen. Darüber hinaus wurden drei weitere Hämolyisin-Gene beschrieben, darunter Allele für ein Hämolyisin mit Cystathionin- β -Synthase-(CBS)-Domäne, ein mutmaßliches Hämolyisin und ein 21 kDa Hämolyisin (Jang *et al.*, 2020). Umeda *et al.* (2017) berichteten, dass alle analysierten 57 *Cronobacter*-Stämme beta-hämolytische Aktivität gegen Meerschweinchen-, Pferde- und Kaninchenerythrozyten zeigten und dass 92,9% der Stämme zur α -Hämolyse von Schafserythrozyten fähig waren. Singh *et al.* (2015) charakterisierten die beta-hämolytische Aktivität mehrerer aus Lebensmitteln, Boden und Wasser isolierten *C. sakazakii*-Stämme; diese Stämme waren PCR-positiv für das COG1272-

1 Einleitung

Gen. Insgesamt sind vertiefende Studien erforderlich, um die Funktionalität dieser verschiedenen Hämolysin-Gene dem entsprechenden Phänotyp zuzuordnen.

1.1.11 Antibiotika-Resistenzentwicklung

Die antibiotische Therapie ist derzeit die am häufigsten angewendete Methode zur klinischen Behandlung von *Cronobacter*-Infektionen (Depardieu *et al.*, 2007). Im Allgemeinen werden *Cronobacter*-Infektionen hauptsächlich mit β -Lactam-Antibiotika (z. B. Cephalosporine und Penicilline), Fluorchinolonen, Aminoglykosiden und Tetrazyklinen behandelt (Almajed & Forsythe, 2016; Depardieu *et al.*, 2007). Frühere Studien haben berichtet, dass die meisten *Cronobacter* spp.-Isolate empfindlich gegenüber gängigen antimikrobiellen Wirkstoffen sind. Jedoch kann der langfristige Einsatz oder Missbrauch von antibiotisch wirksamen Stoffen zur Entwicklung von Antibiotikaresistenzen bei *Cronobacter* führen (Yoneyama & Katsumata, 2006; McMahan *et al.*, 2007). Resistenzen gegen Beta-Lactame der ersten Generation und Penicilline wie Amoxicillin-Clavulansäure, Ampicillin, Cefazolin, Cephalothin, Cefotaxim und Streptomycin wurden bei aus Lebensmittel isolierten *Cronobacter*-Stämmen berichtet (Molloy *et al.*, 2009; Ye *et al.*, 2010; Chon *et al.*, 2012; Pan *et al.*, 2014; Fei *et al.*, 2017). Zum Beispiel wurden 77,8 % der *Cronobacter*-Isolate aus koreanischen gestrockneten Lebensmitteln als resistent gegen Cephalosporine befunden (Chon *et al.*, 2012). Carvalho *et al.* (2020) untersuchten getrocknete Säuglingsnahrungen (77 Proben) und getrocknete Säuglingsgetreide (75 Proben) und stellten fest, dass die isolierten *Cronobacter*-Stämme eine hohe Resistenzrate gegen Cefazolin (94,4 %) aufwiesen, aber niedrige Resistenzraten gegen Amoxicillin (9,45 %), Cefpodoxim (5,55 %), Streptomycin (1,35 %) und Trimethoprim/Sulfamethoxazol (1,35 %). Die Resistenz gegen Cephalothin und relevante Resistenzgenotypen (*bla*CSA und *bla*CMA) wurde in mehreren früheren Studien berichtet (Pakbin *et al.*, 2022; Müller *et al.*, 2014). In einer anderen Studie berichteten Parra-Flores *et al.* (2018), dass mehr als 8% der *C. sakazakii*-Isolate aus einem Diarhoe-Ausbruch bei Säuglingen in Mexiko gegen Cephalothin, ein Cephalosporin der ersten Generation, resistent waren. In einer anderen Studie zeigten *C. sakazakii*- und *C. malonaticus*-Isolate aus kommerziell hergestellten dehydrierten Säuglingsnahrungen und aus dem Produktionsumfeld eine Resistenz gegen Amoxicillin-Clavulansäure, Ampicillin und Cefazolin (Fei *et al.*, 2017). Ähnlich stellten Kim *et al.* (2008) fest, dass die aus Lebensmitteln isolierten *Cronobacter*-Stämme gegen Ceftarolin und Ampicillin resistent waren, wobei Lai (2001) herausfand, dass *Cronobacter* spp. eine konstante Resistenz gegen Ampicillin, Cefazolin und erweiterte Penicilline aufwiesen.

Über Fosfomycinresistenzen von *Cronobacter*-Stämmen wurde selten berichtet, wobei in wenigen Studien das Resistenzgen *fos* bei der Mehrheit der Isolate (>97 %) nachgewiesen

wurde. Hochel *et al.* (2012) isolierten 53 *Cronobacter*-Stämme aus Lebensmitteln und stellten fest, dass alle Stämme sich als resistent gegen Erythromycin erwiesen, während zwei *Cronobacter*-Stämme resistent gegen Tetrazyklin waren. Ähnlich berichteten Song *et al.* (2023) sowie Odeyemi & Sani (2019), dass alle isolierten *Cronobacter*-Stämme zu 100 % resistent gegen repräsentative Makrolid-Antibiotika (d.h. Erythromycin und Midecamycin) und Vancomycin (Peptide) und Clindamycin (Lincosamide) waren. Odeyemi & Sani (2019) zeigten, dass die Erythromycin- und Sulfamethoxazol-resistenten *Cronobacter* spp.-Isolate ein Biofilmbildungsvermögen besaßen. Darüber hinaus wurde ein plasmidvermitteltes Colistin-Resistenzgen *mcr-9.1* in *C. sakazakii*-Isolaten gefunden (Parra-Flores *et al.*, 2021).

Dennoch nimmt der Anteil von Multiresistenzen gegenüber mehreren Antibiotika von Jahr zu Jahr zu (Fei *et al.*, 2022; Ling *et al.*, 2018). In einer umfassenden Studie in China wurden mehr als tausend *Cronobacter*-Isolate aus Säuglingsnahrung und -ergänzungsmitteln gegenüber 12 Antibiotika getestet, wobei 1,0% der Isolate mindestens gegen ein Antibiotikum resistent waren. Darüber hinaus wurde von zwei multiresistenten *C. sakazakii*-Isolaten berichtet, die gegen Ampicillin, Tetracyclin, Sulfamethoxazol-Trimethoprim und Chloramphenicol resistent waren (Gan *et al.*, 2022). Eine weitere kürzlich erschienene Studie über pulverförmige Säuglingsnahrung im Iran zeigte, dass 96 % der *C. sakazakii*-Isolate multiresistent waren (gegen mindestens drei verschiedene Antibiotikaklassen), und dass acht Isolate gegen ein Profil aus sechs verschiedenen Antibiotikaklassen (amoxicillin-clavulanic acid, amoxicillin, ampicillin, cefoxitin, cefepime, erythromycin, and ceftriaxone) resistent waren (Pakbin *et al.*, 2022).

1.2 Die Bedeutung von *Cronobacter* spp. als bakterielle Gefahr für die öffentliche Gesundheit

Cronobacter spp. stellen aufgrund ihrer Fähigkeit, schwerwiegende Erkrankungen bei empfindlichen Säuglingen zu verursachen, ein anerkanntes Risiko für die öffentliche Gesundheit dar (FAO/WHO, 2004; Pagotte & Farber, 2009). Besonders besorgniserregend ist die Säuglingsernährung in den ersten Lebensmonaten, wenn das Immunsystem des Säuglings noch nicht ausgereift ist und pulverförmige Säuglingsnahrung als Ersatz für das Stillen verwendet wird (Boué *et al.*, 2017). Eine Kontamination von pulverförmiger Säuglingsnahrung ist für die meisten gemeldeten Fälle von *Cronobacter*-Infektionen bei Säuglingen verantwortlich. Diese Fälle resultieren in der Regel aus Chargen fehlerhafter Säuglingsnahrung, die während der Produktion entweder durch die Verwendung kontaminierter Zutaten oder durch Kreuzkontamination verunreinigt wurden.

Die Anzahl der gemeldeten Fälle von lebensmittelbedingten *Cronobacter*-Infektionen ist wahrscheinlich gering, ähnlich wie bei anderen Infektionskrankheiten. Es wird jedoch eine hohe Dunkelziffer vermutet, da die schwerwiegenden Folgen bei Kleinkindern oft nicht vollständig erfasst werden. Mead *et al.* (1999) schätzten, dass in den USA nur 50 % der tatsächlichen Hospitalisierungsfälle gemeldet werden, was auf eine erhebliche Untererfassung hinweist. Reij *et al.* (2009) schätzten, dass *Cronobacter*-Infektionen 0,5 bis 2,4 % der gesamten lebensmittelbedingten Krankheitslast und 0,5-0,7 % der Meningitislast ausmachen. Aufgrund fehlender zuverlässiger Dosis-Wirkungs-Modelle wurden frühe Risikoabschätzungen für *Cronobacter* spp. in pulverförmiger Säuglingsnahrung nicht in absoluten Zahlen bewertet (Reij *et al.*, 2009). Die FAO/WHO führte Risikobewertungen durch, hauptsächlich durch vergleichende Szenarioanalysen, die jedoch aufgrund des Mangels an Dosis-Wirkungs-Daten und der deterministischen Modellierung eines einheitlichen Zellverbrauchs begrenzt waren (FAO/WHO, 2004; 2006). Die mittlere Infektionsdosis für lebensmittelbedingte *Cronobacter*-Infektionen ist unbekannt und variiert wahrscheinlich je nach Isolat (Parra-Flores *et al.*, 2015). Die letale Dosis für intravenös verabreichte *Cronobacter* bei Mäusen wurde auf 10^8 KbE/Maus geschätzt (Pagotto *et al.*, 2003). Eine ungefähre mittlere infektiöse Dosis von 1000 KbE durch Lebensmittel wurde vorgeschlagen und basiert auf oralen Challenge-Studien an Mäusen und Ratten (Mittal *et al.*, 2009; Richardson *et al.*, 2009). In einer Studie über eine Risikobewertung wurde ein exponentielles Dosis-Wirkungs-Modell verwendet, wobei der einzelne Parameter "r" von 10^{-5} bis 10^{-10} variiert und nicht vom Alter des Kindes abhing (Boué *et al.*, 2017). Die Studie legte nahe, dass die potenzielle Exposition gegenüber *Cronobacter* am Tag vor Ausbruch der Krankheit zwischen 2160 und 3600 KbE lag. Kontaminierte Lebensmittel, insbesondere pulverförmige Säuglingsnahrung, spielen als Hauptübertragungsweg für *Cronobacter* eine sehr große Rolle und können sowohl extrinsisch während der Herstellung als auch intrinsisch durch die verwendeten Zutaten mit *Cronobacter* kontaminiert sein (Reich *et al.*, 2010). PIF ist kein steriles Produkt, und andere mögliche Übertragungswege ergeben sich aus der Kreuzkontamination während der Rehydrierung, die häufig aufgrund unzureichender Reinigungs- oder Handhabungspraktiken erfolgt (FAO/WHO, 2004; 2006). Oberflächen, Utensilien und Fabrikanlagen können bei der PIF-Herstellung als Reservoir für *Cronobacter* dienen (Bar-Oz *et al.*, 2001). *Cronobacter* spp. können während der Rehydratation wachsen und bereits bei niedrigen Konzentrationen infektiöse Dosen erreichen. Eine Rehydratation bei Temperaturen nahe 35 °C fördert ein schnelles Wachstum, wobei eine Zunahme um 1 log₁₀ in 1 bis 5 Stunden beobachtet wird (Parra-Flores *et al.*, 2015). Angesichts der beobachteten Lebensfähigkeit von *Cronobacter* unter trockenen Bedingungen besteht auch ein potenzielles Risiko des Wachstums während der Rehydratation. Für die allgemeinen Verbraucher umfassen die Kontrollmaßnahmen zur Minderung des *Cronobacter*-Risikos die Verwendung steriler Flüssignahrung, wo dies angebracht ist, die Rehydratation bei

Temperaturen über 70 °C und die Minimierung der Zeit zwischen Zubereitung und Verzehr (Pagotto und Farber, 2009; Boué *et al.*, 2017).

Bei der Probenahme von *Cronobacter* variiert die geschätzte Bakterienzahl je nachdem, wie stark die Matrix verklumpt oder geclustert ist. Falsche Annahmen zur Homogenität führen zu ungenauen Konzentrationsschätzungen (Habraken *et al.*, 1986). Dieses Problem ist besonders relevant, wenn keine Dosis-Wirkungs-Daten vorliegen, da die Gesamtprävalenz und der Verbrauch die wichtigsten Faktoren für die Risikoanalyse sind (Reij *et al.*, 2009). Das Muster der Kontamination hängt von ihrer Quelle und Häufigkeit ab. FAO-Risikobewertungen gingen von einer homogenen Poisson-Verteilung der *Cronobacter*-Kontamination in pulverförmigen Säuglingsnahrungsmitteln aus (FAO/WHO, 2006; von Westerholt & Butler, 2020). Diese Annahme hat sich als unzureichend erwiesen, wie von anderen Autoren nachgewiesen wurde (Jongenburger *et al.*, 2011, 2012). Es ist wahrscheinlicher, dass *Cronobacter* in Clustern auftreten, wobei der Inhalt jedes Clusters durch eine Lognormal- oder Gamma-Verteilung dargestellt werden kann und die Cluster selbst Poisson-verteilt sind. Sie erfordern daher zusammengesetzte Verteilungen wie die Poisson-Lognormal- oder Poisson-Gamma-Verteilung, um genau modelliert zu werden (Gonzales-Barron *et al.*, 2013; von Westerholt *et al.*, 2016). Diese Häufung von *Cronobacter* in pulverförmigen Säuglingsnahrungsmitteln kann eine erhebliche Auswirkung auf die Modellierung der Expositionsabschätzung haben. Wenn die Annahmen zur Expositionsabschätzung ungenau sind, können sie zu einer Fehlinterpretation der Probenahmeergebnisse (positiv oder negativ) und damit zu einer Über- oder Unterschätzung des Risikos führen (Jongenburger *et al.*, 2012; Nauta, 2021). Die Expositionsergebnisse können höher oder niedriger sein, und die Wahrscheinlichkeit, dass Bakterienzellen unter ausgetrockneten Bedingungen überleben, kann größer sein. Für *Cronobacter* werden in der Literatur Prävalenzraten zwischen 3 und 30 % angegeben, die je nach Region variieren (Fei *et al.*, 2017; Chap *et al.*, 2009; Parra-Flores *et al.*, 2018; Santos *et al.*, 2013). In den Vereinigten Staaten wurde früher eine Infektionsrate von 1 von 100.000 Neugeborenen geschätzt, was 0,53 Infektionen pro Jahr entspricht (Hunter & Bean, 2013).

Reij *et al.* (2009) schätzten die globale Exposition gegenüber *Cronobacter* durch Multiplikation des geschätzten globalen Säuglingsanfangsnahrung-Verbrauchs (Cordier, 2007) mit der geschätzten *Cronobacter*-Prävalenz (FAO/WHO, 2006). Das Ergebnis waren insgesamt 7,84 log₁₀ KBE/Jahr, ohne Berücksichtigung des Wachstums nach der Rehydratation. Die Genauigkeit dieser Schätzung hängt davon ab, dass genaue Schätzungen für die Konzentration und die räumliche Verteilung vorliegen. Kompliziertere und spezifischere Schätzungen für den Verzehr sind in anderen veröffentlichten Risikobewertungen (Boué *et al.*, 2017) zu finden, in denen eine globale Expositionsrate von 0,33 MPN KBE/g geschätzt wurde.

1.2.1 Definition der gefährdeten Bevölkerungsgruppe

Cronobacter spp. konnten aufgrund ihrer klinischen Relevanz in zwei Gruppen eingeordnet werden: Gruppe 1 umfasst die beiden Arten *C. sakazakii* und *C. malonaticus*, die die Mehrheit der klinischen Isolate in allen Altersgruppen bilden. Gruppe 2 umfasst die selten berichteten Arten *C. turicensis* und *C. universalis*. Die drei Arten *C. dublinensis*, *C. muytjensii* und *C. condimenti* sind in erster Linie Umwelt-Kommensale und wahrscheinlich nur von geringer oder sogar keiner klinischen Bedeutung (Forsythe, 2018). Während eine *Cronobacter*-Infektion in allen Bevölkerungsgruppen auftreten kann, ist sie am wahrscheinlichsten bei Personen mit einem niedrigeren Immunstatus, insbesondere bei Neugeborenen und bestimmten älteren Bevölkerungsgruppen, die den Konsum von rehydrierter Milch kombinieren (Boué *et al.*, 2017). Es wurde festgestellt, dass Säuglinge unter 12 Monaten nach dem Verzehr von kontaminierter Säuglingsnahrung ein erhöhtes Risiko für *Cronobacter*-Infektionen haben. Insbesondere Neugeborene unter einem Monat und Säuglinge mit niedrigem Geburtsgewicht unter zwei Monaten sind gefährdet (Yan *et al.*, 2012; FAO/WHO, 2004; Reij *et al.*, 2009), wobei die Sterblichkeitsrate nach einer Infektion in diesen Gruppen zwischen 20 und 80 % liegt (Friedemann, 2009). Die meisten *Cronobacter*-Ausbrüche traten bis 2002 in diesen Altersgruppen auf, was die Empfehlung für sterile Flüssignahrung für hospitalisierte Säuglinge unter zwei Monaten begründete (Jason, 2012).

1.2.2 Infektionen bei Säuglingen oder Neugeborenen

Cronobacter spp. gelten als opportunistisch pathogen und stehen im Zusammenhang mit lebensbedrohlichen Infektionen, vor allem bei Neugeborenen. Betroffen sind hauptsächlich „Frühchen“ mit einem Geburtsgewicht unter 2500 g und Säuglinge innerhalb der ersten vier Lebenswochen (Lai, 2001; Bar-Oz *et al.*, 2001; Mullane *et al.*, 2008). Zu den Höchstisikogruppen zählen neben Frühgeborenen (Geborene vor Vollendung der 37. Schwangerschaftswoche) und Neugeborenen (Säuglinge bis zu einem Lebensalter von vier Wochen) auch Säuglinge, die jünger als zwei Monate alt sind, Säuglinge mit einem zu geringen Geburtsgewicht, immunsupprimierte und geschwächte Säuglinge, Säuglinge mit medizinischen Komplikationen, hospitalisierte Säuglinge und Säuglinge HIV-positiver Mütter (Strysko *et al.*, 2020). Infektionen bei älteren Säuglingen wurden ebenfalls beobachtet (Bowen & Braden, 2006).

Cronobacter spp. wurden bereits im Jahr 1929 aus einer Blutkultur bei einer Septikämie einer Frau, die an einer fiebrigen Infektion nach einer Kürettage litt, als „pigmentierter Coliformer“ beschrieben (Pangalos, 1929). Im Jahr 1958 wurde erstmals ein „gelb-pigmentierter Coliformer“ in Zusammenhang gebracht mit einer tödlich endenden, generalisierten Sepsis

1 Einleitung

und Meningitis bei zwei Neugeborenen im St. Albans City Hospital, Vereinigte Königreich (Urmenyi & Franklin, 1961; Jøker *et al.*, 1965). In einem weiteren Bericht wurde ein Fall von Meningitis beschrieben, der durch gelb pigmentierte *Enterobacter cloacae* bei einem Kind aus Dänemark verursacht wurde und zu schweren geistigen sowie neurologischen Spätfolgen führte.

Von 1958 bis 2018 wurden insgesamt von 183 Fällen invasiver *Cronobacter* spp.-Infektionen bei Säuglingen und Kindern im Alter bis zu 3 Jahren aus allen Teilen der Welt berichtet (Strysko *et al.*, 2020). Auch in Deutschland wurde im Jahr 2021 ein *Cronobacter*-Ausbruch bei Frühgeborenen mit einem Todesfall in einem Krankenhaus gemeldet (BVL –RKI Gemeinsamer Nationaler Bericht, 2021). Eine Auswahl dokumentierter Fälle von *Chronobacter*-Ausbrüchen sind in Tabelle 4 aufgelistet. Die meisten betroffenen Säuglinge waren hierbei Neugeborene (67 %; 100/150), wovon 38 % (42/112) starben. Ganze 79 % (81/102) hatten zuvor Säuglingsanfangsnahrung eingenommen. Insgesamt hatten 116 (63 %) der Säuglinge eine Meningitis und 67 (37 %) eine Bakteriämie. Im Vergleich zu Patienten mit *Cronobacter*-Bakteriämie war die Wahrscheinlichkeit, dass die *Cronobacter*-Meningitis außerhalb des Krankenhauses auftrat, signifikant höher (58 % [41/71] vs. 33 % [16/48]). Mehr als zwei Drittel (130/183) der Fälle wurden jedoch in den letzten 20 Jahren gemeldet, als der Anteil der mit Ausbrüchen assoziierten Fälle deutlich geringer war.

Die geschätzte Inzidenz liegt bei etwa einer Infektion mit *Cronobacter* spp. pro 100.000 Säuglingen pro Jahr und in 95 % der Fälle sind Säuglinge in den ersten beiden Lebensmonaten betroffen (Strysko *et al.*, 2020). Bei Säuglingen mit sehr geringem Geburtsgewicht (<1.500 g) steigt diese Rate auf 9,4 pro 100.000 (FAO und WHO, 2006). Die jährlichen Meldungen stiegen von einem Mittelwert von 1,2 Fällen/Jahr vor 2004 auf 8,7 Fälle/Jahr ab 2004 (Strysko *et al.*, 2020). Im Jahr 2008 meldete die Weltgesundheitsorganisation (WHO) eine jährliche Inzidenz von mindestens 0,14 pro 100.000 Säuglingen auf den Philippinen und 1,76 pro 100.000 Säuglingen in England und Wales, obwohl es sich hierbei vermutlich um Unterschätzungen handelt (FDA/WHO, 2008). Schätzungen aus der laborgestützten Überwachung in den Vereinigten Staaten deuten darauf hin, dass jährlich etwa 18 Fälle von invasiven *Cronobacter*-Infektionen bei Säuglingen (0,49 Fälle pro 100.000 Säuglinge) auftreten (Patrick *et al.*, 2014). In Frankreich wurden in einer Risikobewertung zwischen 0 und 3 Fälle pro 100.000 Säuglingen in den ersten 6 Lebensmonaten geschätzt (Boué *et al.*, 2017). Da Infektionen mit *Cronobacter* spp. in Deutschland nicht meldepflichtig sind, muss mit einer Dunkelziffer gerechnet werden.

Zu den typischen klinischen Symptomen von *Cronobacter* spp.-Infektionen bei Neugeborenen zählen nekrotisierende Enterokolitis, Bakteriämie und Meningitis (Block *et al.*, 2002, Himelright *et al.*, 2002, van Acker *et al.*, 2001; Bowen *et al.*, 2017). Eine Verbindung von *Cronobacter* im

Zusammenhang mit mehreren Fällen von nekrotisierender Enterokolitis bei Säuglingen verstärkte die Assoziation mit hospitalisierten Frühgeborenen (van Acker *et al.*, 2001). Es ist jedoch bekannt, dass auch zuvor gesunde, voll entwickelte Säuglinge infiziert werden können; bei Säuglingen, die in einem fortgeschrittenen Gestationsalter geboren wurden, könnte das Risiko einer *Cronobacter*-Meningitis größer sein als bei Frühgeborenen, im Gegensatz zu einer Blutstrominfektion (Bowen & Braden, 2006). Es wird allgemein angenommen, dass *Cronobacter* spp. über den Magen-Darm-Trakt in den menschlichen Körper gelangen und dort eine nekrotisierende Enterokolitis verursachen können (Liu *et al.*, 2012). Grishin *et al.* (2013) weisen darauf hin, dass die Entwicklung von nekrotisierender Enterokolitis einen anfälligen Wirt voraussetzt, typischerweise ein Frühgeborenes mit physiologischen Beeinträchtigungen (d. h. Hypoxie, Hypothermie, Darmischämie), die Verabreichung von enteraler Nahrung (der die nützlichen schützenden Komponenten fehlen, die normalerweise in der Muttermilch enthalten sind) und eine unkontrollierte bakterielle Besiedlung. Diese Bedingungen führen zu einer verstärkten Entzündung der Schleimhaut, die in der Folge zu einer hohen Produktion von Entzündungsfaktoren wie Zytokinen, Stickstoffmonoxid und Prostanoiden führt, die das apikale Magen-Darm-Trakt-Epithel weiter schädigen, wobei die Virulenz von *Cronobacter* spp. dosisabhängig ist, aber nicht auf eine Eigenschaft einer bestimmten Bakterienspezies als Ganzes zurückzuführen ist, sondern eher auf ein oder mehrere Merkmale bestimmter Bakterienstämme, die bei einem voll entwickelten Kind harmlos, bei einem Frühgeborenen jedoch pathogen sein können (Hamby *et al.*, 2011; Cetinkaya *et al.*, 2013). In-vitro-Infektionsmodelle deuten außerdem darauf hin, dass der Organismus auch durch Transzytose des Magen-Darm-Trakt-Epithels in den systemischen Kreislauf gelangen kann (Giri *et al.*, 2012). Sobald der Organismus in den systemischen Kreislauf gelangt ist, hat er einen Tropismus für das Zentralnervensystem bei Neugeborenen und Säuglingen mit niedrigem Geburtsgewicht und kann eine Meningitis verursachen, während er bei Säuglingen mit etwas höherem Geburtsgewicht (Yan *et al.*, 2012) oder Erwachsenen eine Bakteriämie oder Sepsis auslöst. Sobald der Erreger die Blut-Hirn-Schranke überwindet und in das Gehirn gelangt, kann er eine Ventrikulitis verursachen und Zysten oder Hirnabszesse bilden, die sich später zu einem Hydrozephalus entwickeln können - einem Zustand, bei dem es zu einer übermäßigen Ansammlung von Liquor im Gehirn kommt (Bowen & Braden, 2006; Chenu & Cox, 2009). Eine *Cronobacter*-Meningitis wurde häufiger bei Normal- und Spätgeborenen festgestellt, während eine *Cronobacter*-Bakteriämie häufiger bei Frühgeborenen auftrat (Bowen & Braden, 2006). Der Grund für diesen Unterschied ist noch unklar; eine rechtzeitige Einleitung einer empirischen antimikrobiellen Behandlung bei stationären Patienten könnte jedoch das Eindringen von Bakterien über die Blut-Hirn-Schranke hinaus verhindern (oben ref). *Cronobacter* spp. bedingte Meningitiden sind oft von einer Sepsis begleitet (Muytjens *et al.*, 1983; Bowen *et al.*, 2017; Haston *et al.*, 2023) und mit anderen Komplikationen, wie der

1 Einleitung

Ausbildung von Zysten, Abszessen, Nekrosen, Ventrikulitiden, Ventrikeldilatationen und Hydrocephalus verbunden (Jøker *et al.*, 1965; Muytjens *et al.*, 1983; Gallagher & Ball, 1991; Bar-Oz *et al.*, 2001; Lai, 2001; Stryko *et al.*, 2020). Zhi-ping *et al.* (2024) untersuchten den Zusammenhang zwischen *C. sakazakii* und Herzrhythmusstörungen im Kontext einer Sepsis. Sie stellten fest, dass bei Mäusen mit Sepsis der *C. sakazakii*-Gehalt im Darm anstieg. Die Überstände und äußeren Membranvesikel der Bakterien führten zu Herzrhythmusstörungen sowie einer erhöhten Sterblichkeit, was durch die Dysregulation von Ionenkanalproteinen verursacht wurde.

Erkrankungen des zentralen Nervensystems gehen oft mit neurologischen Spätschäden einher, sodass Überlebende oft geistige und körperliche Entwicklungsstörungen aufweisen (FAO/WHO, 2006). Die nekrotisierende Enterokolitis ist vor allem durch Darmnekrosen und Emphysembildung charakterisiert (Van Acker *et al.*, 2001) und stellt eine häufige multifaktorielle, gastrointestinale Erkrankung bei Neugeborenen dar, die nicht nur durch *Cronobacter* spp. sondern durch eine Vielzahl von pathogenen Bakterien verursacht werden kann (Jaradat *et al.*, 2014).

Die Mortalitätsrate von *Cronobacter* spp. bedingten Erkrankungen bei Neugeborenen liegt, je nach klinischer Manifestation, zwischen < 10% und 80%, ist allerdings hinsichtlich der *Cronobacter* spp. bedingten Meningitis mit einer Häufigkeit zwischen 40% und 80% erhöht, (Nazarowec-White & Farber, 1997). Zudem leiden 94 % der Kinder, die eine *Cronobacter*-assoziierte Meningitis überlebten, unter irreversiblen neurologischen Spätschäden, wie Hydrocephalus, Quadriplegie, Entwicklungsstörungen oder Beeinträchtigungen des Hör- oder Sehvermögens (Drudy *et al.*, 2006; Bowen *et al.*, 2017). Im Vergleich liegt die Mortalitätsrate der durch *Cronobacter* spp. bedingten Bakteriämie bei 8% (FAO/WHO, 2006), die der nekrotisierenden Enterokolitis zwischen 10% und 55% (Iversen & Forsythe, 2003). Aufgrund der sehr geringen Fallzahlen und dem Fehlen aktiver Kontrollsysteme für durch *Cronobacter* spp. ausgelöste Erkrankungen, ist eine genaue Einschätzung der Situation vor allem in Entwicklungsländern schwierig (FAO/WHO, 2008). Zusätzlich muss berücksichtigt werden, dass besonders im Hinblick auf neonatale Diarrhoen, vor allem in Entwicklungsländern, oft von einer hohen Dunkelziffer auszugehen ist (Estuningsih & Sani, 2008). Der Anstieg der weltweiten Meldungen in den letzten Jahren könnte auf eine präzisere mikrobiologische Identifizierung, ein gesteigertes Interesse an öffentlich gemachten Ausbrüchen und dem Aufruf der WHO zur Meldung der Fälle sowie auf ein größeres Bewusstsein der Auswirkungen auf die öffentliche Gesundheit zurückzuführen sein. Darüber hinaus gab es vor 2007 keinen Namen für *Cronobacter* spp.; frühe Isolate wurden retrospektiv als *Cronobacter* spp. identifiziert. Es ist möglich, dass die sich entwickelnde Nomenklatur und die Identifizierungsmethoden dazu geführt haben, dass sowohl Fälle übersehen als auch Infektionen aufgenommen wurden, die fälschlicherweise als *Cronobacter* eingestuft wurden.

Trotz der Bedeutung von *Cronobacter*-Infektionen bei Säuglingen sollte beachtet werden, dass solche neonatalen Infektionen selten sind und nicht alle mit der Einnahme von rekonstituierter Säuglingsanfangsnahrung in Verbindung gebracht wurden. Auch Muttermilch war in einer Reihe von Fällen eine verdächtige Quelle (Barreira *et al.*, 2003; Stoll *et al.*, 2004; Bowen *et al.*, 2017). Eine frühe Hypothese besagt, dass der Geburtskanal die Quelle der *Cronobacter*-Infektion sei. Dies scheint jedoch inzwischen unwahrscheinlich zu sein, da keines der vaginal entbundenen Kinder bis mehrere Tage nach der Geburt Anzeichen einer Infektion entwickelte und es zudem nicht erwiesen ist, dass *Cronobacter* einen Teil der vaginalen Mikroflora ausmachen (Yan *et al.*, 2012; Hunter & Bean, 2013).

Darüber hinaus beobachteten Biering *et al.* (1989), dass Säuglinge, die an einer *Cronobacter*-Meningitis erkrankt waren, alle zuvor rekonstituierte Säuglingsanfangsnahrung erhalten hatten, bevor sie erkrankten. Außerdem wurde nach einer Überprüfung der Fütterungsverfahren ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Verzehr bestimmter pulverförmigen Säuglingsanfangsnahrung-Marken, der Entwicklung einer NEC bei Neugeborenen und der Isolierung von *Cronobacter* festgestellt (van Acker *et al.*, 2001). Mehrere *Cronobacter*-Ausbrüche sind auf neonatalen Intensivstationen aufgetreten, die epidemiologisch mit kontaminierten PIF in Verbindung gebracht wurden (Himelright *et al.*, 2002; Teramoto *et al.*, 2010). In einer (über 10 Jahre zurückliegend) durchgeführten Untersuchung wurde festgestellt, dass die Mehrheit der Säuglingsnahrungspackungen keinerlei Mikroorganismen enthielt (Jaradat *et al.*, 2009). Es wurde jedoch auch über extrinsische Kontaminationen von geöffneten Säuglingsnahrungspackungen oder Utensilien zur Zubereitung von Säuglingsnahrung berichtet (Noriega *et al.*, 1990; Friedemann, 2009; Jaradat *et al.*, 2009). Es wurde über *Cronobacter*-Infektionen bei gestillten Säuglingen berichtet, die nicht mit rekonstituierter Säuglingsanfangsnahrung gefüttert wurden. Diese Fälle werden jedoch wahrscheinlich zu wenig bekannt (Ravisankar *et al.*, 2014; Stoll *et al.*, 2004). In einer Untersuchung eines neonatalen Falles wurde der Organismus aus der gefrorenen abgepumpten Muttermilch und der von der Mutter verwendeten Milchpumpe isoliert (Bowen *et al.*, 2017; Haston *et al.*, 2023). Die Übertragung des Organismus durch Erwachsene (Holy *et al.*, 2014) und die hohe Inzidenz von Harnwegsinfektionen (Patrick *et al.*, 2014) deuten ebenfalls darauf hin, dass es andere Expositionswege als die Säuglingsnahrungsmittel gibt.

Cronobacter spp. wurden ferner im Krankenhausbereich aus Luft und Staub sowie aus menschlichen Därmen und Rachen isoliert. Daher eliminiert die verbesserte mikrobiologische Sicherheit von Säuglingsnahrung nicht zwingend das Risiko der Exposition von Neugeborenen. Dementsprechend kann das Infektionsrisiko von verschiedenen Faktoren abhängen, darunter von der Anzahl der Bakterienzellen, die das Produkt kontaminieren, der Quelle von *Cronobacter*, der Handhabung nach der Nahrungszubereitung und dem Gesundheitszustand der Säuglinge (z. B. niedriges Geburtsgewicht, Frühgeburtlichkeit oder

1 Einleitung

Immunsuppression) (Himmelright *et al.*, 2002). Angesichts der Lebensfähigkeit von *Cronobacter* unter trockenen Bedingungen besteht auch ein potenzielles Risiko des Wachstums während der Rehydratation bzw. Rekonstitution der Säuglingsnahrung. *Cronobacter* spp. können während der Rehydratation wachsen und bereits bei niedrigen Konzentrationen infektiöse Dosen erreichen. Eine Rehydratation bei Temperaturen nahe 35 °C fördert ein schnelles Wachstum, wobei eine Zunahme um 1 log₁₀ in 1 bis 5 Stunden beobachtet wird (Parra-Flores *et al.*, 2015). Für die allgemeinen Verbraucher umfassen die Kontrollmaßnahmen zur Minderung des *Cronobacter*-Risikos die Verwendung steriler Flüssignahrung, wo dies angebracht ist, die Rehydratation bei Temperaturen über 70 °C und die Minimierung der Zeit zwischen Zubereitung und Verzehr (Pagotto & Farber, 2009; Boué *et al.*, 2017).

1 Einleitung

Tabelle 4: Chronologische Auflistung von *Cronobacter* spp.-Erkrankungen bei Neugeborenen weltweit und deren Auswirkungen (Auswahl)

Jahr	Standort/Land	Fälle	Todesfälle	Krankheit/ Symptome	Ursache	Referenz
1958	St. Albans, Vereinigte Königreich	2	2	Meningitis, Sepsis	unbekannt	Urmenyi & White-Frankin (1961)
1965	Odense, Dänemark	1	1	Meningitis	unbekannt	Jøker <i>et al.</i> (1965)
1979	Macon, Georgia, USA	1	0	Bakteriämie	unbekannt	Monroe & Tift (1979)
1977-1981	Niederlande	8	6	Meningitis, Sepsis, nekrotisierende Enterokolitis	Säuglingsnahrung	Muytjens <i>et al.</i> (1983)
1980	Indianapolis, Indiana, USA	1	0	Meningitis	unbekannt	Kleiman <i>et al.</i> (1981)
1981	Oklahoma City, Oklahoma, USA	1	0	Meningitis, Sepsis	unbekannt	Adamson & Rogers (1981)
1984	Athena, Griechenland	11	4	Meningitis, sepsis	unbekannt	Arseni <i>et al.</i> (1987)
1986-1987	Reykjavik, Island	3	1	Meningitis	Säuglingsnahrung	Biering <i>et al.</i> (1989)
1988	Memphis, Tennessee, USA	4	0	Sepsis, nekrotisierende Enterokolitis	Säuglingsnahrung	Simmons <i>et al.</i> (1989)
1993-1998	Jerusalem, Israel	4	0	Meningitis, Bakteriämie	unbekannt	Block <i>et al.</i> (2002)
1994	Frankreich	13	4	Meningitis, Sepsis, nekrotisierende Enterokolitis	Säuglingsnahrung	Caubilla-Barron <i>et al.</i> (2007)
1998	Belgien	12	2	nekrotisierende Enterokolitis	Säuglingsnahrung	Muytjens <i>et al.</i> (1983) ; Van Acker <i>et al.</i> (2001)
1999-2000	Jerusalem, Israel	2	0	Meningitis	Säuglingsnahrung	Bar-Oz <i>et al.</i> (2001)
2001	Knoxville, Tennessee, USA	1	1	Meningitis	Säuglingsnahrung	Himelright <i>et al.</i> (2002)
2002, 2006	Chandigarh, Indien	2	1	Meningitis, Sepsis	unbekannt	Ray <i>et al.</i> (2007)
2004	Neuseeland	5	1	Meningitis	Säuglingsnahrung	Jarvis (2005)
2007	Bilbao, Spain	1	0	Sepsis	Säuglingsnahrung	Aguirre Conde <i>et al.</i> (2007)
2007	Kanada	2	0	Meningitis	Säuglingsnahrung	Pagotto & Farber (2009)
2010	Queretaro, Mexico	2	0	Gastroenteritis	Säuglingsnahrung	Flores <i>et al.</i> (2011)
2010	Japan	1	1	Meningitis, Sepsis	Säuglingsnahrung	Teramoto <i>et al.</i> (2010)
2017	China	2	1	Gastroenteritis	Säuglingsnahrung	Cui <i>et al.</i> (2017)

1 Einleitung

Fortsetzung der Tabelle 4

Jahr	Standort/Land	Anzahl Fälle	Anzahl Todesfälle	Krankheit/Symptome	Ursache	Referenz
2017	Brasilien	1	1	Bakteriämie	Säuglingsnahrung	Volpe Chaves <i>et al.</i> (2018)
2017	Argentinien	3	2	Meningitis, sepsis, nekrotisierende Enterokolitis	unbekannt	Asato <i>et al.</i> (2013)
2021	Deutschland	4	1	Meningitis, Bakteriämie	Säuglingsnahrung	BVL –RKI Gemeinsamer Nationaler Bericht (2021)
2021, 2022	USA	2	1	Meningitis, Bakteriämie	Säuglingsnahrung, Brustpumpe	Haston <i>et al.</i> (2023)

1.2.3 Infektionen bei Erwachsenen

Cronobacter-Infektionen sind nicht nur für Neugeborene charakteristisch. Obwohl ursprünglich für ihr Auslösen neonataler Infektionen bekannt, treten sie in allen Altersgruppen auf, wenn auch gehäuft bei sehr jungen und älteren immungeschwächten Menschen (FAO-WHO, 2008; Healy *et al.*, 2010; Holy & Forsythe, 2014; Patrick *et al.*, 2014). Im Vergleich zu Fällen bei Säuglingen werden *Cronobacter* häufiger bei Erwachsenen nachgewiesen, wobei die meisten Fallberichte Infektionen bei älteren Patienten beschreiben, die zuvor krank oder immungeschwächt waren. Bei bis zu 50 % der Erwachsenen mit einer *Cronobacter*-Infektion lag eine andere Erkrankung zugrunde (Lai, 2001; See *et al.*, 2007). *Cronobacter* spp. bedingte Erkrankungen konnten auch bei Erwachsenen (in den meisten Fällen älteren Menschen > 60 Jahre), immungeschwächten Menschen oder Menschen mit schweren Grunderkrankungen nachgewiesen werden (Lai, 2001). Neben der Bakteriämie und Septikämie (Jimenez & Gimenez, 1982; Hawkins *et al.*, 1991; Emery & Weymouth, 1997; Lai, 2001; See *et al.*, 2007) wird von Pneumonie (Lai, 2001), Vaginitis (Ongrádi, 2002), Osteomyelitis (Pribyl *et al.*, 1985; Corti *et al.*, 2007) und multiplen Abszessen in der Milz (See *et al.*, 2007) berichtet. In einer Studie von Gosney *et al.* (2006) wurden *Cronobacter* spp. in der Mundschleimhaut von Patienten nach Schlaganfällen nachgewiesen. *Cronobacter* spp. bedingte Meningitiden sind bei Erwachsenen bisher allerdings nicht beschrieben. Auftretende Todesfälle sind bei den über 68-Jährigen zu verzeichnen.

Zu den erwachsenen Patienten mit erhöhtem Risiko gehören diejenigen, die zuvor mit Antibiotika behandelt wurden, immungeschwächte sowie ältere Patienten sowie Patienten mit Implantaten, akuten oder chronischen und schweren Erkrankungen (Lai, 2001; Patrick *et al.*, 2014; Pitout *et al.*, 1997). Sporadisch auftretende Krankheitsfälle bei Erwachsenen betreffen

1 Einleitung

vor allem ältere und immunsupprimierte Menschen (See *et al.*, 2007). See *et al.* (2007) beschrieben einen Fall von *Cronobacter*-Bakteriämie mit multiplen Milzabszessen bei einer 75-jährigen Frau in einem Alterswohnheim. Dies war sowohl der erste gemeldete Fall von *Cronobacter* bedingten Milzabszessen, als auch der erste Fall bei einem nicht immungeschwächten Erwachsenen.

Es sind jedoch auch andere Kontaminationsquellen in der Umwelt möglich, wie das häusliche Umfeld (Kandhai *et al.*, 2004; Kilonzo-Nthenge *et al.*, 2008; Bowen *et al.*, 2017), Lebensmittel aus dem Einzelhandel (z. B. getrocknetes Milchpulver, Trockenfleisch, Hülsenfrüchte, Nüsse, getrocknete Mehle und Gewürze) (Friedemann, 2007; Hochel *et al.*, 2012) oder Trinkwasser (Lui *et al.*, 2013).

Die Quellen für Infektionen bei Erwachsenen sind bislang unbekannt, könnten aber auf eine erhöhte Anfälligkeit für Kommensale *Cronobacter* zurückzuführen sein. Beispielsweise konnte der *C. malonaticus*-Typ-Stamm LMG23826^T aus einem Brustabszess isoliert werden. Allgemein scheinen Stämme von *C. malonaticus* clonal complex (CC) 7 eher mit Erwachsenen, als mit neonatalen Infektionen assoziiert zu sein, wobei der Grund für die erhöhte Inzidenz noch unbekannt ist (Forsythe *et al.*, 2014, Joseph & Forsythe 2011).

2022 wurde *C. turicensis* bei akuten Todesfällen, die auf mukoide und nekrotisierende Typhlokolitis, verursacht durch genetisch unterschiedliche *C. turicensis*-Stämme zurückzuführen sind, von fünf europäischen Feldhasen (*Lepus europaeus*) im Nordosten Österreichs isoliert (Posautz *et al.*, 2022).

1.3 Vorkommen

1.3.1 Vorkommen in Säuglingsnahrungsmitteln

Die epidemiologisch wichtigste Quelle für klinische *Cronobacter*-Infektionen ist kontaminierte Säuglingsnahrung auf Milchpulverbasis (powdered infant formula, PIF) (Biering *et al.*, 1989; Bowen & Braden, 2006; CDC, 2002). Das Vorkommen von *Cronobacter* spp. in Milchtrockenprodukten lässt sich über viele Jahrzehnte zurückverfolgen und überschneidet sich mit dem ersten Fall von Meningitis (Urmenyi & Franklin, 1961). Damals gab es jedoch keine Hinweise auf einen Zusammenhang mit Säuglingsnahrungsmitteln. In den späten 1970er Jahren wurde ein *Enterobacteriaceae*-Stamm (NCTC 8155), der im Jahr 1950 aus einer "Dose Trockenmilch" isoliert und in der nationalen Stammsammlung „National Collection of Type Cultures“ (NCTC) in England archiviert wurde, erneut charakterisiert und als *Enterobacter sakazakii* Biogruppe 1 identifiziert (Farmer *et al.*, 1980). Dies war das erste dokumentierte Isolat von *Cronobacter* aus einem Milcherzeugnis vom Typ "Trockenmilch".

1 Einleitung

Mikrobiologische Untersuchungen zum Vorkommen von *Cronobacter* spp. in Säuglingsfertignahrungsmitteln zeigten weltweit zwischen 2 % und 14 % positiver Proben (Iversen & Forsythe, 2004; Muytjens *et al.*, 1988). Die erste große Untersuchung von Säuglingsanfangsnahrungsproben auf das Vorkommen von *Cronobacter* spp. und anderen *Enterobacteriaceae* wurde von Muytjens *et al.* (1988) durchgeführt, die 141 Proben aus 35 Ländern untersuchten. Sie berichteten, dass 52,2 % der Proben mit *Enterobacteriaceae* kontaminiert waren, 14 % (13 Länder) enthielten *Cronobacter* spp. (*E. sakazakii*). Der Kontaminationsgrad reichte von 0,36 bis 66,0 cfu/100 g. Dieser vergleichsweise niedrige Kontaminationsgrad (<1 cfu/g) wurde in zahlreichen weiteren Studien bestätigt. Simmons *et al.* (1989) meldeten 8 *Cronobacter* cfu/100 g in einer offenen Dose mit Milchpulver, die während eines Ausbruchs auf einer neonatalen Intensivstation als Kontaminationsquelle ausgemacht werden konnte.

Nazarowec-White & Farber (1997) analysierten 120 Säuglingsanfangsnahrungsverpackungen von fünf verschiedenen Herstellern in Kanada und stellten fest, dass 6,7 % der Proben *Cronobacter* spp. mit einem Gehalt von 0,36 cfu/100 g enthielten. Die Vorkommenshäufigkeit lag zwischen 0 und 12 % der Proben pro Hersteller. Heuvelink *et al.* (2001) wiesen *Cronobacter* spp. qualitativ in 25 g Probenmenge in 1 von 40 Säuglingsanfangsnahrungsproben und in 7 von 170 Milchpulverproben nach. Santos (2006) untersuchte 98 Säuglingsanfangsnahrungsproben und meldete *Cronobacter*-Werte von 0,22-1,61 cfu/100 g Produkt. Iversen & Forsythe (2004) berichteten schließlich über eine detaillierte Analyse von fast 500 Lebensmittelproben, darunter 82 Proben Säuglingsanfangsnahrungs- und 49 Folgenahrungsproben. *Cronobacter* spp. wurden aus 2 von 82 Säuglingsanfangsnahrungsproben, 5 von 49 Folgenahrungsproben, 3 von 72 Milchpulvern, 40 von 122 Kräutern und Gewürzen und 15 von 66 anderen Trockenzutaten isoliert. In Anlehnung an die gemeinsame Studie der Ernährungs- und Landwirtschaftsorganisation der Vereinten Nationen (FAO) und der Weltgesundheitsorganisation (FAO/WHO, 2008) wurden durch ein internationales Konsortium von Laboratorien aus Brasilien, England, Indonesien, Jordanien, Korea, Portugal und Malaysia insgesamt 287 Proben von Folgenahrungs- und Entwöhnungsnahrungsproben für Kinder analysiert (Chap *et al.*, 2009). Sie berichteten über die Isolierung von *Cronobacter* spp. aus 1 von 84 Folgenahrungsproben und 30 von 203 Entwöhnungsnahrungsproben. Pei *et al.* (2016) analysierten insgesamt 2.282 Säuglingsanfangsnahrungs- und Folgenahrungsproben aus Einzelhandelsmärkten in China und dabei wurden *Cronobacter* spp. in 1,1 % (25/2.282) der gesammelten Proben isoliert. Pan *et al.* (2014) untersuchten ebenfalls 399 Säuglingsanfangsnahrungs- und Folgenahrungsproben aus Einzelhandelsgeschäften und Supermärkten in Shijiazhuang, China und fanden 11,5 % (19/165) der Säuglingsnahrungs- bzw. 12,8 % (30/234) der Folgenahrungsproben positiv für *Cronobacter*, darunter 48 *C. sakazakii* und 1 *C. malonaticus*.

In einer sehr umfangreichen Studie aus China berichteten Gan *et al.* (2022), dass 8,7 % (1.055/12.105) der aus 29 Provinzen in China gesammelten Säuglingsanfangsnahrungs- und Reis-basierten Folgenahrungsproben positiv auf *Cronobacter* getestet wurden. In einer weiteren Studie in der Republik Korea berichteten Jung & Park (2006) eine *Cronobacter*-Kontamination in 20 % der Säuglingsanfangsnahrungsmittelproben. Shaker *et al.* (2007) isolierten *Cronobacter* spp. aus 17 % der Säuglingsanfangsnahrungsproben in Jordanien. Fu *et al.* (2011) berichteten ebenfalls, dass 4 % (3/77) der analysierten Säuglingsanfangsnahrungsproben positiv für *Cronobacter* spp. waren. Yao *et al.* (2016) isolierten *Cronobacter* spp. aus 12 % (16/133) der einheimischen Säuglingsanfangsnahrungsproben in Abidjan, Elfenbeinküste.

Untersuchungen zu aus Deutschland stammenden Säuglingsnahrungsmitteln wurden unter anderem von Muytjens *et al.* (1988), Kress *et al.* (2005), Sanjaq (2008) und Kurz (2009) durchgeführt. Die Vorkommenshäufigkeit von *Cronobacter* spp. in Säuglingsfertignahrungsmitteln aus Deutschland lag zwischen 2,97 % (Sanjaq, 2008) und 50 % (Muytjens *et al.*, 1988), wobei die Probenanzahl bei den Untersuchungen stark variierte. Muytjens *et al.* (1988) analysierten zehn Proben aus Deutschland, von denen fünf (50 %) mit *Cronobacter* spp. kontaminiert waren. Kress *et al.* (2005) untersuchten hingegen 224 Proben, von denen sich 42 (18,8 %) als kontaminiert erwiesen. Kurz (2009) konnte in 21 (13,8 %) von 152 untersuchten Proben *Cronobacter* spp. nachweisen.

Es gibt eine Reihe von Untersuchungen über Säuglingsnahrungsmittel, von denen eine ausgewählte Übersicht in Tabelle 5 zusammengefasst ist. Es ist jedoch zu beachten, dass diese Erhebungen zur damaligen Zeit der früheren mikrobiologischen Kriterien der Codex-Alimentarius Commission durchgeführt wurden. Im Jahr 2008 überarbeitete die Codex-Alimentarius Commission die Leitlinien für die mikrobiologischen Kriterien und den spezifischen Nachweis von *Cronobacter* spp. in Säuglingsnahrungsmitteln für Säuglinge im Alter von ≤ 6 Monaten (CAC, 2008). Außerdem wurden bei einer Reihe dieser Erhebungen mittels unspezifischer Isolierungsmethoden für *Cronobacter* (z.B. mittels FDA-Protokoll) getestet, bei denen der Organismus auf Violett-Rot-Galle-Glukose-Agar (VRBGA) dominant sein konnte und nicht-pigmentierte *Cronobacter*-Kolonien auf Trypton-Soja-Agar (TSA) übersehen werden könnten.

1.3.2 Rechtliche Einordnung und Nationale Vorschriften für Säuglingsanfangsnahrung

Im Jahr 2002 klassifizierte die Internationale Kommission für mikrobiologische Spezifikationen für Lebensmittel *Cronobacter* spp. (ehemals *E. sakazakii*) als schwerwiegende Gefahr für gefährdete Bevölkerungsgruppen (ICMSF, 2002), und drei Risikobewertungen von *Cronobacter* spp. (*E. sakazakii*) wurden unter der Schirmherrschaft der FAO/WHO

1 Einleitung

veröffentlicht (FAO/WHO, 2004, 2006, 2008). Auf Grundlage eines Expertentreffens zum Thema „*E. sakazakii* und andere Mikroorganismen in pulverförmiger Säuglingsanfangsnahrung“ wurden *Cronobacter* spp. von der FAO/WHO hinsichtlich des Erkrankungsrisikos für Säuglinge in die „Risikokategorie A“ eingestuft (FAO/WHO, 2004). Kategorie A bedeutet, dass ein klarer Kausalzusammenhang nachgewiesen wurde. Derzeit zählen *Cronobacter* spp. und *Salmonella enterica* zu dieser Kategorie A. Beide Mikroorganismen verursachen Erkrankungen bei Säuglingen (unter 12 Monaten) und Kleinkindern (zwischen 1 und 3 Jahren) und wurden in pulverförmiger Säuglingsanfangsnahrung nachgewiesen (FAO/WHO, 2004 und 2006). Im Jahr 2007 wurde der Hygienekodex überarbeitet, um Kriterien für *Cronobacter* aufzunehmen, wonach *Cronobacter* in 30 Proben zu je 10 g Produkt nicht nachweisbar sein sollte (FAO/WHO, 2008; CXC 66-2008).

Europäische Union

Die Europäische Kommission hat mit der Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 spezifische Vorschriften zur Untersuchung von Säuglingsnahrungsmitteln erlassen. Gemäß dieser Verordnung der Kommission vom 15. November 2005 über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel, die durch die Verordnungen (EG) Nr. 1441/2007 und Nr. 365/2010 geändert wurde, werden *Cronobacter* spp. als Lebensmittelsicherheitskriterium definiert. Nach diesen Vorgaben dürfen *Cronobacter* spp. in 30 Proben zu je 10 g getrockneter Säuglingsanfangsnahrung und getrockneten diätetischen Lebensmitteln für besondere medizinische Zwecke, die für Säuglinge unter sechs Monaten bestimmt sind, nicht nachweisbar sein. Eine weitere Differenzierung der *Cronobacter*-Spezies ist jedoch nicht erforderlich (Europäische Kommission, 2010). Als „Lebensmittelsicherheitskriterium“ müssen *Cronobacter*-positive Chargen vom Markt genommen werden. Die EU definiert Säuglingsanfangsnahrung als Lebensmittel, die für Kinder unter 6 Monaten bestimmt sind, wenn keine ergänzende Ernährung erfolgt. Folgenahrung wird als rekonstituierte Flüssigkeit definiert, die für Kinder im Alter von 6 bis 12 Monaten als Teil einer abwechslungsreichen Ernährung gedacht ist. Die Standards für pulverförmige Säuglingsanfangsnahrung werden durch die Richtlinie 2006/141/EG für Standard- und Folgenahrung und die Richtlinie 1999/21/EG für spezielle medizinische Nahrung geregelt. Die mikrobiologischen Kriterien für *Cronobacter* in der Produktion pulverförmiger Säuglingsanfangsnahrung entsprechen den in den Codex-Leitlinien empfohlenen Kriterien.

1 Einleitung

Vereinigte Staaten

In den Vereinigten Staaten wird Säuglingsanfangsnahrung durch den Infant Formula Act (21 U.S.C. 350a) und verwandte Gesetze (21 CFR 106 und 107) geregelt. Diese Vorschriften legen sichere Herstellungspraktiken auf Basis der Good Manufacturing Practices (GMP) fest, einschließlich mikrobiologischer Kontrollen sowie Anforderungen an Nährstoffgehalte und Kennzeichnung. Zudem umfassen sie spezifische Hygienevorschriften und bauliche Anforderungen an Produktionsstätten und -prozesse. Spezifische Kontrollen für Säuglingsanfangsnahrung sind in den GMP-Definitionen der Food and Drug Administration (FDA) festgelegt. Die US-Standards überschneiden sich nicht vollständig mit denjenigen der EU, und einige EU-Importe entsprachen in der Vergangenheit nicht den Kennzeichnungsanforderungen der FDA. Im Jahr 2014 aktualisierte die FDA ihre Herstellungsstandards für eine sichere Produktion, um routinemäßige Tests auf Cronobacter und Salmonellen einzuschließen, was mit einer Verringerung der Inzidenzraten dieser Pathogene einherging.

China

Eine Reihe von Lebensmittelsicherheitsvorfällen in China, die zwischen 2005 und 2012 Säuglingsanfangsnahrung betrafen, führte zu einem erheblichen Vertrauensverlust von in China produzierter Säuglingsnahrung und löste umfassende gesetzgeberische Reaktionen aus. Der bekannteste dieser Vorfälle war die großangelegte und vorsätzliche Kontamination von Säuglingsanfangsnahrung mit Melamin, um Nährstoffmängel zu verschleiern. Infolgedessen führte China mehrere neue Gesetze zur Durchsetzung von Lebensmittelsicherheitsstandards ein. Die zentrale Gesetzgebung, die die Produktion von pulverförmiger Säuglingsanfangsnahrung regelt, ist das Lebensmittelsicherheitsgesetz, das von der neu gegründeten Lebensmittelsicherheitskommission Chinas durchgesetzt wird. Seit 2010 ist die Einhaltung der Good Manufacturing Practices (GMP) in chinesischen Produktionsstätten verpflichtend (GB 23790-2010). Darüber hinaus wurden zusätzliche Standards und Verfahren zur Herstellung von Säuglingsanfangsnahrung eingeführt, und es wurden erhebliche Investitionen in die Qualitätskontrollen und in die Produktion von Milchprodukten getätigt.

1.3.3 Vorkommen in der Umwelt und in Lebensmitteln

Cronobacter spp. sind ubiquitär verbreitet und konnten bereits in einer Vielzahl von Lebensmitteln tierischer und pflanzlicher Herkunft nachgewiesen werden, ohne dass ein natürliches Habitat identifiziert werden konnte (Forsythe, 2018; Joseph *et al.*, 2012; Leclercq *et al.*, 2002). Diese Mikroorganismen wurden in rohen oder frischen Produkten tierischen und pflanzlichen Ursprungs sowie in verarbeiteten und zubereiteten Lebensmitteln wie getrockneten, geräucherten, gefrorenen, fermentierten, gekochten oder gebratenen Produkten, verzehrfertigen Lebensmitteln und Streetfood nachgewiesen. Lebensmittel können während des gesamten Produktionsprozesses kontaminiert werden. Alle unbehandelten Rohstoffe für Lebensmittel und Getränke sowie andere Umweltquellen (Wasser, Boden, Staub) sind potenzielle Kontaminanten im Produktionsprozess. In verarbeiteten und zubereiteten Lebensmitteln kann die Kontamination durch primäre Kontamination der Rohstoffe oder durch sekundäre Kontamination während der Verarbeitung und Zubereitung auftreten. Angesichts der Allgegenwart von *Cronobacter* spp. in unbelebten (Wasser, Boden, Pflanzen) und belebten Umgebungen (Tiere, Menschen) ist es nicht überraschend, dass das Bakterium in einem breiten Spektrum von Lebensmitteln und Lebensmittelprodukten tierischen und pflanzlichen Ursprungs nachgewiesen wurde. In frischen pflanzlichen Lebensmitteln kann eine primäre Kontamination mit *Cronobacter* spp. intrinsisch auftreten, z.B. endophytisch oder durch Kontakt mit Wasser, Boden und lebenden Vektoren wie Insekten oder kleinen Wirbeltieren. Aufgrund der Eigenschaften der *Cronobacter* spp. zur Polysaccharidkapselbildung, der gelben Pigmentierung, sowie der Resistenz gegen Austrocknung, stellten Iversen und Forsythe (2003) erstmals die Hypothese auf, dass Pflanzen wahrscheinlich ein wichtiges Ökosystem für die *Cronobacter* spp. sein könnten. Diese Eigenschaften könnten die *Cronobacter*-Zellen in die Lage versetzen, eventuell an Pflanzenblättern anzuheften, die Pflanzen gegen durch Sonneneinstrahlung entstehende Sauerstoffradikale geschützt zu sein und Trockenperioden überlebensfähiger zu machen. In weiteren nachfolgenden mikrobiologischen Untersuchungen wurde bestätigt, dass eine Kontamination mit *Cronobacter* spp. häufig in pflanzlichen Lebensmitteln festgestellt wurde, wobei die positiven Lebensmittel tierischer Herkunft jedoch pflanzliche Zusatzstoffe enthielten (Turkocovský *et al.*, 2011). Frische und getrocknete Kräuter und Gewürze sind eine besonders ergiebige Quelle für *Cronobacter*-Stämme, mit einer Vorkommensrate von ca. 30 % (Iversen & Forsythe 2004).

Cronobacter spp. wurden weiterhin aus Lebensmitteln isoliert, die üblicherweise mit anderen lebensmittelbedingten Krankheitserregern in Verbindung gebracht werden, wie z. B. Fleisch, Eier und Milch. Rohe Lebensmittel tierischen Ursprungs können zusätzlich über die (fäkale) Mikroflora der lebensmittelliefernden Tiere selbst kontaminiert sein. Mit *Cronobacter* spp. kontaminierte Lebensmittel tierischen Ursprungs waren u.a. Rohmilch (Lafarge *et al.*, 2004),

1 Einleitung

Milcherzeugnisse, wie z.B. Käse (Leclercq *et al.*, 2002; Iversen *et al.*, 2004a; Chaves-López *et al.*, 2006), Speiseeis (Kraemer, 2008), Fleischerzeugnisse, wie z.B. Hackfleisch und Fleischbrät (Leclercq *et al.*, 2002), Fisch (Liu *et al.*, 2006) sowie Eier (Gurtler *et al.*, 2005; Hochel *et al.*, 2012). *Cronobacter* spp. waren in einer Vielzahl von verarbeiteten Lebensmitteln und frischen Produkten zu finden, darunter Getreide, Weizen, Mais, Soja, Nudeln, Reis, Kuchenmischungen, Tütensuppen, aromatisierte Tees, Kräuter und Gewürze, Gemüse und Salate sowie Säuglingsanfangsnahrung und Säuglingsnahrung (Friedemann 2007, Hochel *et al.*, 2012; Iversen & Forsythe 2004; Vojkowska *et al.*, 2016). Das Vorkommen bei pflanzlichen Lebensmittelzutaten ist wahrscheinlich auf die Persistenz des Organismus in stärkehaltigen Umgebungen zurückzuführen. Es ist bemerkenswert, dass Stärke und Soja die wichtigsten Bestandteile von Säuglingsnahrungsmitteln sind (FAO/WHO, 2004).

Im Weiteren wurde das Vorkommen von *Cronobacter* spp. sowohl in pflanzlichen Lebensmitteln wie Getreiden Hülsenfrüchten, frischen Obst- und Gemüsesorten als auch in getrockneten pflanzlichen Lebensmitteln, wie, Kräutern, Tee, Gewürzen und anderen verwandten Produkten berichtet (Baumgartner *et al.*, 2009; Jaradat *et al.*, 2009; Chon *et al.*, 2012; Hochel *et al.*, 2012; Iversen *et al.*, 2004a).

Cronobacter spp. wurden aus dem Xylemsaft von Zitronenunterlagen (Gardner *et al.*, 1982), aus der Rhizosphäre von Weizen (Forlani *et al.*, 1995) und als endophytische Bakterien aus den Blättern von Reispflanzen (Yang *et al.*, 1999) isoliert. Kanivets & Pishchur (2001) entdeckten *Cronobacter* spp. (*E. sakazakii*) in der bakteriellen Besiedlungsflora von desinfizierten Zuckerrübensamen. Da *Cronobacter* (*E. sakazakii*) zur kultivierbaren endophytischen und epiphytischen Flora von Reis- (Yang *et al.*, 1999) und Sojapflanzen (Kuklinsky-Sobral *et al.*, 2004, 2005) gehört, konnte es auch aus verwandten Lebensmitteln isoliert werden (Tabelle 5). Einige traditionelle Lebensmittel und Getränke auf Basis von Getreide, Kräutern und Hülsenfrüchten wurden als mit *Cronobacter* spp. (*E. sakazakii*) kontaminiert befunden (Bulgarelli *et al.*, 1988; Tamura *et al.*, 1995, Gassem, 1999; Mensah *et al.*, 2002; Nassereddin & Yamani, 2005; Coulin *et al.*, 2006). *Cronobacter* spp. (*E. sakazakii*) kann Teil von Starterkulturen für die Fermentation traditioneller vegetarischer Lebensmittel sein (Coulin *et al.*, 2006). Geiges *et al.* (1990) und Osterblad *et al.* (1999) entdeckten *Cronobacter* spp. (*E. sakazakii*) in gemischten Salatgemüsen sowie in importiertem, frischem und tiefgefrorenem Gemüse im Einzelhandel.

Da *Cronobacter* spp. pflanzenassoziiert sind, konnte der Organismus aus einem breiten Spektrum von Umgebungsproben isoliert werden. Neuere Studien bezeichneten allerdings allgemein die Umwelt als Reservoir. Grim *et al.* (2013) konnten durch komparative Genomanalyse ein sogenanntes *Cronobacter* core Genom ermitteln, welches gemeinsame orthologe Gene für die einzelnen *Cronobacter* Spezies aufweist. In diesem Kerngenom

1 Einleitung

konnten zahlreiche Gene identifiziert werden, die für den Transport bzw. die Verwertung pflanzlicher Bestandteile, wie bspw. Maltose, Arabinogalactan oder Xylose kodieren oder dem Bakterium Resistenzen gegen Phytotoxine verleihen. Diese Erkenntnisse sprechen generell für einen pflanzenassoziierten Ursprung von *Cronobacter* spp. Aus denselben Daten geht zudem hervor, dass das *Cronobacter*-Genus einer bidirektionalen Divergenz unterliegt. So ist die *C. dublinensis*-*C. muytjensii*-Gruppe (*clade*) vor allem an die Umwelt- und Pflanzen-Nische adaptiert, während die andere *clade*, hauptsächlich bestehend aus *C. sakazakii* und *C. malonaticus*, durch den Erwerb zusätzlicher Gene in ihrer Virulenz gesteigert und an Wirtsorganismen adaptiert ist.

In der Umwelt scheinen *Cronobacter* spp. häufig vorzukommen. So konnten *Cronobacter* spp. aus der Produktionsumgebung verschiedener lebensmittelherstellender Betriebe (Milchpulver, Gewürz-, Schokoladen-, Getreide-, Nudel- und Kartoffelprodukte) nachgewiesen werden (Kandhai *et al.*, 2004; Mullane *et al.*, 2008). Dennoch ist es die weit verbreitete Präsenz und Persistenz des Organismus in Produktionsstätten für Milchpulver und Säuglingsnahrung, die aufgrund der potenziellen Kontamination des Endprodukts kontrolliert werden müssen. Der Organismus wurde aus solchen Produktionsanlagen weltweit isoliert (Australien, China, Deutschland, Irland, Schweiz und Vereinigte Staaten) und könnte daher ein weit verbreitetes Problem für die Industrie darstellen (Craven *et al.*, 2010; Fei *et al.*, 2015; Jacobs *et al.*, 2011; Reich *et al.*, 2010; Sonbol *et al.*, 2013; Yan *et al.*, 2013). Zu den Isolierungsstandorten gehörten Walzentrockner, Trockentürme, Luftfilter, Luftpartikel, Tankwagenbuchten und Fabrikdächer. Der Organismus konnte sogar die Sprühtrocknung überleben (Arku *et al.*, 2011). Die Genotypisierung hat die langfristige Persistenz von nicht unterscheidbaren Stämmen in den Produktionsanlagen bestätigt (Müller *et al.*, 2013, Sonbol *et al.*, 2013, Yan *et al.*, 2013). Die natürliche Resistenz des Organismus gegen Austrocknung kann seine Persistenz in Produktionsanlagen und pulverförmiger Säuglingsnahrung-Zutaten (z. B. Stärke) erklären.

Trotz einer gemeldeten schweren Infektion eines Säuglings, die auf die Rekonstitution von Säuglingsanfangsnahrungsmitteln mit *Cronobacter*-haltigem Wasser zurückzuführen ist, wurde Wasser als Quelle des Genus bisher nicht viel Aufmerksamkeit geschenkt (Hariri *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2013). Der Nachweis von *Cronobacter* spp. in Mineralwasserquellen (Mosso *et al.*, 1994) und im Trinkwasser (Leclercq *et al.*, 2001) ist ebenfalls beschrieben. Trinkwasser wird zum Reinigen und Abspülen von Lebensmitteln und Geräten zur Lebensmittelzubereitung, zur Verdünnung und Rekonstitution von Lebensmitteln oder direkt als Getränk verwendet. Oger *et al.*, (1981) und Schindler & Metz (1991) fanden *Cronobacter* in Häufigkeiten von insgesamt 1,8 % (10/564 Stämme) und 0,4 % (1/256 Stämme) bei der Untersuchung von zentralen und lokalen Trinkwasserversorgungen. Bartolucci *et al.*, (1996), Lee & Kim (2003) sowie Williams & Braun-Howland (2003) identifizierten *Cronobacter*-Biofilmbildung im Wasserverteilungssystem.

1 Einleitung

Er wurde zudem aus häuslichen Umgebungen (z. B. Staubsaugerbeutel) und auch aus Haushaltsgeräten isoliert (Kandhai *et al.*, 2004; Killer *et al.*, 2015). Bei der Aufklärung von durch *Cronobacter* spp. bedingten nosokomialen Erkrankungen wurden kontaminierte Bedarfsgegenstände, die zur Zubereitung von Säuglingsfertiernahrung (Rührlöffel, Mixer und Flaschenwärmer) oder zur anschließenden Geschirreinigung (Abwaschbürste) genutzt wurden, gefunden (Muytjens *et al.*, 1983; Noriega *et al.*, 1990; Bar-Oz *et al.*, 2001; Block *et al.*, 2002).

Cronobacter-kontaminierte Lebensmittel tierischen Ursprungs umfassen eine Vielzahl von Fleisch und Fleischprodukten von Kamel, Schwein, Rind und Geflügel sowie zusätzlich Eier, Rohmilch und verschiedene Milchprodukte, seltener, Fisch (Tabelle 5). *Cronobacter* spp. wurde von Tieren isoliert (Farmer *et al.*, 1985; Gouillet & Picard, 1986), insbesondere von Vögeln, Echsen, Ratten und Ferkeln (Gouillet & Picard, 1986; Gakuya *et al.*, 2001; Montgomery *et al.*, 2002). Bei Wirbeltieren sind *Cronobacter* spp. ein Bestandteil der normalen oralen und intestinalen Flora von Tieren und Menschen (Gakuya *et al.*, 2001; Montgomery *et al.*, 2002; Zogaj *et al.*, 2003). Salmon *et al.* (1998) fanden *Cronobacter* spp. in Milchdrüsengewebe von Milchrindern. Liu *et al.* (2005) entdeckten *Cronobacter* spp. in Futtermitteln für Haustiere. Im weiteren zogen Posautz *et al.* (2022), dass *C. turicensis* mit epidemiologisch verwandten Typhlokolitis-Fällen bei europäischen Feldhasen in Österreich in Verbindung gebracht werden konnte. Die Rolle von Wildtieren wurde als Reservoir für potentiell pathogene *C. turicensis*-Stämme, die *mcr*-ähnliche Gene tragen, in Betracht gezogen.

In Straußeneiern konnten *Cronobacter* spp. sowohl im Eiweiß als auch im Dotter nachgewiesen werden (Cabassi *et al.*, 2004). Die Erreger konnten darüber hinaus von der Hautoberfläche von Stubenfliegen (*Musca domestica*), aus dem Darm der gemeinen Stechfliege (*Stomoxys calcitrans*) sowie aus dem Verdauungstrakt von mexikanischen Fruchtfliegen (*Anastrepha ludens*) und Stallfliegenlarven isoliert werden (Kuzina *et al.*, 2001; Hamilton *et al.*, 2003; Mramba *et al.*, 2006; Pava-Ripoll *et al.*, 2012). Insekten können damit ein mögliches Umweltreservoir darstellen und als Vektoren einer Umgebungskontamination eine wichtige Verbreitungsmöglichkeit sein. Nicht nur Insekten sind als Träger von *Cronobacter* spp. beschrieben worden. Ratten sind ebenfalls Quellen für *Cronobacter* spp. (Hamilton *et al.*, 2003). Gakuya *et al.* (2001) untersuchten z.B. Antibiotikaresistenzen von aus Ratten isolierten *Cronobacter* spp. aus Afrika.

Cronobacter spp. werden asymptomatisch von Menschen übertragen, wobei der Organismus aus Zähnen, Speichel, Fäkalien, Muttermilch und Haut isoliert wurde (Baltimore *et al.*, 1989; Gosney *et al.*, 2006; Zogaj *et al.*, 2003). Auch in klinischem Material wie Blut, Knochenmark, Speichel, Urin, Wundsekret und Stuhl, sowie in klinischen Umfeldproben fanden sich *Cronobacter* spp. (Lai, 2001; Masaki *et al.*, 2001). In einem Altersprofil von *Cronobacter*, das

1 Einleitung

anhand von Rachenabstrichen von mehr als 45 000 ambulanten Patienten im Zeitraum 2005-2011 isoliert wurde, wurde der Organismus aus jeder Altersgruppe isoliert, mit einer höheren Häufigkeit bei Kindern unter 14 Jahren (Holy *et al.*, 2013).

Ebenfalls wurde das Bakterium aus der Krankenhausumgebung isoliert, z. B. aus der Krankenhausluft und verschiedenen Gegenständen, wie z.B. aus Reinigungsbürsten für Säuglingsflaschen, dem Stethoskop, dem Löffel und dem Mixer für die Zubereitung von Säuglingsnahrung. Der Organismus wurde zudem als Teil des gemischten Biofilms in neonatalen enteralen Ernährungssonden vorgefunden. Eine Rekontamination der rekonstituierten Säuglingsnahrungsmittel durch eine kontaminierte enterale Ernährungssonde wurde in einigen Laborversuchen berichtet (Hurrell *et al.*, 2009a, 2009b).

Der Organismus wurde im Weiteren aus unterschiedlichen klinischen Proben, z. B., Zerebrospinalflüssigkeit, Blut, Knochenmark, Sputum, Urin, entzündetem Blinddarm und Bindehäuten isoliert (Masaki *et al.*, 2001).

1 Einleitung

Tabelle 5: Auswahl weltweiter Untersuchungen auf Vorkommen von *Cronobacter* spp. in Säuglingsnahrungsmitteln, Lebensmitteln tierischen und pflanzlichen Ursprungs und Umweltsproben (basierend auf Friedemann, 2007)

Säuglingsnahrung	Land	Referenz
Säuglingsanfangsnahrung und Folgenahrung	Internationale Survey	Chap <i>et al.</i> (2009)
Säuglingsnahrung	Jordanien	Jaradat <i>et al.</i> (2009);
Säuglingsanfangsnahrung und Folgenahrung	China, Deutschland	Zhang <i>et al.</i> (2017); Akineden <i>et al.</i> (2017)
Säuglingsanfangsnahrung	China	Pan <i>et al.</i> (2014)
Säuglingsanfangsnahrung und Produktionswerk	China	Fei <i>et al.</i> (2015)
Säuglingsnahrung, Getreidebeikost und Produktionswerk	Jordanien	Shaker <i>et al.</i> (2007)
Säuglingsanfangsnahrung und Folgenahrung	Ägypten	Abdel-Galil <i>et al.</i> (2014)
Säuglingsanfangsnahrung und Milcherzeugnisse	Ägypten	El-Gamal <i>et al.</i> (2013)
Säuglingsnahrung und Zutaten	Türkei	Heperkan <i>et al.</i> (2017)
Säuglingsnahrung auf Milchbasis	China	Li <i>et al.</i> (2016)
Säuglingsnahrung, Getreide, Gemüse, Obst	China	Li <i>et al.</i> (2014)
Säuglingsnahrung auf Fruchtbasis	UK	Iversen <i>et al.</i> (2004)
Säuglingsnahrung auf Reisbasis	UK	Iversen <i>et al.</i> (2004)
Säuglingsnahrung	Schweiz	Lehner <i>et al.</i> (2005 & 2004)

Lebensmittel tierischen Ursprungs - Fleisch und Fleischprodukte	Land	Referenz
Kamelfleisch, Eier, Käse, Milch, Schweinefleisch, Fisch, Geflügel, Wurstwaren, Schalentiere	Saudi-Arabien	Beuchat <i>et al.</i> (2009)
Rindfleisch und Rindfleischerzeugnisse, Schweinefleisch, Burger, Hackfleisch von Rind- und Schweinefleisch	Ireland	Molloy <i>et al.</i> (2009)
Geflügelfleisch	Schweden, Argentinien	Dahlenborg <i>et al.</i> (2001); Löfström <i>et al.</i> (2004); Jimenez <i>et al.</i> (2003)
Rindfleisch, Wurstwaren	Frankreich	Leclercq <i>et al.</i> (2002)
Wurstwaren	Frankreich, Deutschland	Gouillet & Picard (1986); Schalch <i>et al.</i> (1994)
Fleischerzeugnisse	Japan	Watanabe & Esaki (1994); Kimura <i>et al.</i> (1999)
Schweinefleisch	China, Spanien	Fei <i>et al.</i> (2018); Castano <i>et al.</i> (2001)
Fleisch	China, Kanada	Zeng <i>et al.</i> (2020); Nazarowec-White & Farber (1997)
Gelatine	Belgien	De Clerck <i>et al.</i> (2004)

1 Einleitung

Fortsetzung der Tabelle 5

Milch und Milchprodukte	Land	Referenz
Milchpulver	Niederlande, UK, China	Muytjens <i>et al.</i> (1988); Heuvelink <i>et al.</i> (2001); Iversen & Forsythe (2004); Xu <i>et al.</i> (2014); Kandhai <i>et al.</i> (2004)
Milcherzeugnisse	Italien	Casalinuovo <i>et al.</i> (2014)
Käse	Süd-Afrika, Frankreich, Spanien, China, Türkei, Italien	De Haast & Britz (1986); Leclercq <i>et al.</i> (2002); Roig-Sagués <i>et al.</i> (2002); Ogier <i>et al.</i> (2004); Liu <i>et al.</i> (2005); Ozturk & Ercisli (2006); Chaves-Lopez <i>et al.</i> (2006)
Käseprodukte	UK	Iversen <i>et al.</i> (2004)
Frischkäse aus Rohmilch	Spanien	Morales <i>et al.</i> (2003)&(2004)
Natriumkaseinat, Quark	USA	Restaino <i>et al.</i> (2006)
Milch (Rohmilch)	Süd-Korea, Frankreich, Schweiz	Choi <i>et al.</i> (1999); Lafarge <i>et al.</i> (2004); Ogier <i>et al.</i> (2004); Lehner <i>et al.</i> (2004) & (2005);
Tankmilch	USA	Jayarao & Wang (1999)

Ei und Eiprodukte	Land	Referenz
Eier	Italien, USA	Cabassi <i>et al.</i> (2004); Musgrove <i>et al.</i> (2004); Gurtler <i>et al.</i> (2005); Hochel <i>et al.</i> (2012)

Fisch und Fischprodukte	Land	Referenz
Muscheln	Spanien	Balebona <i>et al.</i> (1990)
Fisch (Aquakultur)	USA	Miranda <i>et al.</i> (2003); Call <i>et al.</i> (2003)
Fisch (verzehrfertig)	Ghana	Mensah <i>et al.</i> (2002)
Fischpulver	China	Liu <i>et al.</i> (2005)
Sardinien (verzehrfertig)	Ghana	Nketsia-Tabiri <i>et al.</i> (2003)

1 Einleitung

Fortsetzung der Tabelle 5

Getreide und Getreideprodukte	Land	Referenz
Grünmalz (Gerste)	Deutschland	Scheepe-Leberkühne & Wagner (1986)
Khamir (Sorghumhirse)	Saudi Arabien	Gassem (1999)
Reissaatgut	Philippinen	Cottyn <i>et al.</i> (2001)
Sobia (Weizen, Malzmehl)	Saudi Arabien	Gassem (1999)
Körner, gemahlener Mais, gemahlener Reis	UK	Iversen <i>et al.</i> , 2004a, Iversen <i>et al.</i> , 2004b
Reis, Reisstärke, Reismehl	USA	Gurtler <i>et al.</i> (2005); Richards <i>et al.</i> (2005)
Mehl oder Grieß von Mais, Soja, Weizen, Reis	USA	Restaino <i>et al.</i> (2006)
Getreidekörner	Republik Korea	Jung&Park (2006)
Cereals and related products	China, Brasilien, USA	Li <i>et al.</i> (2014); Silva <i>et al.</i> , 2019; Cechin <i>et al.</i> , 2024; Restaino <i>et al.</i> (2006)
Acheke, Gerste, Kekse, Getreide, Augenbohnenpaste, Trockennüsse, Körner, Kräuter und Gewürze, Rotalgen, Sorghum, Erbsen	USA	Beuchat <i>et al.</i> (2009)
Schokolade und Kekse, Vanillecreme-Riegel	Schweiz	Baumgartner <i>et al.</i> (2009)
Tofu	UK	Fouad & Hegeman (1993); No <i>et al.</i> , (2002); Osaili & Forsythe (2009)
Hafer, Gerste, Weizen	UK	Molley <i>et al.</i> (2009)
Weizen und Weizenprodukte	China	Lou <i>et al.</i> (2019);
Reismehl, Reiskörner	China	Lou <i>et al.</i> (2019); Huang <i>et al.</i> (2015)
Getreidebeikost, Reis, Mais, Soja, Getreide, Stärke, Kartoffelmehl, Nudeln, Cerealien	Jordanien	Cottyn <i>et al.</i> (2001)
Mehl und Landwirtschaftsprodukte	Republik Korea	Osaili <i>et al.</i> (2009)
Schokolade, Cerealien, Kartoffelmehl		Chon <i>et al.</i> (2012)
		Khandhai <i>et al.</i> (2004)

Hülsenfrüchte und Produkte	Land	Referenz
Nüsse, Früchte, Mandeln, Pistazien, Kokosnusspulver, Sonnenblumenkerne, Sesam, Biskuitmischung, pflanzlicher Talg	UK	Iversen <i>et al.</i> (2004)
Kuh-Erbsen-Paste	Nigeria	Bulgarelli <i>et al.</i> (1988)
Sojabohnensprossen	Deutschland	Geiges <i>et al.</i> (1990)
Tofu (fermentierte Soja)	USA, Republik Korea	Fouad & Hegeman (1993); No <i>et al.</i> (2002)
Nüsse	Polen	Berthold-Pluta <i>et al.</i> (2021)
Kokosnuss	Türkei	Arslan & Ertürk (2021)
Champignons	China	Li <i>et al.</i> (2019)
Tempe (fermentierte Soja)	Indonesien	Denter & Bisping (1994)

1 Einleitung

Fortsetzung der Tabelle 5

Tee, Kräuter, Gewürze und Pflanzen	Land	Referenz
Getrocknete Kräuter,	USA	Molley <i>et al.</i> (2009); Restaino <i>et al.</i> (2006)
Saurer Tee	China	Tamura <i>et al.</i> (1995)
Eistee	USA	Zhao <i>et al.</i> (1997)
Kräutertee (Fenchel, Anis, Kümmel)	Deutschland	BVL- Berichte zur Lebensmittelsicherheit 2022
Kräuter und Gewürze	UK	Iversen <i>et al.</i> (2004)
Getreidebeikost, Trinkwasser	China	Cui <i>et al.</i> (2015)
Kräutertee, Eistee	Jordanien	Chap <i>et al.</i> (2009)
Gewürzmischung, Süßholz, Thymian, Anis, Kamille, Fenchel, Salbei	Jordanien	Jaradat <i>et al.</i> (2009)
Gewürze und Kräuter	Syrien	Belal <i>et al.</i> (2013); Iversen & Forsythe (2004)
Maismehl, Sojamehl, Weizenmehl, Reismehl	USA	Restaino <i>et al.</i> (2006)
Getreidebeikost für Kinder und Erwachsene	USA	Restaino <i>et al.</i> (2006)
Getrocknete Gemüse und Kräuter	USA	Restaino <i>et al.</i> (2006)
Getrocknete Obst	Polen	Berthold-Pluta <i>et al.</i> (2021)
Gewürzmischung, schwarzer und weißer Pfeffer, Curry und Kräutermischung	Schweiz	Baumgartner <i>et al.</i> (2009)
Tea, chinesische Kräuter	China	Dou <i>et al.</i> (2015)

Frischwaren (Obst und Gemüse)	Land	Referenz
Salate und Kräuter, Gewürze	Brasilien, Polen	Molley <i>et al.</i> (2009); Brandão <i>et al.</i> (2017); Garbowska <i>et al.</i> (2015)
Mungobohnensprossen, Alfalfasprossen	Norwegen	Robertson <i>et al.</i> (2002)
Mungobohnensprossen	Deutschland	Boehme <i>et al.</i> (2004)
Alfalfa-Sprossen	Mexiko	Cruz <i>et al.</i> (2004)
Erbsensuppenpulver	Tschechien	Leuschner <i>et al.</i> (2004)
Sojaprotein, Bohnenmehl, Linsen	England	Iversen <i>et al.</i> (2004a) & (2004b)
Sous (Lakritze)	Jordanien	Nassreddin & Yamani (2005)
Sprossen, Kräuter und Salate, Petersilie, Dill, Koriander, Sellerie, Basilikum	Schweiz	Baumgartner <i>et al.</i> (2009)
Pflanzliche Lebensmittel und Umweltproben	Tschechien	Vojkovska <i>et al.</i> (2016)
Fertiggerichte	China	Xu <i>et al.</i> (2015)
Proben von Lebensmitteln, Kräutern und Umwelt	Indien	Singh (2015)
Gemüse	China	Chen <i>et al.</i> (2014); Fei <i>et al.</i> (2018); Ling <i>et al.</i> (2018)
Salat und Gemüse	Italien, Polen, Süd-Korea, Deutschland, Tschechien, Irland, Spanien, Ghana, Brasilien	Galli <i>et al.</i> (1990), Ottaviani <i>et al.</i> (1992); Weiss <i>et al.</i> (2005); Berthold- Pluta <i>et al.</i> (2017); Kim <i>et al.</i> (2011); Geiges <i>et al.</i> (1990); Weiss <i>et al.</i> (2005); Vojkovska <i>et al.</i> (2016); Soriano <i>et al.</i> (2001); Mensah <i>et al.</i> (2002); Vasconcellos <i>et al.</i> (2018)

1 Einleitung

Fortsetzung der Tabelle 5

Frischwaren (Obst und Gemüse)	Land	Referenz
Gemüse	Finnland, Niederlande, Italien, Polen, Ungarn, Portugal, Frankreich, USA, Republik Korea	Österblad <i>et al.</i> (1999); Leclercq <i>et al.</i> (2002); Restaino <i>et al.</i> (2006); Jung & Park (2006)
Zucchini	Spanien	Gray <i>et al.</i> (2001)
Kartoffeln	Polen	Szafranek <i>et al.</i> (2005)
Tomateneintopf	Ghana	Mensah <i>et al.</i> (2002)
Obst	China	Fei <i>et al.</i> (2018)
Fruchtpulver	Schweiz	Lehner <i>et al.</i> (2004) & (2005)

Umwelt	Land	Referenz
Milchpulver und Umwelt	USA	Lampel & Chen (2009)
Milchpulver Produktionsstätten	USA, Deutschland	Fei <i>et al.</i> (2015); Craven <i>et al.</i> (2010)
Säuglingsnahrungsverarbeitungsbetrieb	Deutschland; Schweiz, USA; China; UK	Reich <i>et al.</i> (2010); Jacobs <i>et al.</i> (2011); Müller <i>et al.</i> (2013); Hayman <i>et al.</i> (2020); Lu <i>et al.</i> (2019); Yan <i>et al.</i> (2015); Mullane <i>et al.</i> (2007) & (2008)
Umwelt- und Lebensmittelproben Nudel- und Krückerproduktionsbetriebe	Tschechien	Putthana (2012) Khandhai <i>et al.</i> (2004)
Rohabwasser aus der Weinkellerei	Süd-Afrika	Keyser <i>et al.</i> (2003)
Wasser, Erde und Gras	Belgien, USA, UK, Frankreich	Lampel & Chen (2009); Cruz <i>et al.</i> (2004); Molly <i>et al.</i> (2009); Oliver (1997); Leclercq <i>et al.</i> (2001)
Trinkwasser	China, Frankreich, USA, Deutschland, Italien, Republik Korea, UK	Fei <i>et al.</i> (2018), Leclercq <i>et al.</i> (1981); Camper <i>et al.</i> (1986); Schindler & Metz (1991), Bartolucci <i>et al.</i> (1996); Lee & Kim (2003), Williams & Braun-Howland (2003)
Hausumgebung	USA	Samadpour <i>et al.</i> (2024)
Staubsaugerstaub im Haushalt	USA	Jaradat <i>et al.</i> (2009); Molley <i>et al.</i> (2009); Samadpour <i>et al.</i> (2024)
Haushaltstaub	USA	Khandhai <i>et al.</i> (2004); Samadpour <i>et al.</i> (2024)
Küchengeräte	USA	Kilonzo-Nthenge <i>et al.</i> (2012); Samadpour <i>et al.</i> (2024)
Krankenhausluft	Japan	Masaki <i>et al.</i> (2001)

1.4 Nachweis von *Cronobacter* spp.

1.4.1 Kulturelle Isolierungsmethoden

Zur kulturellen Isolierung von *Cronobacter* spp., insbesondere aus Säuglingsnahrungsmitteln, wurden in den letzten Jahrzehnten zahlreiche Methoden sowie spezifische chromogene Agar und Bouillons entwickelt. Da *Cronobacter* spp. in Säuglingsnahrungsmitteln üblicherweise nur in geringen Mengen (<1 KbE/100 g) nachgewiesen wurden, verlangen die derzeitigen internationalen Vorschriften das Nichtvorhandensein aller *Cronobacter*-Spezies in 10 g-Portionen von pulverförmigen Säuglingsanfangsnahrungsmitteln (FAO/WHO, 2004 & 2006).

Aktuell wird auf internationaler Ebene ein horizontales Verfahren zum kulturellen Nachweis von *Cronobacter* spp. in Lebensmittel-, Futtermittel- und Umgebungsproben eingesetzt: DIN EN ISO 22964:2017-08 "Mikrobiologie der Lebensmittelkette - Horizontales Verfahren zum Nachweis von *Cronobacter* spp.". Diese ISO-Norm gilt für alle Lebensmittelprodukte und Zutaten, die für den menschlichen Verzehr oder als Futtermittel bestimmt sind, sowie für Umfeldproben im Bereich der Herstellung und Handhabung von Lebensmitteln. Die aktuelle ISO-Methode wurde durch die Verordnung (EU) 2019/229 der Kommission vom 07. Februar 2019 zur Änderung der "Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 der Kommission vom 15. November 2005 über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel" als analytisches Referenzverfahren für die Überprüfung von getrockneter Säuglingsnahrung auf das Vorhandensein von *Cronobacter* spp. genannt.

Vor dem Inkrafttreten der Verordnung (EU) 2019/229 vom 07. Februar 2019 galt die analytische Referenzmethode der Verordnung (EG) Nr. 2073/2005, ein Vorläufer der aktuellen ISO-Methode Technical Specification ISO/TS 22964 – IDF/RM 210:2006 „Milk and milk products – Detection of *Enterobacter sakazakii*“, als das international standardisierte Analyseverfahren, das im Jahr 2006 durch die ISO (International Organisation for Standardisation) und die IDF (International Dairy Federation) zur Isolation von *Cronobacter* spp. (*E. sakazakii*) aus Säuglingsnahrungen auf Milchbasis eingeführt wurde (ISO, 2006). Bei diesem veralteten Verfahren erfolgte aufgrund des gestressten Zustands der Zellen zunächst eine Resuscitation der Probe (1/10) in gepuffertem Peptonwasser für 20 h bei 37°C, gefolgt von einer selektiven Anreicherung in modifizierter Laurylsulfat-Trypton (mLST)-Bouillon mit Vancomycin und Ausstrich auf einem chromogenen Selektivmedium (z.B. ESIA®-Agar; „*E. sakazakii*-Isolation-Agar“ der Firma AES Laboratoire). Zur Identifizierung wurden blau-violette Kolonien zur Prüfung auf ihre Fähigkeit zur Bildung gelber Pigmente auf CASO-Agar (Caseinpepton-Sojamehlpepton-Agar) ausgestrichen und mittels biochemischer Differenzierung (z.B. API® 20E, API® 32E) endgültig identifiziert.

1 Einleitung

Bei dem Verfahren handelte es sich nicht um eine optimale Isolierungsmethode. Zum einen wuchsen nicht alle *Cronobacter*-Stämme in der vorgeschriebenen selektiven Anreicherung modifizierter LST-Bouillon mit Vancomycin. Zum anderen konnten ca. 20 % der nicht gelb pigmentierten *Cronobacter*-Isolate nicht erfasst werden (Iversen & Forsythe, 2007). Auch die Bebrütungstemperaturen von 44 bzw. 45 °C sind für einige *Cronobacter*-Isolate zu hoch, weshalb in der aktuellen ISO-Methode im Vergleich zur Vorgängernorm (ISO/TS 22964: IDF/RM 210:2006) bedeutende Änderungen vorgenommen wurden. Das neue ISO-Verfahren wurde allerdings im Hinblick auf die Untersuchung anderer Lebensmittel ausgedehnt.

Bei der Untersuchung nach aktueller ISO-Methode erfolgt wie bei der Vorgängernorm (ISO/TS 22964: IDF/RM 210:2006) eine Voranreicherung der gestressten Zellen in gepuffertem Peptonwasser (34 - 38 °C/18 h). Diese nicht-selektive Anreicherung wird anschließend in die saccharosehaltige Cronobacter Screening (CSB)-Bouillon (Iversen *et al.*, 2008a) übertragen. Die Bebrütung erfolgt bei 41,5 °C über 24 h. Danach werden Ausstriche auf einem festen „Chromogenic Cronobacter Isolation“ (CCI)-Agar angelegt und nach der Inkubation bei 41,5 °C über 24 h typische, aufgrund der alpha-Glucosidase-Aktivität des Erregers und des damit verbundenen Farbumschlags als blaugrün gefärbte Kolonien identifiziert. Im Weiteren wurde in der aktuellen ISO-Norm der Nachweis von *Cronobacter* spp. gemäß der Taxonomie aus dem Jahr 2014 in den Testumfang mit einbezogen. Als *Cronobacter* spp. werden die Mikroorganismen bezeichnet, welche auf Chromogenic Cronobacter Isolation (CCI)-Agar typische Kolonien bilden und die bei der Durchführung der in dieser neuen Norm vorgeschriebenen Tests die beschriebenen biochemischen Eigenschaften aufweisen. Die Isolierung auf Chromogenic Cronobacter Isolation (CCI)-Agar basiert, wie die übrigen chromogenen Medien zum Nachweis von *Cronobacter* spp. auch, in erster Linie auf der α -Glucosidase-Reaktion (Iversen *et al.*, 2008a), die als Substrat 5-Brom-4-chlor-3-indolyl-alpha-D-glucopyranosid angeboten wird. Verwendete chromogene Agar basieren häufig auf der DFI-Formulierung (Druggan, Forsythe, Iversen), die seit ihrem ursprünglichen Design verbessert wurde (Iversen *et al.* 2004a). Eine positive Reaktion der *Cronobacter* spp. wird von anderen *Enterobacteriaceae* unterschieden (Muytjens *et al.*, 1984). Es weist zudem H₂S-bildende Salmonellen als schwarze Kolonien nach; daher ist es für beide Organismen anwendbar, die für die Säuglingsanfangsnahrung von Bedeutung sind. *Proteus vulgaris* besitzt ebenfalls eine α -Glucosidase-Aktivität, kann aber anhand der Graufärbung der Kolonien, infolge von H₂S-Bildung, von *Cronobacter* (*Cronobacter*-Kolonien sind blaugrün) abgegrenzt werden (Iversen *et al.*, 2004a).

Mit dem aktuellen ISO-Verfahren werden üblicherweise Proben aus Folgenahrungen (Säuglingsanfangsnahrung für Säuglinge mit einem Zielalter von >6 Monaten), Lebensmitteln, Getreide, Inhaltsstoffen und Umweltproben im Produktionsbereich entnommen und meist nach den gleichen Protokollen wie für Fertigprodukte der pulverförmigen Säuglingsnahrungsmittel

1 Einleitung

getestet. Obwohl *Cronobacter* aus Folgenahrungen (Säuglingsanfangsnahrung für Säuglinge mit einem Zielalter von >6 Monaten) und Entwöhnungsnahrung isoliert wurde, gibt es derzeit keine ausreichende epidemiologische Evidenz, um die Implementierung von Kriterien für diese Produkte zu unterstützen (FAO-WHO, 2008).

Eine Alternative zur alten ISO-Methode (ISO/TS 22964: IDF/RM 210:2006) stellte die Cronobacter Screening (CSB)-Methode dar. Dabei wurde die selektive Anreicherung in CSB-Bouillon durchgeführt und anstelle des vorgeschriebenen chromogenen Selektivmediums (z.B. ESIA®-Agar) eine modifizierte Version des DFI-Agars (mDFI) verwendet (Iversen *et al.*, 2008a). Zur Identifizierung wurden ebenfalls verdächtige *Cronobacter* spp.-Kolonien auf CASO-Agar ausgestrichen und mittels vorgeschriebenen biochemischen Tests (z.B. kommerziell erhältlichen Testkits API® 20 E/ID 32E) endgültig identifiziert. Bei der CSB-Bouillon handelte es sich um eine Indikatorbouillon, welche die Säurebildung durch Fermentation von Saccharose mit einem Farbumschlag von violett nach gelb anzeigt. In einer Studie von Iversen *et al.* (2008b) zeigte die Verwendung der CSB-Bouillon im Vergleich mit den beiden kulturellen ISO-Verfahren (ISO/TS 22964: IDF/RM 210:2006), abhängig von dem verwendeten chromogenen Agar, eine 100%-ige Sensitivität für den Nachweis von allen *Cronobacter*-Spezies. Die CSB-Bouillon wurde allerdings in die aktuellen ISO Methode DIN EN ISO 22964:2017-08 (ISO, 2017) als obligatorisches selektives Anreicherungsmedium aufgenommen.

Eine weitere anerkannte Referenzmethode ist diejenige der US-amerikanischen Lebens- und Arzneimittelbehörde (U. S. Food and Drug Administration, FDA) und gilt nur für die USA. Bereits 1988 entwickelten Muytjens *et al.* (1988) die erste Methode für den quantitativen Nachweis von *Cronobacter* (*E. sakazakii*). Schon ein paar Jahre später erfolgte eine erste kleine Modifikation dieses Verfahrens durch Nazarowec-White & Farber (1997). Auf Basis dieser Methode wurde 2002 ein kulturelles Isolierungsverfahren zum Nachweis von *Cronobacter* spp. ausschließlich in Säuglingsnahrungsmitteln eingesetzt: Die sogenannte FDA-Methode der U. S. Food and Drug Administration "Isolation and Enumeration of *Enterobacter sakazakii* from Dehydrated Powdered Infant Formula" (FDA/CFSAN, 2002). Die FDA-Methode wird ausschließlich zur quantitativen Bestimmung von *Cronobacter* spp. in pulverförmigen Säuglingsnahrungsmitteln häufig eingesetzt (Friedemann, 2008). Die Methode beschreibt allerdings kein spezifisches Isolierungsverfahren für *Cronobacter* spp., sondern ist allgemein geltend für die Organismen der Familie der *Enterobacteriaceae*. Dieser quantitative Nachweis basiert auf dem most probable number (MPN)-Verfahren und erfolgt durch die Einwaage von 3 x 100 g, 3 x 10 g und 3 x 1 g Untersuchungsmaterial, das zunächst in sterilem Wasser gelöst und bei 36 °C über 24 h vorangereichert wird. Danach werden die Ansätze in selektive Enterobacteriaceae Enrichment (EE)-Bouillon übertragen und bei 36 °C über 24 h angereichert. Anschließend erfolgen Ausstriche auf ein für Enterobacteriaceae selektives

1 Einleitung

Festnährmedium (VRBG, Violet Red Bile Glucose-Agar) und nach einer Inkubation von 24 h bei 36 °C die Übertragung von fünf typischen Kolonien auf Trypton-Soja-Agar. Zur biochemischen Identifizierung der präsumtiven *Cronobacter* spp. -Kolonien werden meist die miniaturisierten Kits wie API® 20E/ID 32 E verwendet. Die FDA-Methode wurde inzwischen mit einem molekularbiologischen (PCR) Verfahren um einen weiteren Schritt ergänzt. Dabei wird Material aus der Voranreicherung parallel zur kulturellen Methode mittels einer real-time PCR untersucht (Seo & Brackett, 2005).

Eine neue Version der FDA-Methode wurde von Lampel & Chen (2009) erarbeitet und ist seit März 2012 Bestandteil der FDA *Bacteriological Analytical Manual*. Diese „neue FDA-Methode“ setzt sich aus einer Anreicherung der Probe im Verhältnis 1:10 in gepuffertem Peptonwasser, Zentrifugation (3000 × g, 10 min) von 4 x 40 ml, Resuspension der Pellets in je 200 µl phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) und einem anschließend kombinierten kulturellen (Ausstrich auf DFI-Agar und R&F®-ESPM-ESSM) und molekularbiologischen (PCR) Verfahren zusammen. Zur endgültigen Identifizierung werden von jedem Chromogen-Agar vorläufige *Cronobacter* spp.-Kolonien mittels Real-Time PCR und ID32E oder VITEK 2.0 untersucht (Chen *et al.*, 2012). Die kombinierte Verwendung von chromogenem Agar zusammen mit DNA-Sequenz-basierten Identifizierungstechniken hat zu einem besseren Nachweis und einer besseren Kontrolle von *Cronobacter* spp. beigetragen (Chen *et al.*, 2012, ISO 2017).

1.4.2 Identifizierungsmethoden

1.4.2 1 Biochemische Identifizierung

Biochemische Tests werden traditionell zur mikrobiellen Identifizierung auf Speziesebene verwendet. Die wichtigsten biochemischen Merkmale, die *Cronobacter* von eng verwandten Mikroorganismen insbesondere von solchen aus ähnlichen Materialien unterscheiden, wurden auch in der Studie zur taxonomischen Neueinstufung der Gattung *Cronobacter* verwendet (Tabelle 3). Zurzeit gibt es eine Vielzahl von kommerziell erhältlichen Kits für die Identifizierung von *Cronobacter* spp.-Isolaten, die auf einer Reihe von selektiven biochemischen Reaktionen basieren. Einige der bekanntesten sind API®20E, ID32E und VITEK 2.0 (Fa. Biomerieux). Die aktuell gültige ISO-Methode (ISO, 2017) empfiehlt nicht unbedingt die Verwendung bestimmter kommerzieller Kits, sondern stattdessen spezifische individuelle biochemische Tests. Die gängigen kommerziell erhältlichen Kits mit zentralisierten Datenbanken für *Enterobacteriaceae* haben eine geringe Zuverlässigkeit für *Cronobacter*. Ein großer Nachteil ist, dass einige dieser phänotypischen Kits die veraltete Nomenklatur in den Datenbanken haben, wobei einige den Organismus immer noch als *E. sakazakii* identifizieren. Durch die

Verwendung biochemischer Testpanels wie API®20E und ID32E sowohl in der ISO als auch in der FDA sind diese Methoden jedoch aus mehreren Gründen unzureichend und unzuverlässig geworden. Erstens basieren die beiden kommerziellen Kits subjektiv auf der visuellen Erkennung einer Farbveränderung beim Ablesen der Ergebnisse, wodurch die Identifizierung je nach untersuchtem Individuum variieren kann. Zweitens gibt es eine Diskrepanz zwischen den beiden Verfahren. In einer von Iversen *et al.* (2007b) durchgeführten Studie identifizierte die API®20E-Galerie beispielsweise nur 70 % der "*Cronobacter*"-Stämme positiv auf Speziesniveau als *E. sakazakii*, während die ID32E-Galerie 90 % der "*Cronobacter*"-Stämme auf Speziesebene als *E. sakazakii* identifizierte. Schließlich wurde die falsche Identifizierung von *Cronobacter*-Stämmen auch nach der Aktualisierung der API®20E- und ID32E-Datenbanken im Jahr 2015 fortgesetzt. Jackson & Forsythe (2016) stellten bei den biochemischen Untersuchungen von 250 *Cronobacter*-Isolaten fest, dass die Datenbanken für die kommerziellen API®ID20E- und ID32E-Kits nur 82,3% bzw. 43,2% zuverlässig waren. Bei der Bewertung des apiID20E-Schemas ergaben beispielsweise nur 82,3 % der "*Cronobacter*"-Stämme eine Übereinstimmung mit der neuen Version, während 90 % der Stämme eine Übereinstimmung mit der vorherigen Version ergaben. Die Bewertung von ID32E ergab auch, dass die früheren Versionen der ID32E-Datenbank 88,9 % der Stämme identifizieren konnten, die eine Übereinstimmung als *E. sakazakii* ergaben; bei Verwendung der aktualisierten Version der Datenbank sank dieser Prozentsatz jedoch auf nur 43,2 % (Jackson & Forsythe, 2016).

Darüber hinaus wurden bei der Verwendung von Vitek 2.0 fälschlicherweise die Stämme von *Enterobacter*, *Franconibacter* und *Siccibacter* spp. als *Cronobacter* identifiziert.

1.4.2.2 PCR basierte Identifizierungsverfahren

Aufgrund der Einschränkungen bezüglich biochemischen Identifizierungen wurde in den letzten Jahren eine Reihe von molekularen Methoden auf der Grundlage von DNA-Sequenzen zur Identifizierung von *Cronobacter* spp. entwickelt. Einige dieser Methoden bieten eine Alternative für die schnelle und spezifische Identifizierung.

Im Allgemeinen wird die partielle oder vollständige Länge der 16S rRNA-Gensequenz zur Spezies-spezifischen Identifizierung von *Enterobacteriaceae* verwendet. Für die Identifizierung von *Cronobacter*-Isolaten wurden verschiedene konventionelle PCR-Methoden einschließlich Real Time PCR entwickelt, die auf verschiedene Regionen des 16S rRNA-Gens abzielten (Lehner *et al.*, 2004; Hassan *et al.*, 2007, die vorgelegte Studie 6; Malorny & Wagner, 2005; Kang *et al.*, 2007).

1 Einleitung

Im Jahr 2006 wendeten Iversen *et al.* (2006) die 16S rDNA-Gensequenzen auf 282 Stämme von *Enterobacteriaceae* an, darunter 189 *E. sakazakii*-Isolate. Die Analyse der 16S rDNA-Daten zeigte, dass die *E. sakazakii*-Stämme vier Cluster-Gruppen bildeten (Iversen *et al.*, 2006). Darüber hinaus führten Iversen *et al.* (2007b) eine phylogenetische Analyse durch, die auf der Verwendung der 16S rDNA-Sequenz in voller Länge (mehr als 1300 bp) basierte. Das Ergebnis dieser Studie schlug die Neueinstufung der *E. sakazakii*-Gruppe in eine neue Gattung vor. Dennoch zeigten sich einige Einschränkungen, als die 16S rDNA-Technik auf eng verwandte Spezies wie *E. cloacae*, *E. hormaechei* und *E. asburiae* angewendet wurde. Darüber hinaus konnte die 16S rDNA-Gensequenz nicht zwischen *C. sakazakii* und *C. malonaticus* unterscheiden, da sie eine Ähnlichkeit von 99,7 % zwischen den beiden Spezies nachwies, so dass *C. malonaticus* als Subspezies von *C. sakazakii* angesehen wurde (Iversen *et al.*, 2007a).

Zusätzlich zu der 16S rRNA-Zielgensequenz steht auch eine ganze Reihe von konventionellen und real-time PCR Methoden oder multiplex PCR-Verfahren zur Verfügung, mit denen *Cronobacter* spp. auf Genus-, Spezies- und Serotypebene identifiziert werden können. Auch die „internegenic spacer-region“ (ISR) zwischen den 16S rRNA- und 23S rRNA-Genen in *Cronobacter* spp. wurde mit konventioneller PCR und Oligonukleotid-Arrays untersucht (Liu, Cai, *et al.*, 2006; Liu, Gao, *et al.*, 2006). Seo & Brackett (2005) entwickelten einen auf TaqMan-Sonden basierenden Real Time-PCR Assay für den Nachweis von *Cronobacter* spp. in Säuglingsanfangsnahrung, der auf das macromolecular synthesis operon abzielte, insbesondere auf die *rpsU*-Gene und das Primase (*dnaG*) Gen. Einige Methoden wurden vor der taxonomischen Überarbeitung von *Cronobacter* im Jahr 2007 entwickelt und basierten häufig auf Stammsammlungen, die die Vielfalt der Gattung *Cronobacter* nicht genau repräsentierten. Im Weiteren wurden sie nicht notwendigerweise anhand eng verwandter Stämme von *Franconibacter* und *Siccibacter* validiert. Jackson *et al.* (2015) untersuchten mit Hilfe von DNA-Sequenzmethoden (MLST und whole genom sequencing) die aus einem *Cronobacter*-Ausbruch isolierten Stämme, die ursprünglich mittels Phänotypisierung und einer *rpoB*-PCR als *Cronobacter*-Spezies identifiziert wurden, erneut und stellten fest, dass es sich bei den Stämmen um *E. hormaechei* und *E. cloacae* handelte.

Die Sequenzierung des äußeren Membranproteins A (*OmpA*) von *Cronobacter*, das eine wichtige Rolle bei der Invasion menschlicher Zellen spielt, wurde ebenfalls zu Identifizierungszwecken verwendet (Fei *et al.*, 2015). Nair & Venkitanarayanan (2006) entwickelten ein konventionelles PCR-System, das auf die Amplifizierung des *ompA* Gens abzielt. Die In-silico-Analyse des *ompA*-Gens anhand von etwa 187 *Cronobacter*-Genomen und 20 weiteren Genomen, die eng verwandte Bakterien repräsentieren, ergab, dass diese Methode zur Identifizierung aller *Cronobacter*-Spezies ausreicht (Jackson & Forsythe, 2016).

Einige PCR-Systeme wurden für die präsumtive Identifizierung von *Cronobacter*-Isolaten auf Genusebene zur Amplifizierung von den Zielgenen *cgcA* und *rpoB* entwickelt (Duaga & Breuwer, 2008; Lehner *et al.*, 2012; Stoop *et al.*, 2009). Allerdings fehlte *cgcA* in mindestens einem Sequenztyp von *C. sakazakii* (ST8) und führte daher zu falsch-negativen Ergebnissen (Jackson *et al.*, 2014).

Die β -Untereinheit des bakteriellen RNA-Polymerase kodierende Gens *rpoB* wird häufig für die PCR basierten Identifizierung von *Cronobacter*-Isolaten verwendet (Adekambi *et al.*, 2009; Stoop *et al.*, 2009). Stoop *et al.* (2009) entwickelten verschiedene Primerpaare auf der Grundlage der *rpoB*-Sequenzunterschiede von sechs der sieben *Cronobacter*-Spezies. Da die *rpoB*-Gensequenzen von *C. sakazakii* und *C. malonaticus* sehr ähnlich sind, wurde ein zweistufiges Verfahren vorgeschlagen, bei dem sowohl *C. sakazakii* und *C. malonaticus* Primerpaare für die erste Differenzierung verwendet werden. Lehner *et al.* (2012) schlugen ein zusätzliches Primerpaar für die spezies-spezifische Identifizierung von *C. condimenti* vor. Das Screening von *rpoB* ermöglichte eine einfachere und zuverlässigere Identifizierung als die Sequenzierung von 16S rRNA (Li *et al.*, 2012). Die Verwendung von *rpoB*-PCR führte in mehreren Fällen zu einer Fehlidentifizierung der *Cronobacter*-Spezies. Allerdings wurde berichtet, dass die Technik während eines Ausbruchs zu falsch-positiven Identifizierungen als *Cronobacter* führte (Jackson *et al.*, 2015). Einige in den Fällen von Neugeboreneninfektionen isolierten *E. cloacae* und *E. hormaechei*-Stämme wurden zuvor zum Teil aufgrund der verwendeten *rpoB* PCR fälschlicherweise als *C. sakazakii* identifiziert (Caubilla-Barron *et al.*, 2007; Flores *et al.*, 2011; Jackson *et al.*, 2015; Jackson *et al.*, 2016; Townsend *et al.*, 2008). Mit Hilfe von Pan-Genom-Microarray-Analyse wurde der durch *rpoB*-PCR identifizierte *C. sakazakii* Stamm (Sequenztyp ST6 und Serotyp Csak O:4) als *Citrobacter koseri* und der zuvor als *C. malonaticus*-Stamm (Cmal O:1) identifizierte als *C. universalis* reidentifiziert (Yan *et al.*, 2015).

Konventionelle End-point und Real time PCR-Methoden wurden zum Nachweis von *Cronobacter* spp. aus Umweltquellen, einschließlich pulverförmiger Säuglingsnahrung, angewendet. Die Nachweisverfahren für *gluA*, *rpoB*, *ompA* und *dnaJ* sind am umfassendsten evaluiert worden, weisen jedoch einige Einschränkungen auf, darunter die Nachweisgrenze (Hyeon *et al.*, 2010; Stoop *et al.*, 2009). Um diese Einschränkungen zu überwinden, wird die PCR häufig mit zusätzlichen Methoden kombiniert, die die Sensivität und Spezifität verbessern sollen, wie Kapillarelektrophorese mit laserinduzierter Fluoreszenz (CE-LIF) oder Immobilisierung mit Zirconiumhydroxid (Zhou *et al.*, 2008; Ruan *et al.*, 2013). Mit CE-LIF kann die Fluoreszenz bei 520 nm nachgewiesen werden, die durch eine Kombination aus SYBR Green I und DNA-Fragmenten erzeugt wird (Ruan *et al.*, 2013). Zur Verbesserung der Empfindlichkeit wurde Zirconiumhydroxid verwendet, um geringe Mengen von *C. sakazakii* in pulverförmiger Säuglingsnahrung vor der DNA-Extraktion und PCR-Analyse zu immobilisieren

(Zhou *et al.*, 2008). Kürzlich wurde ein Protokoll der dritten Generation der PCR, als Tröpfchen-Digital-PCR bezeichnet, mit einer Nachweisgrenze von 23 KbE/mL in Reinkultur entwickelt, um *Cronobacter* in Säuglingsnahrungsproben nachzuweisen und die Nachweiszeit auf 3 Stunden zu verkürzen (Lv *et al.*, 2021). Bei dieser Methode wird die Probe unter Verwendung eines verbesserten Propidium-Monoazids als Farbstoff in Tausende von kleineren Tröpfchen aufgeteilt, was die Amplifikation des Ziels auf Einzelmolekülebene ermöglicht und eine genauere und empfindlichere Detektion niedriger Pathogenmengen bietet.

Mittlerweile sind mehrere kommerzielle Kits zum Nachweis von *Cronobacter* spp. mittels Real-Time PCR auf dem Markt verfügbar, darunter: QuickBlue Realtime PCR DNA Kits (Bioanalytics); Neogen[®] Molecular Detection Assay 2 – Cronobacter (Neogen); BAX[®] System Cronobacter (Dupont Qualicon); HybriScan[®]-D Cronobacter spp. (ScanBec); Foodproof[®] Enterobacteriaceae plus Cronobacter Detection System (Biotecon Diagnostik); SureFast[®] Cronobacter sakazakii PLUS (r-biopharm); Assurance[®] GDS for Cronobacter Tq II (BioControl); Pathatrix[®] *Cronobacter* spp. Kit (Applied Biosystem); VIT[®] Cronobacter (Vermicon Identification Technology); Mericon *Cronobacter* spp. Kit (Qiagen); PATHfinder – Real-Time PCR kit for the detection of foodborne Cronobacter spp. (Generon); iQ-Check Cronobacter spp. PCR Detection Kit (BioRad); Real Time PCR Detection Kit Cronobacter spp. (Biopremier); GeneUp[®] Cronobacter (bioMérieux). Diese Kits bieten eine zuverlässige und effiziente Methode zur Detektion von *Cronobacter* spp. in verschiedenen Probenarten.

1.4.2.3 Enzym-Immuno-Assay-Methoden

Aufgrund des hohen apparativen und ggf. auch infrastrukturellen Aufwandes sowie des erforderlichen Einsatzes von hoch qualifiziertem Personal und den daraus resultierenden hohen Kosten durch kulturelle und molekularbiologische Nachweisverfahren, wurden alternative immunchemische Testsysteme zum Nachweis von *Cronobacter* beschrieben. Antikörper-basierte Verfahren wurden bislang jedoch nur vereinzelt beschrieben; dennoch wurden sensitivere und robustere Immunoassays für *Cronobacter* spp. entwickelt, darunter Sandwich-Assays, die zwei Antikörper verwenden.

Im Jahr 2009 wurde durch Hochel & Škvor (2009) ein auf polyklonalen Antikörpern (pAKs) basierendes indirektes EIA-Verfahren zum Nachweis von *C. sakazakii* mit einer Nachweisgrenze von ca. 10⁵ KbE/ml entwickelt. Allerdings reagierte nur einer von zwölf getesteten *C. sakazakii*-Stämmen positiv, sodass die Autoren eine Serotyp-Spezifität der hergestellten Kaninchen-Antiseren postulierten (Hochel & Škvor, 2009). Sandwich-Assays verbesserten auch die Nachweisgrenze für *C. sakazakii* in künstlich inokulierter Säuglingsanfangsnahrung im Vergleich zu indirekten ELISA-Assays (Park *et al.*, 2012; Xu *et*

al., 2014). Park *et al.* (2012) entwickelten zwei pAks (Fangantikörper: IgY aus dem Hühnerei, Detektionsantikörper: IgG aus dem Kaninchen) und etablierten damit ein Sandwich EIA-System für den Nachweis von *C. muytjensii*. Die Nachweisgrenze für zwei getestete Stämme, *C. muytjensii* ATCC 51329 und *C. muytjensii* CDC 3523-75, lag bei ca. 10^4 KbE/ml. Xu *et al.* (2014) beschrieben weitere immunochemische Testsysteme und etablierten einen auf polyklonalen Antikörpern (pAks) basierenden indirekten EIA für den Nachweis von *Cronobacter* spp. Mit einer Nachweisgrenze von ca. 10^5 KbE/ml war die Sensitivität vergleichbar mit der des von Hochel & Škvor (2009) entwickelten indirekten EIAs. Xu *et al.* (2014) verwendeten erstmals monoklonale Antikörper (mAks), um in Kombination mit pAks einen Sandwich-EIA für den spezifischen Nachweis von *C. sakazakii* zu entwickeln. Bei den vier getesteten Stämmen lag die Nachweisgrenze mit bis zu 2×10^4 KbE/ml etwas niedriger als bei den indirekten EIA-Verfahren. Kleinsteuber (2015) generierte und charakterisierte mehrere, teilweise serotypspezifische mAks gegen *C. sakazakii* und *C. turicensis* und legte damit die Grundlage für die Entwicklung hochempfindlicher und spezifischer immunochemischer Nachweisverfahren. In indirekten EIA-Verfahren konnten *C. sakazakii*-Stämme vom Serotyp Csak O:1 im Bereich von 10^5 - 10^7 KbE/ml nachgewiesen werden. Für den *C. turicensis*-Serotyp Ctur O:1 lag die Nachweisgrenze bei ca. 10^4 KbE/ml. Für *Cronobacter* spp. stehen solche immunochemischen Nachweisverfahren kommerziell nicht zur Verfügung (bis zur Veröffentlichung dieser Arbeit).

PCR-erzeugte Amplifikate können mittels immunochromatographische Teststreifen nachgewiesen werden, was die Notwendigkeit der Gelelektrophorese eliminiert (Zhao *et al.*, 2013). In dieser Methode wird die Nukleinsäure zunächst über PCR amplifiziert, wobei der Vorwärtsprimer mit Biotin und der Rückwärtsprimer mit Digoxigenin markiert wird. Die amplifizierte DNA wird dann auf den immunochromatographischen Teststreifen aufgetragen, wobei das biotinmarkierte Ende mit einem Kohlenstoff-Neutravidin-Konjugat und das digoxigeninmarkierte Ende mit einem Anti-Digoxigenin-Antikörper interagiert. Ein positiver immunochromatographischer Teststreifen zeigt das Auftreten von zwei grau-schwarzen Linien in beiden Testzonen an.

1.4.2.4 MALDI-TOF MS

Die auf der Erkennung von Proteinmustern basierende Matrix-unterstützte Laserdesorptions-Ionisations-Flugzeit-Massenspektrometrie (matrix assisted laser desorption ionisation-time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS) hat in den letzten Jahren als alternatives Identifizierungs-/Bestätigungsverfahren für *Cronobacter* spp. weite Verbreitung gefunden (Pavlovic *et al.*, 2011). Mittels MALDI-TOF MS können *Cronobacter* spp. sowohl auf Genus- als auch Speziesebene sicher, zuverlässig und schnell identifiziert werden (Stephan *et al.*,

2010). Ein auf diesem Nachweisprinzip basierendes Verfahren wurde auch zur Untersuchung von Säuglingsanfangsnahrung eingesetzt. Javrková *et al.* (2012) und Lu *et al.* (2014) testeten die MALDI-TOF MS zur Identifizierung von *Cronobacter* spp.-Isolaten aus Säuglingsanfangsnahrung und Produktionsumfeldern im Vergleich zu kulturellen Methoden und zeigten, dass die Anwendung der MALDI-TOF MS für den Nachweis von *Cronobacter* spp. in pulverförmiger Säuglingsnahrung eine gute Methode ist. In einer weiteren Vergleichsarbeit von Zhu *et al.* (2011) wurde MALDI-TOF MS im Hinblick auf die Identifizierung von *Cronobacter* spp. unter nahverwandten *Enterobacteriaceae* ebenfalls als eine schnelle und eindeutige Methode beschrieben. Karamonová *et al.* (2013) untersuchten in einer Studie zur Differenzierung von *Cronobacter* spp. auf Biotyp-Ebene mittels MALDI-TOF MS 300 individuelle Spektren von 19 *C. sakazakii*-Stämmen und etablierten eine Referenzdatenbank für acht *C. sakazakii*-Biotypen. In einer Studie stellten Wang *et al.* (2017) fest, dass die auf MALDI-TOF MS basierende Identifizierung von *Cronobacter*-Isolaten vergleichbar mit den 16S rRNA-Gen-Sequenzdaten war. In einer weiteren Langzeitstudie über einen Zeitraum von neun Jahren untersuchten Wang *et al.* (2019) *Cronobacter*-Isolate aus nach Peking importierten Lebensmitteln mittels MALDI-TOF MS und MLST-Analyse und stellten fest, dass die auf MALDI-TOF MS basierende Analyse schnell und präzise war, jedoch nicht konsistent genug für die Subtypisierung im Gegensatz zu MLST. Im Hinblick auf die Identifizierung auf Speziesebene zeigten Cetinkaya *et al.* (2013) in einer Studie anhand von zwei *Cronobacter*-Isolaten die Diskrepanz zwischen MALDI-TOF MS einerseits und 16S rRNA- und *fusA*-Gen-Sequenzanalyse andererseits. Ein wesentlicher Nachteil der MALDI-TOF MS liegt vor allem in der Anzahl der vorhandenen Spektren in den Referenzdatenbanken. Um eine Reproduzierbarkeit der spezies-spezifischen Massenspektren zu gewährleisten, ist jedoch eine hohe Standardisierung der Methodik erforderlich. Insbesondere ist für eine sichere Differenzierung auf Speziesebene eine zuverlässige und umfassende Referenzdatenbank mit allen Spezies der Gattung *Cronobacter* essentiell (Carvalho *et al.*, 2020; Alatoon *et al.*, 2011; Bizzini *et al.*, 2011; Wieser *et al.*, 2012).

1.5 Typisierung von *Cronobacter*-Isolaten

Die Typisierung von *Cronobacter*-Isolaten ist über phänotypische oder genotypische Merkmale möglich, wozu jeweils eine Reihe von unterschiedlichen Methoden etabliert ist. Ein häufig zitiertes, phänotypisches Klassifizierungsmerkmal bei *Cronobacter* ist der jeweilige Biotyp (Farmer, 1980; Iversen *et al.*, 2008a). Nachteilig dabei ist, dass nicht alle *Cronobacter* spp. anhand der verfügbaren Reaktionen biotypisierbar sind. Die Diversitätsindizes sind bei dieser Methode entsprechend niedrig (Joseph *et al.*, 2013a; Joseph *et al.*, 2013b). Speziell unter epidemiologischen Gesichtspunkten gilt diese Typisierungsmethode als unzureichend sensitiv

(Baldwin *et al.*, 2009). In den letzten Jahren wurden anhand der Verfügbarkeit kompletter Genomsequenzen der einzelnen *Cronobacter* spp.-Stämme vermehrt genotypische Typisierungsmethoden für die Differenzierung und Charakterisierung von *Cronobacter* spp. entwickelt. Obwohl es inzwischen eine große Anzahl von Identifizierungs- und potenziellen Differenzierungsmethoden in der Fachliteratur gibt, können hier nur einige Methoden im Detail behandelt werden. Diese wurden in erster Linie aufgrund ihres potenziellen oder derzeitigen großflächigen Einsatzes ausgewählt.

1.5.1 Biotypisierung anhand von phänotypischen Tests

Die Biotypisierung von *Cronobacter*-Isolaten mit Hilfe phänotypischer Tests geht zurück auf Farmer *et al.* (1980), die eine Reihe von biochemischen Tests zur Definierung von 15 Biotypen von *E. sakazakii* beschrieben, und Iversen *et al.* (2006), die einen 16. definierten Biotyp hinzufügten. Die phänotypischen Testparameter waren die Voges-Proskauer-Reaktion, Methylrot, Nitratreduktion, Ornithinverwertung, Motilität bei 37°C, Säureproduktion aus Inositol, Säureproduktion aus Dulcitol, Indolproduktion, Malonatverwertung und Gasproduktion aus Glukose (Table 2). Diese Daten dienten als Grundlage für die 2007 durchgeführte taxonomische Revision des früheren *E. sakazakii* in die Gattung *Cronobacter*, die damals aus sechs Species *C. sakazakii* (Biotypen 1-5, 7-9, 11, 13 und 14), *C. turicensis* (Biotypen 16, 16a und 16b), *C. mytjensii* (Biotyp 15), und *C. dublinensis* (Biotypen 6, 10 und 12) bestand. Bei der taxonomischen Überarbeitung 2008 wurden die Biotypen 5, 9 und 14 von *C. sakazakii* in *C. malonaticus* umbenannt (Iversen *et al.*, 2008a). Es folgerte daraus, dass *C. sakazakii*-Stämme kein Malonat metabolisierten. Der einzige biochemische Test konnte nicht verwendet werden um zwischen den beiden Spezies zu unterscheiden (siehe Tabelle 2). Die verbesserte Speziation von Stämmen mit Hilfe von DNA-Sequenzierungsmethoden zeigte, dass der frühere Ansatz der Biotypisierung schwerwiegende Fehler aufweist, da nicht mehr als 50 % der Stämme korrekt einer *Cronobacter*-Spezies zugeordnet werden können (Joseph *et al.*, 2013a, 2013b). Diese ist zum Teil auf die anfängliche Verwendung von Biotyp-Index-Stämmen zurückzuführen, die der falschen *Cronobacter*-Spezies zugeordnet wurden (Baldwin *et al.*, 2009). In der Folge wurde der Biotypisierungsansatz als unzuverlässig für die Speziation angesehen und nicht weiter als für die Rückverfolgung mikrobieller Quellen geeignet angesehen.

1.5.2 O-Antigen-Serotypisierung

Die Kapsel von *Cronobacter* wie anderen *Enterobacteriaceae* setzt sich aus bis zu fünf Strukturen zusammen: O-Antigen, K-Antigen, Colansäure, Cellulose und dem

1 Einleitung

Enterobacteriaceae common antigen (Ogrodzki & Forsythe, 2015, 2017). Das O-Antigen, auch bekannt als Lipopolysaccharid (LPS), ist in der äußeren Membran verankert und wird für die klassische Serotypisierung der Bakterien verwendet. Bei gramnegativen Bakterien befindet sich LPS in der äußeren Zellwand und besteht aus drei Abschnitten: *i*) dem Lipid-A-Anker, der in die äußere Membran eingebettet ist, *ii*) dem Kern-Oligosaccharid aus ungewöhnlichen Monosacchariden wie 2-Keto-3-desoxyocanoat (Kdo), das an das Lipid A gebunden ist, und *iii*) aus dem äußeren Kern, der eine Kette von sich wiederholenden Oligo-Polysaccharid-Einheiten (O-PS) enthält. Bei *Cronobacter* ist das LPS eines der wenigen Strukturmerkmale, das untersucht wurde. Das O-PS setzt sich aus verschiedenen verzweigten und unverzweigten Polymeren zusammen (Czerwicka *et al.*, 2010; Czerwicka *et al.*, 2013). Bei *Enterobacteriaceae* sind die für die Biosynthese der O-Antigen-Region kodierenden Gene am *rfb*-Lokus angesiedelt, der von den Genen *galF* und *gnd* flankiert wird. Es wurden verschiedene Serotypisierungsverfahren unter Verwendung von PCR-Primern für diese Gene sowie In-silico-Profilung entwickelt.

Das auf PCR-Sonden basierende O-Serotypisierungsschema wurde für alle sieben *Cronobacter*-Spezies entwickelt (Blažková *et al.*, 2015; Jarvis *et al.*, 2011; Mullane *et al.*, 2008; Sun *et al.*, 2011, 2012). Bei dem Fragmentlängen-Polymorphismus (RFLP)-Verfahren handelt es sich um eine Long Range PCR, bei der das dadurch erhaltene PCR-Amplifikat (Größenbereich 9,8-14,8kbp) wird anschließend mit dem Enzym *MbolI* geschnitten. Die entstandenen DNA -Fragmente werden dann durch Agarosegelelektrophorese getrennt und die zufälligen RFLP-Bindungsmuster können weiter analysiert werden. Diese Methode wurde durch anfängliche falsche Speziesidentifizierung und Diskrepanzen zwischen den ursprünglichen Protokollen beeinträchtigt.

Einige weitere PCR basierten Methoden wurden auch zur Differenzierung der *Cronobacter*-Serotypen verwendet. Jarvis *et al.* (2011) und Sun *et al.* (2012) entwickelten eine spezifische PCR-Amplifizierungen der O-Antigen-Flippase- bzw. Polymerase kodierenden Genabschnitte *wzx* und *wzy*. Yan *et al.* (2015) schlugen ein harmonisiertes Schema von 14 Serotypen vor, das 6 *Cronobacter*-Arten, aber nicht *C. condimentii* abdeckt. Anschließend identifizierten Blažková *et al.* (2015) mit modifizierten Primern weitere Serotypen anhand ihrer Bandenmuster.

Das auf PCR-Sonden basierende Typisierungsschema ist aktuell nicht vollständig, da eine große Anzahl von *Cronobacter*-Stämmen (bis zu 20 %) unter Verwendung der derzeitigen PCR-Systeme noch nicht serotypisiert werden kann (Yan *et al.*, 2015). Die Mehrheit der Serotypen (60 % der Gattung) sind *C. sakazakii* Csak O:1 und Csak O:2, daher bietet die Serotypisierung keine Unterscheidung zwischen einem bedeutenden Teil der Isolate. Darüber hinaus folgt das O-Antigen nicht der Phylogenie, da derselbe Serotyp bei verschiedenen

Cronobacter-Spezies und anderen *Enterobacteriaceae* wie *Citrobacter koseri*, *Franconibacter pulveris* und *E. coli* nachweisbar ist. Beispielsweise, wurden bei *C. universalis* die Serotypen Csak O:7 und Cmal O:1 nachgewiesen (Shashkov *et al.*, 2015).

Die für das *wzx* Screening von Jarvis *et al.* (2011) beschriebenen PCR-Primer konnten nicht zwischen den *Cronobacter*-Spezies unterscheiden. Beispielsweise amplifizierten die gleichen Primerpaare die *wxy*-Genabschnitte für *C. malonaticus* Cmal O:1 und *C. turicensis* Ctur O:1, sowie für *C. sakazakii* Csak O:3 und *C. muytjensii* Cmuyt O:1. Aufgrund der initialen Fehlidentifizierung der Isolate und einiger Diskrepanzen zwischen den Mullane-, Jarvis- und Sun-Schemata wurden einige ursprüngliche Serotypen bei einer erneuten Analyse anderen Spezies zugeordnet. Zum Beispiel sollte *C. sakazakii* Serotyp Csak O:5 entweder *C. turicensis* Ctur O:3 oder *C. malonaticus* Cmal O:3 sein, und *C. sakazakii* Csak O:6 sollte *C. malonaticus* Cmal O:2 sein (Ogrodzki & Forsythe, 2015).

Derzeit erfordern die PCR-Methoden eine vorherige Spezies-Identifizierung von *Cronobacter*-Isolaten, um die geeigneten PCR-Primerpaare auszuwählen, wobei insgesamt 15 Primerpaare zur Serotypisierung der 6 der 7 *Cronobacter* Spezies benötigt werden. Folglich muss vor der Serotypisierung die Spezies der *Cronobacter* Isolate bestimmt werden, danach kann die Serotypisierung mit den entsprechenden PCR-Primerpaaren durchgeführt werden. Im Gegensatz dazu wird bei einigen anderen Typisierungsmethoden die Speziation gleichzeitig erreicht. Es besteht eine gewisse Korrelation zwischen Sequenztyp und Serotyp, wobei *C. sakazakii* pathovar CC4 häufig der Serotyp Csak O:2 oder Csak O:4 ist. Allerdings kommen diese beiden Serotypen in über 45 Sequenztypen vor. Trotz der häufigen Verwendung der PCR-Sonden-basierten Serotypisierung ist die Methode dennoch nicht sehr diskriminierend und liefert nur 24 Serotypen für die gesamte *Cronobacter*-Gattung, von denen nur 5 zu dem wichtigsten *Cronobacter* Spezies *C. sakazakii* gehören (Tabelle 3). In Abschnitt 1.5.7 wurden die Gene, die für das LPS kodieren, als genomische von Kucerova *et al.* (2010) und von Joseph *et al.* (2012) als genomisch variable Regionen mittels Ganzgenomsequenzierung und vergleichender Analyse hervorgehoben.

1.5.3 Multilocus Sequence Typing

Seit 1998 werden zur Identifizierung von Bakterien mehrere *housekeeping*-Gene verwendet, wie z. B. das Multilocus Sequence Typing (MLST). Das MLST beruht auf dem Nachweis von Allelvariationen in den analysierten Genen (Maiden, 1998). Prinzipiell werden dabei Unterschiede in den Nucleotidsequenzen der ausgewählten *housekeeping*-Gene erfasst. Haushaltsgene kommen im Genom von allen Bakterienspezies vor. Da sich Haushaltsgene über die Zeit sehr wenig verändern, ist das MLST eine robuste und reproduzierbare Methode,

1 Einleitung

die häufig für epidemiologische Studien verwendet wird. Jedes Haushaltsgen eines Isolates wird mittels PCR amplifiziert und das entstandene Produkt vorwärts und rückwärts sequenziert. Der aus beiden Sequenzierungen übereinstimmende Teil wird für die Auswertung genutzt. Die Fragmentlänge von meist 400-500 bp kann sicher von einem einzelnen Primerpaar erreicht werden und ermöglicht eine gute Auflösung (Maiden, 1998). Die verschiedenen Allele eines *housekeeping*-Gens werden in der MLST aufsteigend nummeriert und jedes unterschiedliche Allel bekommt eine fortlaufende Nummer. Die Allele der verschiedenen *housekeeping*-Gene werden in der MLST als Einheit betrachtet und bilden das Allelprofil eines Isolats. Jedes Allelprofil bekommt abschließend einen Sequenztyp (ST) zugewiesen, der ebenfalls fortlaufend nummeriert wird und alle Isolate mit identischem Allelprofil repräsentiert. Die Kombination der numerischen Allelvarianten der verschiedenen MLST-Gene zu einem siebenstelligen Zahlencode ergibt einen bestimmten Sequenztyp, der über eine kuratierte Internethomepage ermittelt werden kann.

Baldwin *et al.* (2009) konstruierten ein spezifisches MLST-Schema für *Cronobacter* zunächst für die Unterscheidung zwischen *C. sakazakii* und *C. malonaticus*, die anhand der 16S rDNA-Sequenzanalyse nicht differenziert werden konnten. Derzeit können mittels des etablierten MLST-Systems alle Stämme der *C. sakazakii*, *C. malonaticus*, *C. turicensis*, *C. dublinensis*, *C. muytjensii*, *C. condimenti*, und *C. universalis* sicher bis auf Ebene der Genospezies differenziert werden. Dieses Schema basiert auf sieben *housekeeping*-Genen, ATP synthase b chain (*atpD*), elongation factor G (*fusA*), glutaminylt RNA synthetase (*glnS*), glutamate synthase large subunit (*gltB*), DNA gyrase subunit B (*gyrB*), translation initiation factor IF-2 (*infB*) und phosphoenolpyruvate synthase A (*ppsA*).

Die Auswahl dieser Gene beruhte auf mehreren Kriterien. Es wurde davon ausgegangen, dass diese Gene für vermeintliche "Housekeeping"-Produkte kodieren, die für biologische Funktionen bei der DNA-Reparatur, Replikation und Aminosäurebiosynthese erforderlich sind. Um sicherzustellen, dass jeder Locus genetisch unverbunden ist, wurden die ausgewählten Gene so weit wie möglich über das bakterielle Chromosom verteilt. Darüber hinaus wurden alle Gene ausgeschlossen, die einem größeren selektiven Evolutionsdruck ausgesetzt sein könnten, wie etwa mutmaßliche Virulenzfaktoren oder mobile Elemente (Baldwin *et al.*, 2009).

Die Auswahl der sieben *housekeeping*-Gene wurde durch eine phylogenetische Analyse von Gesamtgenomsequenzen bestätigt (Joseph *et al.*, 2012). Die durch das sieben-Loci-Schema erstellte *Cronobacter*-Phylogenie stimmte mit der Analyse der Gesamtgenomsequenzierung der Gattung überein (Forsythe *et al.*, 2014; Joseph, *et al.*, 2012; Joseph & Forsythe, 2012).

Die zusammenverknüpften Sequenzen der sieben MLST-Haushaltgene ergaben ein Contig mit einer Länge von 3036 Nukleotiden. Dies ist sechsmal so lang wie die der üblicherweise

1 Einleitung

verwendeten partiellen 16S rDNA-Sequenzen und hat den zusätzlichen Vorteil einer größeren Anzahl variabler Loci (Forsythe, 2018).

Das derzeitige 7-Loci-MLST-Schema bietet eine frei zugängliche Datenbank für die internationale Standardisierung über www.pubMLST.org/Cronobacter. Auf der Homepage der Datenbank finden sich auch die Protokolle und die aktuell empfohlenen Primersequenzen, die seit Joseph *et al.* (2012) leicht geändert wurden. Die ursprünglichen Primer basierten auf den Genomsequenzen von nur drei Stämmen und waren verständlicherweise nicht so effizient wie der überarbeitete Satz. Zum aktuellen Zeitpunkt (letzter Zugriff im Juli 2024) enthält die Datenbank über 4186 *Cronobacter*-Stämme mit mehr als 1662 kompletten Genomdaten und mehr als 1662 definierten MLST-Profilen. Zu Vergleichszwecken sind auch die MLST-Profile und Genome von eng verwandten Organismen, *Franconibacter*, *Siccibacter*, *Enterobacter* und *Citrobacter*, in der Datenbank enthalten, da diese anfällig für eine Fehlidentifizierung als *Cronobacter* sind (Forsythe, 2018). Das Schema kann auch je nach Bedarf der Untersuchungsziele erweitert werden, beispielsweise weitere Haushalt- oder Virulenz-bezogenen Genen wie *cgcA*, *cpa*, *zpx*, *rpoB* und *ompA*-Allel Sequenzen. Tabelle 6 gibt einen Überblick über die aktuellen Datenbankeinträge (letzter Zugriff im Juli 2024). Die *Cronobacter*-Stämme stammten aus 46 Ländern, wobei das älteste Isolat aus dem Jahr 1950 stammte (Masood *et al.*, 2013). Die Häufigkeit der einzelnen MLST-Sequenztypen variiert, einige sind weit verbreitet, und andere haben geringes Vorkommen. Solche häufigen Sequenztypen werden in der Regel über mehrere Jahre und aus verschiedenen Quellen und geografischen Orten isoliert. Es gibt ein breites Spektrum an aufgelisteten Quellen. Die meisten Stämme, die aus Umwelt- (einschließlich Säuglingsnahrungs- und Milchpulverproduktionsanlagen; 15,5 %), Lebensmitteln (39,7 %) und klinischen Quellen (12,5 %) isoliert wurden, sind bis heute die häufigste Spezies *C. sakazakii* (71,2 %), gefolgt von *C. malonaticus* (11 %) (Tabelle 6).

Die erzeugten MLST-Daten wurden bei epidemiologischen Untersuchungen und bei Studien zur Pathogenität, Populationsbiologie und Evolution von Bakterien eingesetzt (Maiden, 1998; Joseph & Forsythe, 2012). Ein MLST-Typisierungsschema wird sowohl für epidemiologische als auch für Umweltuntersuchungen von *Cronobacter* benötigt und erfordert zwangsläufig den direkten Vergleich von Isolaten zwischen Laboratorien in der ganzen Welt. Folglich sind standardisierte, auf DNA-Sequenzen basierende Methoden, die von einer zentralisierten Datenbank unterstützt werden, besser geeignet, da sie einen direkten und eindeutigen Vergleich zwischen Isolaten ermöglichen, die an verschiedenen Orten typisiert wurden (Forsythe, 2018).

Das MLST-Schema für *Cronobacter* hat sich als die effektivste, umfassendste und robusteste Typisierungsmethode für diesen Organismus erwiesen. Einige der wichtigsten Verbesserungen, die aus der MLST-Analyse resultieren, sind die Definition der neuen

Cronobacter Spezies *C. universalis* und *C. condimenti* (Joseph *et al.*, 2012) sowie die Erkennung bestimmter Pathovaren: *C. sakazakii* CC4 in Verbindung mit neonataler Meningitis, *C. sakazakii* ST12, *C. malonaticus* CC7 (Forsythe *et al.*, 2014; Hariri *et al.*, 2013; Joseph & Forsythe, 2011; Ogrodzki & Forsythe, 2017). Dabei handelt es sich um klonale Linien sogenannte "clonale Complex", die mit bestimmten klinischen Manifestationen assoziiert sind: *C. sakazakii* CC4 mit Fällen von neonataler Meningitis, *C. sakazakii* ST12 mit nekrotisierender Enterokolitis und *C. malonaticus* CC7 mit Infektionen bei Erwachsenen (Forsythe *et al.*, 2014; Hariri *et al.*, 2013; Joseph & Forsythe, 2011).

Der Begriff "clonale Complex" (CC) umfasst genetisch verwandte, aber nicht identische Stämme. Die gemeinsame Definition sind Sequenztypen, die sich durch 1 bis 3 von 7 Loci unterscheiden. *C. sakazakii* CC1 ist ein dominanter CC, der aus Stämmen besteht, die über einen Zeitraum von mehr als 25 Jahren aus der ganzen Welt isoliert wurden. Diese Isolate stammen hauptsächlich aus Säuglingsnahrungsmitteln sowie aus klinischen Fällen und in jüngerer Zeit aus Milchpulververarbeitungsbetrieben in Australien und Deutschland (Craven *et al.*, 2010, Jacobs *et al.*, 2011). *C. sakazakii* CC4 ist ein Schlüssel-CC in Bezug auf die Epidemiologie von *Cronobacter* spp. bei Neugeboreneninfektionen (Baldwin *et al.*, 2009, Forsythe *et al.*, 2014). Das früheste Isolat (*C. sakazakii* NCIMB 8282) aus Milchpulver aus dem Jahr 1950 wurde genomisch sequenziert und der erste Ausbruch von *C. sakazakii* CC4 und ST12 auf einer neonatalen Intensivstation wurde von Masood *et al.* (2013, 2015) auf Genomebene untersucht. Warum *C. sakazakii* CC4 bei Fällen von neonataler Meningitis vorherrscht ist unklar, könnte aber sowohl auf Fitnessfaktoren in der Umwelt als auch auf Virulenzmerkmale zurückzuführen sein. Es ist plausibel, dass Erkrankungsfälle bei Erwachsenen aufgrund der Reife der Blut-Hirn-Schranke nicht auftreten. *C. sakazakii* CC4-Stämme wurden weltweit aus Säuglingsnahrung (Muytjens *et al.*, 1988) und Milchpulverherstellungsbetrieben isoliert und stellen daher möglicherweise eine besonders persistente klonale Variante dar, die zu einer erhöhten neonatalen Exposition führt (Craven *et al.*, 2010; Jacobs *et al.*, 2011; Müller *et al.*, 2013; Power *et al.*, 2013; Sonbol *et al.*, 2013). *C. sakazakii* ST12 wurde mit Fällen von nekrotisierender Enterokolitis (13 % der Stämme) und nicht mit neonataler Meningitis oder Septikämie in Verbindung gebracht (Masood *et al.*, 2015, van Acker *et al.*, 2001).

Die Sequenzen der Datenbank können frei heruntergeladen und für Studien über bakterielle Populationen und die Verwandtschaftsbestimmungen weiter analysiert werden. Außerdem können mit Hilfe von Online-Programmen wie MEGA, Splittree und GoeBURST phylogenetische und minimal spanning trees erstellt werden (Huson & Bryant, 2006). Mit GoeBURST wird der zentrale Genotyp für klonale Komplexe ermittelt.

1 Einleitung

Darüber hinaus hat sich das 7-Loci-MLST-Schema als zuverlässig und robust erwiesen, nachdem es mit dem 53-Loci-Ribosomen-MLST (rMLST) und dem 1865-Loci-Kerngenom-MLST (COG-cgMLST) verglichen wurde (Forsythe *et al.*, 2014). Daher wurde die Technik verwendet, um das Wissen über die Vielfalt und Evolution von *Cronobacter* zu erweitern (Joseph & Forsythe, 2012; Joseph *et al.*, 2012). Eine verfeinerte Typisierung erfolgt unter Verwendung der gesamten Genomsequenz, einschließlich des ribosomalen MLST (53 Loci), des Kerngenom-MLST (1836 Loci) und des CRISPR-Cas-Gen-Array-Profils (clustered regularly interspersed short palindromic repeat). Diese Methoden werden durch eine frei zugängliche Datenbank (<http://pubmlst.org/cronobacter>) unterstützt, die eine internationale Zusammenarbeit und Überwachung ermöglicht. Die Analyse von Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP) kann ebenfalls angewandt werden, wenn das gesamte Genom der Stämme verfügbar ist. Typisierungsschemata sind sowohl für epidemiologische als auch für Umweltuntersuchungen von *Cronobacter* erforderlich und erfordern zwangsläufig den direkten Vergleich von Isolaten zwischen Laboratorien in der ganzen Welt. Folglich sind standardisierte, auf DNA-Sequenzen basierende Methoden, die durch eine zentralisierte Cronobacter MLST-Datenbank unterstützt werden, besser geeignet, da sie einen direkten, uneingeschränkten Vergleich zwischen Isolaten, die an verschiedenen Orten typisiert wurden, ermöglichen (letzter Zugriff im Juli 2024).

1 Einleitung

Tabelle 6: Zusammenfassung der *Cronobacter*-Isolate in der *Cronobacter*-PubMLST-Datenbank (Aktualisierte Fassung vom Juli 2024 zu Ogrodzki & Forsythe, 2017)

Spezies	Anzahl der Stämme (%)	Anzahl der ST ^a	Anzahl der Genome	Erstisolierung	Anzahl der Länder	Vorkommenshäufigkeit %				
						Klinische Proben	Säuglingsnahrung	Lebensmittel/ LM-Zusätze	Umwelt	Sonstige
<i>C. sakazakii</i>	2979 (71,2%)	521	1231	1950	42	13,2	20,0	39,7	20,1	6,6
<i>C. malonaticus</i>	459 (11,0%)	155	142	1973	24	20,5	9,6	50,8	10,2	8,1
<i>C. dublinensis</i>	280 (6,7%)	177	90	1956	14	1,8	5,3	65,5	38,3	2,5
<i>C. turicensis</i>	181 (4,3%)	97	71	1970	18	9,9	6,1	37,6	33,2	13,3
<i>C. muytjensii</i>	83 (2,0%)	44	27	1988	15	0,0	8,4	61,4	4,8	23,9
<i>C. universalis</i>	24 (0,6%)	17	10	1956	8	12,5	0,0	54,2	20,8	12,5
<i>C. condimenti</i>	5 (0,1%)	1	3	2010	4	0,0	0,0	100	0,0	0,0
Gesamt ^b	4186	1012	1662		46	19,4	11,7	27,5	29,4	12,0

^aSequenztyp; ^bProzentual/ Summarisch für die Gattung

1.5.4 *fusA*-Allele-Sequenzierung

Das *fusA*-Gen, das für den Elongationsfaktor G kodiert, ist ein Haushaltsgen (Housekeeping-Gen). Die phylogenetische Analyse des *fusA*-Allels zeigte, dass das *fusA* Allel mit der Phylogenie der Gattung *Cronobacter* übereinstimmte (Joseph *et al.*, 2012). Es wurde in die konventionellen 7-Loci-Multilokus-Sequenztypisierungsschema für *Cronobacter* (Abschnitt 1.5.3) integriert. Die MLST-Datenbank enthält derzeit 208 definierte Sequenzvarianten. Innerhalb der verwendeten 7-MLST-Haushaltsgene zeigte sich keines der *fusA*-Allelprofile für zwei oder mehrere *Cronobacter*-Spezies identisch. Daher kann die Analyse dieses Haushaltsgens zur Identifizierung der *Cronobacter*-Isolaten verwendet werden (Forsythe, 2018).

1.5.5 *rpoB*-Allele-Sequenzierung

Das *rpoB*-Gen kodiert für die β -Untereinheit der bakteriellen RNA-Polymerase. In den letzten Jahren wurden mehrere *rpoB*-PCR-Sonden für die Speziesdifferenzierung mittels RFLP und auch für phylogenetische Analysen der Gattung *Cronobacter* entwickelt (Alsonosi *et al.*, 2015; Fei *et al.*, 2015; Jackson *et al.*, 2014; Strydom *et al.*, 2011; Vlach, *et al.*, 2017). Angesichts der konservierten Natur des *rpoB*-Gens wurde die Sequenz auch zur Differenzierung der eng verwandten Bakterienspezies insbesondere *Enterobacteriaceae* verwendet. Obwohl das *rpoB*-Gen nicht im konventionellen 7-Loci-MLST Schema für *Cronobacter* enthalten ist, wird die Sequenzierung des *rpoB*-Allels durch die *Cronobacter* MLST-Datenbank unterstützt. Zum Zeitpunkt der Erstellung dieses Berichts (im Juli 2024) waren 131 Sequenzvarianten für die gesamte Gattung in der Datenbank hinterlegt. Diese Sequenzen wurden entweder durch Laboranalysen nach Amplifikation des *rpoB*-Gens oder durch In-silico-Analysen ganzer Genomsequenzen erzeugt.

1.5.6 Makrorestriktionsfragmentanalyse mittels Pulsfeld Gelelektrophorese

Die Makrorestriktionsfragmentanalyse mittels Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) gilt derzeit gemeinhin als der Goldstandard bei den Typisierungsverfahren. Nachteilig ist, dass dieses Verfahren im Vergleich zu anderen Methoden sehr arbeits-, zeit- und kostenintensiv ist. In den letzten Jahren wurde die PFGE-Methode im Hinblick auf die Infektionsepidemiologie für die betriebsinterne Aufklärung von Eintrags- bzw. Kontaminationsquellen für *Cronobacter* spp. in lebensmittelproduzierenden Betrieben eingesetzt (Mullane *et al.*, 2007, 2008; Iversen *et al.*, 2009; Miled-Bennour *et al.*, 2010). Darüber hinaus werden PFGE-Methoden häufig zur Klärung der genetischen Verwandtschaft von klinischen Isolaten (Clark *et al.*, 1990; Nazarowec-White & Farber, 1999; Block *et al.*, 2002) und Isolaten aus Säuglingsfertiernahrung, Weichkäse,

verschiedenen Kategorien von verzehrfertigen Lebensmitteln, landwirtschaftlichen und häuslichen Umgebungen, Nutztieren, Trockenmilch und verwandten Produkten verwendet (Mullane *et al.*, 2007; Baumgartner *et al.*, 2009; El-Sharoud *et al.*, 2008 und 2009; Mullane *et al.*, 2008; Proudly *et al.*, 2008; Hein *et al.*, 2009; Molloy *et al.*, 2009; Craven *et al.*, 2010; Miled-Bennour *et al.*, 2010; Müller *et al.*, 2013; Cui *et al.*, 2014; Pan *et al.*, 2014). Ein gemäß PulseNet standardisiertes Protokoll für die PFGE-Genotypisierung von *Cronobacter* spp. wurde von einer internationalen Forschergruppe entwickelt und validiert (Brenji *et al.*, 2012).

1.5.7 Ganzgenomsequenzierung

Die Analyse des vollständigen Genoms der *Cronobacter*-Stämme ermöglicht neben der Klärung taxonomischen Beziehungen eine detaillierte Charakterisierung sowie Identifizierung von Virulenz- und Antibiotikaresistenzgenen (Parra-Flores *et al.*, 2022). In den letzten Jahren hat die Ganzgenomsequenzierung (Whole Genom Sequencing) ermöglicht, umfassende Profilierungen und Genotypisierungen, wie z.B. Multilocus-Sequenztypisierung (MLST), durchzuführen. Dadurch ist eine vollständige Analyse des Pathogeneseprozesses von *C. sakazakii* möglich und präzisere epidemiologische Verbindungen können hergestellt werden (Joseph & Forsythe, 2012; Fei *et al.*, 2015; Parra-Flores *et al.*, 2021). Die FDA startete 2012 ein Pilotprogramm „*GenomeTrackr*“, das darauf abzielte, eine Datenbank mit genomischer Sequenzinformation und begleitenden Metadaten (geografischer Standort, Quelle und Datum) aufzubauen, um Lebensmittel-, Umwelt- und klinische Isolate zu charakterisieren und potenzielle Ausbrüche in nahezu Echtzeit zu identifizieren (FDA, 2022). Derzeit sind fünfunddreißig *Cronobacter*-Genomsequenzen im National Centre for Biotechnology Information (NCBI) verfügbar. Nur fünf *Cronobacter*-Genome wurden vollständig sequenziert oder abgeschlossen, darunter die Genome von *C. sakazakii* ATCC®BAA-894, ES15 und SP291, *C. turicensis* z3032 (LMG 23827) sowie *C. malonaticus* CMCC 45402 (Kucerova *et al.*, 2010; Stephan *et al.*, 2011; Shin *et al.*, 2012; Yan *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2014).

1.5.8 DNA-Microarray

Die DNA-Microarray-Technologie wurde zur Genotypisierung von *Cronobacter* spp. angewendet. Healy *et al.* (2009) führten initial eine mikroarray-basierte Analyse von *Cronobacter* spp. durch, bei der 276 open reading frames aus *C. sakazakii* ATCC®BAA-894 verwendet wurden, um artspezifische Gene zu identifizieren, die als Kandidatenmarker für ein molekularbasiertes Nachweisprotokoll bewertet werden könnten. Nach der vollständigen Sequenzierung des Genoms von *C. sakazakii* ATCC®BAA-894 konstruierten Kucerova *et al.*

1 Einleitung

(2010) einen Oligonukleotid-Microarray mit 387.000 Sonden, um das Pan-Genom von *Cronobacter* unter Verwendung von fünf der sieben *Cronobacter* spp. zu identifizieren.

Ein maßgeschneiderter Pan-Genom-Microarray wurde von Tall *et al.* (2015) für die Identifizierung und Profilierung von *Cronobacter*-Isolaten entwickelt. Der Microarray enthält über 21.402 einzigartige Gene (470.844 Sonden) sowohl chromosomale als auch Plasmidgebundene Gene der 7 *Cronobacter* spp. sowie mehr als 2000 virulenzbezogene Gene. Der Microarray ist in der Lage, phänotypische Merkmale bei bestimmten *Cronobacter* spp. zu unterscheiden, wie z. B. die Nutzung von Malonat und Myoinositol durch *C. dublinensis*-Stämme, sowie Variationen in kodierten Fimbrien und Phagencluster (Kucerova *et al.*, 2010; Tall *et al.*, 2015). Der Array konnte die eng verwandten Organismen *Franconibacter* und *Siccibacter* von *Cronobacter* differenzieren. Der Pan-Cronobacter-Genom-Microarray wurde für die Erstellung von Profilen von *Cronobacter*-Isolaten aus vier Produktionsanlagen eingesetzt (Yan *et al.*, 2015).

2 Konzeption dieser Arbeit und Liste der verwendeten Publikationen

2.1 Konzeption dieser Arbeit

Zum Erlangen der profunderen Einblicke in die Diversität innerhalb der Gattung *Cronobacter* spp. wurden neben kulturellen Analysen auch vergleichende Untersuchungen zur phänotypischen und genotypischen Variabilität von aus unterschiedlichen pulverförmigen Säuglingsnahrungsmitteln und getrockneten Lebensmitteln gewonnenen *Cronobacter* spp.-Stämmen sowie nahverwandter Mikroorganismen durchgeführt, um systematische Fragestellungen zur aktuellen Reklassifizierung der Erreger zu klären. Zudem wird die Entwicklung molekularbasierter Schnellnachweisverfahren für *Cronobacter* spp., insbesondere in Säuglingsnahrungsmitteln, auf Basis der gewonnenen Erkenntnisse behandelt. Ein wesentlicher Bestandteil der Zielsetzung der hier dargestellten Studien ist es, Erkenntnisse über das Ausmaß und die Verbreitung von diesem Bakterium entlang der Lebensmittelkette zu gewinnen. Die dargestellten Studien können als Grundlage für erstmals zusammenhängende Fragen zum Speziesvorkommen sowie zur intra- und interspezifischen Variabilität einzelner *Cronobacter*-Spezies in unterschiedlichen Lebensmitteln genutzt werden. Dies ist besonders wichtig, um das Gesundheitsrisiko für empfindliche Bevölkerungsgruppen, wie Säuglinge, Kleinkinder und ältere Menschen, besser einschätzen zu können. Solche Daten sind notwendig, um das mögliche Risiko für gefährdete Verbrauchergruppen zu bewerten und tragen zur sinnvollen Entscheidungsfindung für die Entwicklung von Minimierungsstrategien zur Verbesserung der Lebensmittelsicherheit bei.

Die in dieser Arbeit zusammengestellten wissenschaftlichen Veröffentlichungen tragen zu zwei bedeutenden Themenfeldern bei.

Die Arbeiten im ersten Abschnitt befassen sich mit Untersuchungen zum Vorkommen und zur Speziesvielfalt von *Cronobacter* spp. in diversen Säuglingsnahrungsmitteln und getrockneten Lebensmitteln. Die Studie 1 stellt das Vorkommen von *Cronobacter* spp. in Säuglingsnahrungsmitteln dar und vergleicht diverse *Cronobacter*-Stämme, die seit mehreren Jahren aus verschiedenen Säuglingsnahrungsmittelprodukten des deutschen Marktes als *E. sakazakii* isoliert wurden. Ziel war es, das Speziesvorkommen und systematische Fragestellungen zur Reklassifizierung der Erreger zu klären, sowie intra- und interspezifische Variabilität einzelner Stämme näher zu charakterisieren und die genomischen Determinanten der gewonnenen Isolate vorzustellen. Die anschließende Studie 2 hatte zum Ziel, die Lebensmittelsicherheit von Getreidebeikostprodukten für Säuglinge und Kleinkinder in Bezug auf mikrobiologische Qualität und die Kontamination mit Mykotoxinen zu untersuchen. Dies ist die erste Analyse von Getreidebeikostprodukten vom deutschen Markt. Dabei wurden sowohl unspezifische Hygieneindikatoren und spezifische pathogene oder enterotoxinbildende Bakterien als auch diverse Mykotoxine berücksichtigt. Eine weitere Studie 3 schließt diesen

2 Konzeption dieser Arbeit und Liste der verwendeten Publikationen

Abschnitt ab. Ziel dieser Studie war es, weitere lebensmittelhygienisch relevante Fragestellungen in Bezug auf die mikrobiologische Beschaffenheit von Trockenteigwaren zu klären, insbesondere das Vorkommen von *Cronobacter* spp. Bezüglich einer Kontamination von Getreidemahlerzeugnissen standen bis zur Veröffentlichung dieser Studie keine umfassenden Untersuchungen zur Vorkommenshäufigkeit von *Cronobacter* spp. zur Verfügung. Die Fähigkeit dieser Bakterien, unter trockenen Bedingungen zu überleben, unterstreicht die Notwendigkeit einer gründlichen Untersuchung der Kontamination von trockenen Teigwaren. Im Rahmen der Studie 4 wurden Untersuchungen zum Vorkommen von *Enterobacteriaceae* in Säuglingsnahrungsprodukten von indonesischen und malaysischen Herstellern auf der Ebene der angebotenen Fertigprodukte beschrieben. Dies ist der erste Bericht über die Kontamination von dehydrierter Säuglingsnahrung mit *E. sakazakii* und anderen potenziell opportunistischen Erregern wie *Escherichia coli*, *Escherichia hermanii*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, *Citrobacter* spp., *Serratia* spp. und *Pantoea* spp.

Im zweiten Abschnitt werden zwei Studien vorgestellt, die die Entwicklung und Etablierung von molekularbasierten Schnellnachweisverfahren von *Cronobacter* spp. in Säuglingsnahrungsmitteln beschreiben. In der ersten Studie (Studie 5) wird die Entwicklung und Etablierung eines neuartigen Nukleinsäure-Lateral-Flow-Immunoassay (NALFIA)-Systems für die beiden pathogenen *Cronobacter*-Spezies *C. sakazakii* und *C. malonaticus* auf der Basis der Amplifizierung des spezies-spezifischen Abschnittes vom *rpoB*-Gen in Gegenwart einer heterobifunktionalen DNA-Sonde vorgestellt. Im Mittelpunkt des entwickelten Systems steht der Nachweis der partiellen Degradierung der integrierten DNA-Sonde während der PCR-Amplifizierung, die anschließend durch Lateral-Flow-Immunoassay nachgewiesen wird. Die weitere Studie (Studie 6) berichtet über die Entwicklung einer Genus-spezifischen PCR-Methode auf der Basis der Amplifizierung von gattungsspezifischen Abschnitten des 16S rRNA Gens.

2.2 Liste der verwendeten Publikationen

2.2.1 Vorkommen und Typisierung der *Cronobacter* spp. in Säuglingsnahrungsmitteln und Lebensmitteln

Studie 1: Akineden, Ö., Heinrich, V., Gross, M., Usleber, E., 2017.

Reassessment of *Cronobacter* spp. originally isolated as *Enterobacter sakazakii* from infant food. *Food Microbiology*, 65:44-50. Doi: 10.1016/j.fm.2017.01.021

Studie 2: Rehagel, C., Akineden, Ö., Usleber, E., 2022.

2 Konzeption dieser Arbeit und Liste der verwendeten Publikationen

Microbiological and mycotoxicological assessment of processed cereal-based complementary foods for infants and young children from the German market. *Journal of Food Science*, 87:1810-1822. Doi: 10.1111/1750-3841.16106.

Studie 3: Akineden, Ö., Murata, K. J., Gross, M., Usleber, E., 2015.

Microbiological Quality of Raw Dried Pasta from the German Market, with Special Emphasis on *Cronobacter* Species. *Journal of Food Science*, 80: M2860-M2867. Doi: 10.1111/1750-3841.13117.

Studie 4: Estuningsih, S.; Kress, C., Hassan, A.A.; Akineden, Ö., Schneider, E., Usleber, E., 2006.

Enterobacteriaceae in dehydrated powdered infant formula manufactured in Indonesia and Malaysia. *Journal of Food Protection*, 69:3013-3017. Doi: 10.4315/0362-028X-69.12.3013.

2.2.2 Entwicklung von molekularbasierten Schnellnachweisverfahren von *Cronobacter* spp. in Säuglingsnahrungsmitteln

Studie 5: Akineden, Ö., Wittwer, T., Geister, K., Plötz, M., Usleber, E., 2020.

Nucleic acid lateral flow immunoassay (NALFIA) with integrated DNA probe degradation for the rapid detection of *Cronobacter sakazakii* and *Cronobacter malonaticus* in powdered infant formula. *Food Control*, 109:106952. Doi: 10.1016/j.foodcont.2019.106952.

Studie 6: Hassan, A. A., Akineden, Ö., Kress, C., Estuningsih, S., Schneider, E., Usleber, E., 2007.

Characterization of the gene encoding the 16S rRNA of *Enterobacter sakazakii* and development of a species-specific PCR method. *International Journal of Food Microbiology*, 116:214-220. Doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2006.12.011.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Vorkommen und Typisierung der *Cronobacter* spp. in Säuglingsnahrungsmitteln und Lebensmitteln

Studie 1: Akineden, Ö., Heinrich, V., Gross, M., Usleber, E., 2017.

Reassessment of *Cronobacter* spp. originally isolated as *Enterobacter sakazakii* from infant food. *Food Microbiology*, 65:44-50. Doi: 10.1016/j.fm.2017.01.021

Ziel der vorliegenden Studie war es, die Kontaminationssituation von Säuglingsanfangsnahrung aus dem deutschen Markt mit *Cronobacter* auf Speziesebene für die Jahre vor und um die Zeit, als die Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 in Kraft trat, retrospektiv zu klären. Zu diesem Zweck wurden neben molekularbiologischen Analysen auch Untersuchungen zur phänotypischen und genotypischen Variabilität von *Cronobacter* spp. sowie nahe verwandter Mikroorganismen durchgeführt, um insbesondere systematische Fragestellungen in Bezug auf die neue taxonomische Reklassifizierung der Erreger beantworten zu können. Derzeit umfasst die Gattung *Cronobacter* sieben anerkannte Spezies, aber nur Stämme von drei Spezies, *C. sakazakii*, *C. malonaticus* und *C. turicensis*, wurden häufig mit klinischen Infektionen in Verbindung gebracht. *C. sakazakii* und *C. malonaticus*-Stämme sind für die Mehrheit der Infektionskrankheiten bei Säuglingen verantwortlich (Joseph *et al.*, 2012) und scheinen die häufigsten *Cronobacter*-Spezies in Säuglingsanfangsnahrung weltweit zu sein (Yang *et al.*, 2016). Für Deutschland waren bis zur Veröffentlichung dieser Studie keine Daten zur Verteilung der Spezies innerhalb der Gattung *Cronobacter* in Säuglingsanfangsnahrung verfügbar.

Vor Inkrafttreten der Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 wurde *Cronobacter* spp. mit erheblicher Häufigkeit in Säuglingsanfangsnahrung vom deutschen Markt gefunden, und bis zu 30% in Anschlussnahrung (Kress *et al.*, 2005). In den letzten Jahren wurden jedoch Warnungen bezüglich *Cronobacter* in Säuglingsanfangsnahrung und Markt-Rücknahmen zu einem –wenn auch- seltenen Ereignis in Deutschland. Seit 2012 wurde keine Warnungen oder Rücknahmen mehr im „Schnellwarnsystem für Lebensmittel und Futtermittel“ der Europäischen Kommission (RASFF; <https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/>) veröffentlicht. Ebenso wurde bis zur Veröffentlichung dieser Studie noch kein Bericht über eine durch *Cronobacter* spp. aus Säuglingsanfangsnahrung aus dem deutschen Markt verursachte Säuglingserkrankung veröffentlicht, obwohl weltweit weiterhin sporadisch schwere Infektionen, insbesondere bei Neugeborenen, gemeldet wurden und werden (CDC, 2012). Das Problem der Fehlidentifikation von *Cronobacter* spp., insbesondere in Studien, die auf phänotypischen

3 Ergebnisse und Diskussion

Merkmale basieren, wurde kürzlich diskutiert (Jackson *et al.*, 2015). *Cronobacter* spp. wurden häufig nicht nur aus Säuglingsanfangsnahrung, sondern auch aus Umweltproben, Wasser, Pflanzenmaterial und verschiedenen Lebensmitteln isoliert (Akineden *et al.*, 2015, die vorgelegte Studie 3; Baumgartner *et al.*, 2009; Chap *et al.*, 2009; Friedemann, 2007; Vojkowska *et al.*, 2016). Zudem wurden sie an verschiedenen Stellen und auf Geräten in Säuglingsanfangsnahrungsverarbeitungsanlagen nachgewiesen (Craven *et al.*, 2010; Fei *et al.*, 2015; Iversen *et al.*, 2009; Jacobs *et al.*, 2011).

Diese Aspekte werfen die Frage auf, ob die Kontaminationssituation von Säuglingsanfangsnahrung mit *Cronobacter* spp. in Deutschland anders ist oder war als in anderen Ländern, und ob sie sich im letzten Jahrzehnt verändert hat. Um diese Frage zu beantworten, ist es notwendig, die Situation hinsichtlich der dominierenden Spezies in den Jahren zu untersuchen, in denen das *Cronobacter*-Problem in Säuglingsanfangsnahrung zu einem rechtlichen Thema wurde. Zunächst war es erforderlich, die Kontaminationssituation von Säuglingsanfangsnahrung auf dem deutschen Markt mit *Cronobacter* spp. retrospektiv zu klären. Dazu wurden 80 *Cronobacter*-Isolate, die in den Jahren 2003 bis 2006 als *E. sakazakii* aus verschiedenen deutschen Säuglingsnahrungsmitteln isoliert worden waren, mit aktuellen Identifikationsmethoden neu bewertet. Diese Methoden umfassten *fusA*-Sequenzierung, multilokus-Sequenztypisierung (MLST), Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) und O-Antigen-Serotypisierung. Die phylogenetischen Beziehungen der *rpoB*- und *fusA*-Gene dieser Isolate wurden analysiert.

Nach erneuter Kultivierung zeigten alle 80 untersuchten Isolate die gleichen charakteristischen Eigenschaften wie bei der ursprünglichen Identifikation als *E. sakazakii*. Sie wuchsen als grünblaue Kolonien (positive α -Glucosidase-Reaktion) auf Druggan-Forsythe-Iversen (DFI)-Agar und produzierten ein gelbes Pigment auf Casein-Soja-Pepton (CASO)-Agar. Zusätzliche biochemische Tests ermöglichten die Einordnung aller Isolate in fünf verschiedene Biogruppen nach dem Schema von Farmer (1980) und Iversen *et al.* (2006) (Tabelle 2, Studie 1). Die Isolate wiesen eine starke Biogruppen-Diversität auf; die Biogruppen 1, 2, 5, 8 und 9 waren jeweils mit zwei oder mehr Isolaten vertreten. Laut Biotyp-Profilung wurden die meisten Isolate ($n = 70$) als präsumptive *C. sakazakii* identifiziert, einschließlich der Biotypen 1, 2, 8 und 8a. Die restlichen 10 Isolate wurden alle als präsumptive *C. malonaticus* identifiziert, die die Biotypen 5 und 9 umfassen. Biochemische Panels sind jedoch nicht ausreichend, um *Cronobacter*-Isolate korrekt zu differenzieren (Baldwin *et al.*, 2009; Jackson und Forsythe, 2016), weshalb zur weiteren Identifikation molekulare Methoden verwendet wurden.

Die spezies-spezifischen PCRs nach Stoop *et al.* (2009)- die auf die variable Region der beta-Untereinheit des RNA-Polymerase-kodierenden Gens (*rpoB*) abzielen-, welche zuvor zur Identifizierung und Differenzierung der Gattung *Cronobacter* verwendet wurden (Stoop *et al.*,

3 Ergebnisse und Diskussion

2009; Vlach *et al.*, 2017), konnten nicht zuverlässig zwischen den beiden *C. sakazakii* und *C. malonaticus* unterscheiden. Mit dieser Methode wurden drei Isolate (DB-33a, DB-38a und (DB)55b/04) fälschlicherweise als *C. malonaticus* identifiziert, da die Sequenzierung des partiellen *rpoB*-Gens dieser drei Isolate eine 100%ige Sequenz-Homologie mit den *C. malonaticus*-Primersequenzen ergab. Eine hohe Sequenz-Homologie zwischen *C. sakazakii* und *C. malonaticus* wurde auch von anderen Veröffentlichungen berichtet (Akineden *et al.*, 2015, die vorgelegte Studie 3; Baldwin *et al.*, 2009; Jackson *et al.*, 2014). Kürzlich berichteten Vlach *et al.* (2017) über ein PCR-RFLP-System basierend auf dem *rpoB*-Gen, das die Spezifität erhöhte und eine Differenzierung zwischen *C. sakazakii* und *C. malonaticus* ermöglichte. Jedoch erforderte diese Methode separate Verdauungsschritte mit drei verschiedenen Restriktionsendonukleasen, gefolgt von einer elektrophoretischen Trennung, was die Analyse sehr aufwändig machte. Jede einzelne Restriktionsendonuklease bot nur begrenzte Spezifität, und es wurden nur wenige *C. malonaticus* getestet. Daher sind weitere Studien erforderlich, um diesen Ansatz zu validieren.

Zur endgültigen Identifikation der Isolate wurde eine Analyse mittels *fusA*-Sequenzierung durchgeführt, die mit der gesamten Genom-Phylogenie korrelierte und eine weitere Möglichkeit zur Differenzierung zwischen *Cronobacter*-Spezies bietet (Akineden *et al.*, 2015, die vorgelegte Studie 3; Joseph *et al.*, 2012). Die *fusA*-Allele von 80 Isolaten wurden mit denen der *Cronobacter*-Typ- und -Referenzstämme in der MLST-Datenbank (www.pubMLST.org/cronobacter) verglichen. Dies erwies sich als geeignete Methode zur eindeutigen Differenzierung zwischen den einzelnen Spezies (Abb. 1). Durch die Kombination des phylogenetischen Baums basierend auf den *fusA*-Gen-Sequenzen (438 Nukleotide) und unter Verwendung des Maximum-Likelihood-Algorithmus wurden 73 Isolate als *C. sakazakii* gruppiert, während sieben Isolate mit *C. malonaticus* gruppiert wurden. Im Vergleich zur vorläufigen Identifikation mittels biochemischer Methoden und zur *rpoB*-Gen-Analyse war die Verwendung von *fusA* besonders wichtig für die korrekte Identifikation von *C. malonaticus*. Jedes der drei Isolate, die nach der Biotypisierung (DBM2, DB-31a und DB-211a/3-06) und nach der *rpoB*-Gen-Analyse (DB-33a, DB-38a und (DB)55b/04) fälschlicherweise als *C. malonaticus* zugewiesen wurden, wurde durch die *fusA*-Gen-Analyse als *C. sakazakii* reklassifiziert. Diese Ergebnisse bestätigen frühere Studien, die zeigten, dass die korrekte Speziesidentifikation von *Cronobacter* spp. nicht trivial ist (Jackson & Forsythe, 2016; Jackson *et al.*, 2014). Es war bemerkenswert, dass keines der Isolate zu einer der fünf anderen *Cronobacter*-Spezies gehörte. Dies deutete stark darauf hin, dass die Kontaminationssituation von Säuglingsanfangsnahrung in Deutschland in den Jahren 2003 bis 2006 von *C. sakazakii* und gelegentlich von *C. malonaticus* dominiert wurde. Dies ist umso wichtiger angesichts der Zutatenliste der Folgenahrung, aus der die Isolate stammten. Mehrere dieser Zutaten sind bekannte Quellen für andere *Cronobacter* spp., als *C. sakazakii* oder *C. malonaticus*.

3 Ergebnisse und Diskussion

Beispielsweise können Trockengemüse und Getreideprodukte *C. turicensis* enthalten (Akineden *et al.*, 2015, die vorgelegte Studie 3; Turcovský *et al.*, 2011; Vojkovska *et al.*, 2016). Die absolute Dominanz von *C. sakazakii* und *C. malonaticus* stimmte jedoch mit ähnlichen Studien über *Cronobacter*-Isolate aus Säuglingsanfangsnahrungsprodukten und Produktionsumgebungen überein (Miled-Bennour *et al.*, 2010; Müller *et al.*, 2013; Yan *et al.*, 2015).

Die klonale Diversität beider Spezies, wie durch PCR-Serotypisierung, MLST und PFGE-Analyse bestimmt, war sehr hoch. Bezüglich der PCR-Serotypisierung konnten *C. sakazakii*-Isolate fünf Serotypen (SO1, SO2, SO3, SO4 und SO7) zugeordnet werden, am häufigsten Serotypen SO1 und SO2. Keines der Isolate gehörte zu den Serotypen SO5 oder SO6, für die Blažková *et al.* (2015) vorgeschlagen hatten, dass sie aufgrund einer offenbar falschen anfänglichen Speziesidentifikation durch Sun *et al.* (2012) *C. malonaticus* MaO3 und MaO2 zugeordnet werden sollten. Von den sieben *C. malonaticus*-Isolaten konnten sechs Isolate dem Serotyp MaO1 und ein Isolat dem Serotyp MaO2 zugeordnet werden. Mit dieser Dominanz des Serotyps MaO1 standen die Ergebnisse in dieser Studie für *C. malonaticus*-Serotypen im Widerspruch zu früheren Befunden (Blažková *et al.*, 2015), wonach der Serotyp MaO2 in klinischen Fällen vorherrschte. Die MLST-Cronobacter-Webdatenbank listete zum Zeitpunkt der Veröffentlichung dieser Studie (ohne unsere Isolate) 52 Isolate von *C. malonaticus*-Serotyp MaO2 und nur 6 Isolate mit Serotyp MaO1. Die meisten dieser Stämme wurden jedoch nur aus zwei Ländern, der Tschechischen Republik (klinische Isolate) und China (Verzehrfertige Lebensmittel), beschrieben. Da die öffentliche Datenbank relativ wenige Einträge für *C. malonaticus* aus noch weniger Quellen beinhaltete, könnte ihr die Repräsentativität fehlen und daher möglicherweise noch nicht das vollständige Bild in Bezug auf die Serotypverteilung in Säuglingsnahrung widerspiegeln. Eine weitere Erklärung könnte sein, dass unterschiedliche Lebensräume verschiedene *Cronobacter*-Serotypen begünstigen könnten. In dieser Arbeit isolierte 6 MaO1-Stämme stammten alle aus komplexen Produkten, einschließlich Milch-Getreidemischungen mit Früchten, probiotischer Folgemilch und Apfelmus für Säuglinge. Schließlich hat Deutschland eine weitgehend autarke Säuglingsnahrungsindustrie, und alle Produkte, die MaO1 enthielten, stammten aus inländischer Produktion. Regionale Unterschiede oder spezifische Produktionsbedingungen könnten daher einen Einfluss auf die vorherrschenden Arten und Serotypen haben, die in den Produktionsprozess von Säuglingsnahrung gelangen.

Die Bestimmung des O-Antigen-Serotyps besitzt für die Spezies-Identifikation eine begrenzte Bedeutung, da sie nicht mit der gesamten Genom-Phylogenie der Gattung korreliert (Joseph *et al.*, 2012) und in jedem Serotyp mehrere Sequenztypen vorkommen, wie in der *Cronobacter* MLST-Datenbank angegeben. Allerdings kann die Serotypisierung als Kriterium für

3 Ergebnisse und Diskussion

antikörperbasierte Nachweismethoden hilfreich sein (Scharinger *et al.*, 2016) und möglicherweise in Zukunft wichtige Informationen über Wirt-Pathogen-Interaktionen liefern.

MLST, das für 26 ausgewählte Isolate durchgeführt wurde, zeigte ebenfalls einen hohen Grad an Heterogenität zwischen den Isolaten; insgesamt wurden 16 verschiedene MLST-Sequenztypen (ST) identifiziert (Abb. 2, Studie 1). Der am häufigsten vorkommende *C. sakazakii*-Sequenztyp war ST1 mit sechs Isolaten, die aus verschiedenen Produkten und von verschiedenen Herstellern stammten (Tabelle 1, Abb. 2, Studie 1). Zwei Isolate (DB-258/1-05 und DB-73a/2-05), die aus zwei verschiedenen Proben stammten, waren *C. sakazakii* ST4, ein hochvirulenter Sequenztyp, der mit der Mehrheit der Cronobacter-Meningitis-Fälle in Verbindung gebracht wird (Joseph & Forsythe, 2011). Zwei weitere Isolate (DB-372/2k-06 und DB-376/2e-06) wurden *C. sakazakii* ST108 zugeordnet, das ebenfalls zum klonalen Komplex 4 gehört. Letztere zwei Isolate stammten aus zwei verschiedenen Proben mit einem empfohlenen Fütterungsalter von Geburt an. Innerhalb der Gattung *Cronobacter* scheinen Isolate, die zum klonalen Komplex 4 gehören, eine evolutionäre Linie darzustellen, die mit neonataler Meningitis verbunden ist (Joseph & Forsythe, 2011). Dies impliziert, dass die Kontamination deutscher Produkte mit *Cronobacter*-Stämmen des kritischsten Typs im Zeitraum 2003 bis 2006 keine Seltenheit war. Es ist daher bemerkenswert, dass bis zum Zeitpunkt der Veröffentlichung dieser Arbeit noch nie ein Fall einer *Cronobacter*-bedingten Infektion bei Säuglingen in Deutschland gemeldet worden war. Zur Untersuchungszeit waren nur sehr wenige *Cronobacter*-Stämme aus Deutschland in der MLST-Datenbank hinterlegt, und nach unserem besten Wissen war dieser Bericht der erste, der Details über das Vorhandensein von *C. sakazakii*-Stämmeklonaler Komplex 4 (ST4 und ST108) in Säuglingsnahrungs-Proben aus Deutschland lieferte. Die anderen in dieser Studie charakterisierten Isolate gehörten zu seltenen Sequenztypen (ST20, ST23, ST33, ST40, ST64, ST83, ST248, ST249, ST263). Diese sind in der MLST-Datenbank durch Stämme vertreten, die aus Lebensmitteln sowie aus Umwelt- oder klinischen Proben isoliert wurden. Fünf *C. malonaticus*-Isolate, die durch MLST analysiert wurden, konnten vier verschiedenen Sequenztypen zugeordnet werden (ST7, ST60, 2x ST211, ST441). Im Vergleich zu *C. sakazakii* ist die relative Bedeutung von *C. malonaticus* als Krankheitsverursacher weitgehend unklar. Allerdings wurde ein *C. malonaticus*-Stamm (ST112) aus dem Blut eines weniger als einen Monat alten Säuglings isoliert, der an einer fulminant verlaufenden Meningitis verstarb (Hariri *et al.*, 2013).

Die weitere molekulare Typisierung durch PFGE zeigte ebenfalls eine hohe genotypische Vielfalt; für die meisten Isolate (72/80) konnten individuelle PFGE-Profile erhalten werden (Abb. 2). Die Kombination aller Ergebnisse aus allen Methoden ermöglichte eine klare und konsistente Unterscheidung zwischen den beiden Arten *C. sakazakii* und *C. malonaticus* durch Analyse des *fusA*-Gens, jedoch war die Heterogenität der Isolate innerhalb jeder Spezies

3 Ergebnisse und Diskussion

ebenfalls bemerkenswert. Die hohe Vielfalt von *Cronobacter* spp., die durch Biotypisierung, Serotypisierung und MLST festgestellt wurde, spiegelte sich auch in der PFGE-Typisierung wieder. Obwohl in den meisten Fällen ein einzigartiges PFGE-Profil den Isolaten einer individuellen Säuglingsnahrungsquelle zugeordnet werden konnte, wurde auch ein „Überschneiden“ identischer PFGE-Profile für Isolate aus verschiedenen Produkten desselben Herstellers beobachtet. Zum Beispiel hatten die Isolate (DB)36a-04, (DB)42a-04 und DB-32c, die aus drei verschiedenen Produktverpackungen desselben deutschen Herstellers (C) stammten, identische PFGE-Profile (P16). Obwohl dies wahrscheinlich ein relativ seltenes Vorkommnis ist, haben auch Craven *et al.* (2010) identische PFGE-Klone von *Cronobacter* spp. in verschiedenen Milchpulverchargen derselben Fabrik gefunden, was die Möglichkeit einer innerbetrieblichen Verbreitung von *Cronobacter* anzeigt.

Die starke Heterogenität von *Cronobacter* spp. wurde auch dadurch demonstriert, dass die ursprünglich aus derselben Probe stammenden Isolate unterschiedlichen PFGE-Profilen angehörten. In Kombination mit der Biotyp-Gruppierung wurde die Vielfalt der Isolate noch komplexer. Zum Beispiel konnten drei Isolate aus einer Probe wie folgt identifiziert werden: a) *C. sakazakii* Biotyp 1, Serotyp SO2, PFGE-Typ P54 (DB-143a-8-05), b) *C. sakazakii* Biotyp 2, Serotyp SO3, PFGE-Typ P38 (DB-143b-6-05), und c) *C. malonaticus* Biotyp 2, Serotyp MaO1, PFGE-Typ P71 (DB-143c-7-05). Dies deutete darauf hin, dass eine Co-Kontamination von Säuglingsnahrung mit mehreren *Cronobacter* spp. mit unterschiedlichen genetischen und biochemischen Eigenschaften ziemlich häufig war. Das Vorhandensein von Isolaten unterschiedlicher Biotypen und Genotypen in derselben Probe legt nahe, dass die Kontamination wahrscheinlich während des Herstellungsprozesses aus verschiedenen Quellen erfolgte (Terragno *et al.*, 2009). Darüber hinaus werden die Ergebnisse der vorliegenden Studie durch die Ergebnisse von Iversen *et al.* (2009) unterstützt, die 27 Klone von *Cronobacter* in einer säuglingsnahrungsproduzierenden Fabrik isolierten und durch andere Studien, die zeigen, dass *Cronobacter* weit verbreitet in der Lebensmittelverarbeitungsumgebung vorkommt (Craven *et al.*, 2010; Fei *et al.*, 2015; Jacobs *et al.*, 2011; Yan *et al.*, 2015).

Nach Inkrafttreten der europäischen Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 für *Cronobacter* in Säuglingsanfangsnahrungsmitteln am 1. Januar 2006 war *Enterobacter sakazakii* im Jahr 2006 noch die zweithäufigste *Enterobacteriaceae*-Art in Säuglingsanfangsnahrung vom deutschen Markt, obwohl die meisten Isolate aus Folgenahrung stammten (Kurz, 2009). Im Jahr 2007 zeigte eine Reihe von Marktrückrufen in Deutschland, dass das Problem weiterhin bestand. In den letzten Jahren wurden Rückrufe von Säuglingsanfangsnahrungsprodukten auf dem deutschen Markt seltener, aber zwei Rückrufe im Jahr 2012 und 2016 (<http://www.cleankids.de/?s=cronobacter>) zeigten, dass das Risiko einer Exposition gegenüber *Cronobacter* bei Säuglingsanfangsnahrungsmitteln noch nicht vollständig

3 Ergebnisse und Diskussion

überwunden war. In diesen jüngsten Fällen von Marktrückrufen wurde die Speziesidentität nicht bekannt gegeben, da gemäß Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 eine Identifizierung von *Cronobacter* spp. bis zur Speziesebene nicht erforderlich ist. In Anbetracht der Ergebnisse der vorliegenden Studie würde jedoch eine genauere Identifizierung und Charakterisierung aller *Cronobacter*-Isolate aus kontaminierter Säuglingsanfangsnahrung, die die Qualitätskontrollen der Hersteller umgehen konnten, die Passgenauigkeit einer spezifischen Risikobewertung verbessern. Insbesondere MLST scheint ein wichtiger Ansatz zu sein, um die Identifizierung einer potenziellen Häufung bestimmter Isolate mit Krankheitsausbrüchen zu erleichtern. In einem solchen Prozess ist die Neubewertung von *Cronobacter*-Stämmen, die zuvor als *E. sakazakii* isoliert wurden, ein wichtiger Schritt, um die Datenbasis für Langzeitbeobachtungen bereitzustellen. Wir gehen davon aus, dass die Tatsache, dass alle 80 Isolate, die über 4 Jahre hinweg aus den Säuglingsanfangsnahrungsproben gewonnen wurden, entweder *C. sakazakii* oder, in geringerem Maße, *C. malonaticus* waren, kein Zufall war. Ein Vergleich von „neuen“ Isolaten mit den in dieser Studie beschriebenen könnte helfen, Trends und Entwicklungen hinsichtlich der Kontamination von Säuglingsanfangsnahrung mit *C. sakazakii* und *C. malonaticus* zu identifizieren und könnte daher in einer langfristigen Minimierungsstrategie in der Säuglingsanfangsnahrungsherstellung interessant sein.

Studie 2: Rehagel, C., Akineden, Ö., Usleber, E., 2022.

Microbiological and mycotoxicological assessment of processed cereal-based complementary foods for infants and young children from the German market. *Journal of Food Science* 87, 1810-1822. Doi: 10.1111/1750-3841.16106.

Diese Arbeit hatte zum Ziel, die Lebensmittelsicherheit von Getreidebeikost für Säuglinge und Kleinkinder in Bezug auf mikrobiologische Kriterien und Mykotoxinkontamination zu untersuchen. Dabei wurden sowohl bekannte opportunistische Krankheitserreger und potentiell gefährliche Mykotoxine als auch einige weniger gut untersuchte Parameter wie gramnegative Bakterien, präsumtives *B. cereus*, EA und AOH berücksichtigt.

Getreidebeikostprodukte für Säuglinge (unter 12 Monaten) und Kleinkinder (1-3 Jahre) bestehen aus einfachen oder gemischten Getreiden und sind nach der Rekonstitution mit Milch oder Wasser verzehrfertig. Diese Produkte werden Säuglingen während der Abstillzeit und Kleinkindern als Ergänzung zur Muttermilch oder Säuglingsnahrung gegeben. Sie sind nicht steril, und mikrobiologische Kontaminationen können in verschiedenen Produktionsstufen auftreten (Los *et al.*, 2018). Mit einer Gesamteinnahme von beispielsweise 6,4 Milliarden US-Dollar (Vereinigte Staaten) und 0,6 Milliarden US-Dollar (Deutschland) im Jahr 2020 stellte „Babynahrung“ (gesamt) nur einen kleinen ($\approx 0,5$ %) Teil der Gesamteinnahmen der Lebensmittelindustrie in Industrieländern dar (Pham, 2021). Der Markt für Babynahrung ist jedoch im Allgemeinen sehr sensibel, da er die Anfälligkeit von Säuglingen und die hohen Anforderungen der Eltern an die Lebensmittelqualität und -sicherheit berücksichtigt. Nur wenige Marken dominieren den deutschen Markt, und es ist möglich, dass verschiedene Marken von denselben Herstellern produziert werden. Im Gegensatz zu pulverförmiger Säuglingsanfangsnahrung sind pathogene Bakterien in Getreidebeikost innerhalb der Europäischen Union nicht spezifisch reguliert, außer durch die allgemeineren Verpflichtungen des „Vorsorgeprinzips“. Zum Beispiel wurden notorisch pathogene/toxigene Bakterien, die in Getreide vorkommen, wie *Cronobacter* spp. und *Bacillus cereus* in Säuglingsanfangsnahrung, aber nicht in Getreidebeikost reguliert (EU, 2005).

Obwohl die Bedeutung von kommerziellen Getreidebeikostprodukten für die Säuglingsernährung in Industrieländern sehr hoch ist, ist die Anzahl der veröffentlichten Studien zur mikrobiologischen und mykotoxikologischen Qualität solcher Produkte überraschend gering, und nur eine Studie befasste sich mit beiden Aspekten (Assunção *et al.*, 2021). Untersuchungen mit einem breiteren Umfang der mikrobiologischen Beschaffenheit waren zur Studienzeit sehr limitiert (Kim *et al.*, 2011), aber *Cronobacter* spp. (Kim *et al.*, 2011; Ziver *et al.*, 2020) und *B. cereus* (Assunção *et al.*, 2021) wurden mit einer gewissen Häufigkeit

3 Ergebnisse und Diskussion

nachgewiesen. Die Anzahl der veröffentlichten Mykotoxinuntersuchungen in Getreidebeikostprodukten war ebenfalls begrenzt, und noch weniger aktuelle Daten waren verfügbar (Mallmann *et al.*, 2020).

Im Rahmen dieser Studie wurden zwischen November 2019 und März 2020 insgesamt 38 milchfreie Getreidebeikostprodukte mit einer Verzehrempfehlung „nach dem vierten Monat“ bis „nach dem sechsten Monat“ aus lokalen Einzelhandelsgeschäften, Drogerien und spezialisierten Bio-Läden im Raum Gießen, Deutschland, gekauft. Laut den Produktdenkulationen stammten die Proben von 12 verschiedenen Unternehmen (Handelsmarken), wobei die meisten als deutsche Erzeugnisse gekennzeichnet waren. Zehn Proben stammten jedoch aus vier anderen Ländern innerhalb der Europäischen Union. Da die Mehrheit der Getreidebeikostprodukte landesweit vermarktet wird, konnte die Probensammlung der Studie als typisch für milchfreie Getreidebeikost-Produkte auf dem deutschen Markt angesehen werden. Zum Untersuchungszeitsraum waren alle in Deutschland erhältlichen Getreidebeikost -Marken als „Bio-Erzeugnis“ gekennzeichnet. Einkornprodukte (n=25) enthielten Hirse, Dinkel, Hafer, Weizen, Gerste, Roggen, Reis oder Mais. Mehrkornprodukte (n = 13) enthielten mindestens zwei bis maximal sieben dieser Getreidesorten. Alle Produkte wurden gemäß der Richtlinie 2006/125/EG der Kommission (EC, 2006a) mit Thiamin (Vitamin B1) angereichert. Alle Produkte lagen in trockener Form vor, entweder als Pulver oder als Granulat, und waren nach der Zugabe von 10 Volumina Milch, Wasser oder mit Wasser verdünnter Milch (1 + 1, nach Volumen) verzehrfertig.

Zu den mikrobiologischen Parametern gehörten unspezifische Hygieneindikatoren (aerobe mesophile Keimzahl, *Enterobacteriaceae*, Schimmelpilze) und spezifische pathogene (*Cronobacter* spp.) oder enterotoxinbildende enterotoxigene Bakterien (präsumtives *B. cereus*).

Die Mehrheit der Proben war negativ für *Enterobacteriaceae*, Schimmelpilze und für präsumtive *B. cereus* (Tabelle 2). Jede Probe zeigte sichtbares Koloniewachstum auf VRBG (Probe Nr. 6) und PEMBA (Probe Nr. 20). Vier Proben wiesen Schimmelpilzwerte an der Nachweisgrenze von $(2,0 - 4,0 \times 10^1 \text{ KbE/g})$ auf, und nur eine Probe (Nr. 17) war moderat positiv für Schimmelpilze mit $2,0 \times 10^2 \text{ KbE/g}$. Auf CCI-Agar zeigten zwei Proben (Nr. 6 und 17) Koloniewachstum, das auf *Cronobacter* spp. hinweist.

Bezüglich der aeroben mesophilen Bakterien war die Mehrheit der Proben (24 von 38) negativ, sechs waren schwach positiv ($10^1 - 10^2 \text{ KbE/g}$). Acht Proben hatten jedoch Koloniezahlen von $\geq 10^2 \text{ KbE/g}$, die höchste Keimzahl wurde für Probe Nr. 6 ($9,6 \times 10^2 \text{ KbE/g}$) erzielt. Bekannterweise gibt es keine spezifische Regulierung für aerobe Koloniezahlen in Getreidebeikostprodukten, weder in der Europäischen Union noch anderswo. Dieser Parameter wurde jedoch von der Internationalen Kommission für mikrobiologische

3 Ergebnisse und Diskussion

Spezifikationen für Lebensmittel (ICMSF) als „nützliche Testung“ betrachtet, und es wurden Grenzwerte im Bereich von $m = 1 \times 10^3 - 5 \times 10^3$ bis $M = 1 \times 10^4 - 5 \times 10^4$ vorgeschlagen (ICMSF, 2011). Die in unserer Studie erhaltenen Keimzahlen lagen um 1–2 Potenzen niedriger, sodass für diesen Parameter eine gute Gesamtqualität aller Produkte angenommen werden konnte. Dennoch wurden ein bis zwei charakteristische Isolate, die den dominanten Koloniemorphotyp jeder PC-Agarplatte repräsentierten, aus insgesamt 14 positiven Proben weiter identifiziert, um vorläufige Informationen über das Spektrum der Bakterienarten in Getreidebeikostprodukten zu erhalten (Tabelle 3). Die dominanten Isolate aus vier Proben wurden als *Bacillus subtilis* identifiziert. Das Koloniewachstum der verbleibenden 10 Proben dominierten nicht-sporenbildende Bakterien. Die identifizierten Arten präsentierten ein sehr diverses Bakterienspektrum und umfassten gramnegative (*Acinetobacter nosocomialis*, *Chryseobacterium hominis*, *Moraxella osloensis*, *Pantoea brenneri*) und grampositive (*Janibacter melonis*, *Microbacterium zeae*, *Micrococcus luteus* [syn. *M. aloeverae*]) Arten (Tabelle 3). All diese Arten wurden aus verschiedenen Umweltlebensräumen einschließlich Pflanzen isoliert, aber auch aus Säuglingsnahrung und klinischen Proben, einige als kommensale Bakterien, aber einige waren an nosokomialen menschlichen Infektionskrankheiten beteiligt (Rajilić-Stojanović & de Vos, 2014).

Die Speziesidentifikation über 16S-RNA-Genanalyse eines verdächtigen Koloniewachstums auf VRBG (Probe Nr. 6) ergab, dass dieses nicht durch ein Mitglied der *Enterobacteriaceae*-Familie verursacht wurde, sondern durch *Acinetobacter baumannii*. Interessanterweise wurde dieselbe Spezies auf dem Plate Count Agar von Probe Nr. 6 identifiziert, was darauf hinweist, dass *A. baumannii* eine bedeutende Bakterienart in diesem speziellen Probenmaterial war. Darüber hinaus zeigte die Speziesidentifikation der verdächtigen *Cronobacter* spp. der Probe Nr. 6, dass es sich um *C. sakazakii* handelte, was eine Co-Kontamination mit beiden opportunistischen Pathogenen bestätigte, die beide Fälle von lebensmittelbedingten Infektionskrankheiten bei Neugeborenen und Säuglingen unter 6 Monaten verursachten (Amorim & Nascimento, 2017; Taylor *et al.*, 2021). *Cronobacter* spp. wurde von einer zweiten Probe (Nr. 17) isoliert, und dieses Isolat stellte sich ebenfalls als *C. sakazakii* heraus. Ein weiteres Isolat aus dieser Probe, gesammelt von dem Plate Count Agar, wurde als *Pantoea brenneri* identifiziert. Die meisten *Pantoea* spp. sind auf Pflanzen und im Wasser allgegenwärtig, wurden aber auch häufig aus Säuglingsnahrung isoliert (Estuningsih *et al.*, 2006; die vorgelegte Studie 4) und mit sehr seltenen, aber schweren Fällen von Sepsis bei Neugeborenen oder immungeschwächten Säuglingen in Verbindung gebracht (Bergman *et al.*, 2007). *Cronobacter* spp., insbesondere *C. sakazakii*, waren in den letzten Jahrzehnten wahrscheinlich der bekannteste lebensmittelbedingte Krankheitserreger in kommerzieller, pulverförmiger Säuglingsanfangsnahrung (Muytjens *et al.*, 1988; Taylor *et al.*, 2021). *Cronobacter* spp. wurden auch aus verschiedenen getreidebasierten Lebensmitteln isoliert

3 Ergebnisse und Diskussion

(Akineden *et al.*, 2015 – die vorgelegte Studie 3; Friedemann, 2007; Lou *et al.*, 2019; Silva *et al.*, 2019), aber es gab wenige Informationen über die Häufigkeit in Getreidebeikost. In der vorliegenden Studie wurden *Cronobacter* spp.-Kolonien in einer Anreicherung von je 10 g Testportion gewonnen. Geringe Kontaminationsniveaus, normalerweise unter 1 KbE/g (Al-Holy *et al.*, 2011; Muytjens *et al.*, 1988), scheinen für *Cronobacter* in getrockneten Lebensmitteln typisch zu sein. In der Europäischen Union wird Getreidebeikostnahrung für Säuglinge und Kleinkinder gemäß der Richtlinie 2006/125/EG der Kommission reguliert (EG, 2006a), diese enthält allerdings keine mikrobiologischen Kriterien. *Cronobacter* spp., presumptives *B. cereus* und *Enterobacteriaceae* in milchbasierten kommerziellen Formeln für Säuglinge unter 6 Monaten werden durch die Verordnung Nr. 2073/2005 der Europäischen Union abgedeckt (EG, 2005), aber diese Verordnung gilt nicht für Getreidebeikost.

Vier Proben ergaben ein schwach positives Ergebnis für Schimmelpilze, alle nahe der Nachweisgrenze ($2,0 \times 10^1$ KBE/g) der Methode. Mikroskopisch wurden alle vorläufig als *Penicillium* spp. identifiziert.

Nur eine Probe (Nr. 20) ergab Koloniewachstum auf PEMBA ($2,0 \times 10^1$ KbE/g), was auf presumptives *B. cereus* hinwies. Mittels 16S rDNA-Sequenzanalyse wurde dieses Isolat als *Bacillus wiedmannii* identifiziert. Dieses Isolat zeigte auch hämolytische Aktivität auf Blutagar und war im Duopath® Cereus Enterotoxine Test (Merck) positiv für die *B. cereus*-Toxine Nhe und Hbl. Von toxischen Stämmen der *B. cereus*-Gruppe wurde zuvor in Säuglingsnahrung, einschließlich getreidebasierter Produkte, berichtet (Kim *et al.*, 2011; Sadek *et al.*, 2018). Schwere Ausbrüche von Vergiftungen im Zusammenhang mit enterotoxischem *B. cereus* in von Kindern konsumierten Lebensmitteln wurde beschrieben (Delbrassinne *et al.*, 2015; Dierick *et al.*, 2005), diese Fälle waren im Speziellen durch unsachgemäße Lebensmittelhandhabung gekennzeichnet. Bei einem so niedrigen Kontaminationsniveau, das sogar unter den Anforderungen der Europäischen Union für Säuglingsnahrung (EG, 2005) liegen würde, scheint dies kein Problem der Lebensmittelsicherheit zu sein.

Zusammenfassend ergaben die mikrobiologischen Analysen, dass alle Proben niedrige oder sehr niedrige Koloniezahlen aufwiesen und fünf von 38 Getreidebeikost-Produkten in geringem Maße positiv für eine oder zwei Bakterienarten waren, die mit seltenen Krankheitsfällen bei Neugeborenen oder Frühgeborenen in Verbindung gebracht wurden. Neun andere Proben enthielten Schimmelpilze oder kommensale Bakterien in niedrigen Mengen. Wir stimmten der Meinung der ICMSF (2011) zu, dass Befunde in einem solchen Bereich nicht als direkte Bedrohung für die Gesundheit von Säuglingen ab 4 Monaten angesehen werden können, solange das Produkt gemäß den Empfehlungen zubereitet und gehandhabt wird. Außerdem konnte keine klare Verbindung zwischen einer spezifischen Getreidebeikost-Zutat oder Mischung von Zutaten und dem Vorkommen spezifischer

3 Ergebnisse und Diskussion

Bakterien festgestellt werden, auch weil die Mehrheit der Produkte verschiedene Getreidearten enthielt. Diese Produkte ergaben die bemerkenswertesten Funde, einschließlich beider *C. sakazakii*-Isolate, *A. baumannii*, *P. breunneri* und *B. wiedmannii* (Tabelle 4, Studie 2).

Bezüglich der mykotoxikologischen Untersuchungen ergaben alle Proben, einschließlich der Roggen enthaltenden Produkte, eindeutig Ergotalkaloid-negative Ergebnisse. Dies weist darauf hin, dass diese Gruppe von Mykotoxinen in Getreidebeikost auf dem deutschen Markt keine relevante Rolle spielt (Tabelle 6, Studie 2). Ergotalkaloide in Getreide können, selbst wenn sie in den geernteten Partien vorhanden sind, während des Reinigungsprozesses leicht entfernt werden, sodass Chargen mit geringer Kontamination für die Herstellung von Getreidebeikost ausgewählt werden können. Es könnte auch angenommen werden, dass die Hersteller von Getreidebeikost bereits von den „bald kommenden“ EU-Vorschriften für Ergotalkaloide in den Jahren 2019/2020 wussten. Dies könnte erklären, warum die Kontaminationssituation in unserer Studie besser war als in einigen früheren Studien berichtet. Zum Beispiel hatten Frühstückszerealien, Kekse und Plätzchen vom niederländischen Markt 2010–2014 durchschnittliche Gesamt-Ergotalkaloid-Werte von 10 µg/kg, wobei einige Produkte über 100 µg/kg lagen (Mulder *et al.*, 2015). Offensichtlich waren spezielle Getreidebeikost-Produkte nicht in dieser Studie enthalten. Ähnliche Ergebnisse wurden in einer Untersuchung von 1997–1999 für kanadische Produkte berichtet (Lombaert *et al.*, 2003).

Wie Ergotalkaloide wurde auch Zearalenon in keiner Probe nachgewiesen. Obwohl Zearalenon häufig als Kontaminant in den meisten Getreidesorten zur Erntezeit vorkommt, wird es weitgehend während der Getreidereinigungsprozesse eliminiert. Unsere Ergebnisse zur Abwesenheit von Zearalenon bei <7 µg/kg werden von anderen unterstützt, die ebenfalls kein Zearalenon oder nur Spuren nahe 1 µg/kg in Getreidebeikost-Produkten aus anderen europäischen Ländern fanden (Braun *et al.*, 2020; Juan *et al.*, 2014), während für solche Produkte aus den Vereinigten Staaten leicht höhere Konzentrationen berichtet wurden (Al-Taher *et al.*, 2017).

Deoxynivalenol wurde relativ häufig (26%), aber in niedrigen Konzentrationen (maximale Konzentration: 35 µg/kg) in Getreidebeikost-Produkten gefunden, unabhängig von der Getreidezusammensetzung (Tabelle 6, Studie 2). Während die meisten Proben negativ waren (<9 µg/kg), enthielten die meisten positiven Proben nur Deoxynivalenol, wahrscheinlich das häufigste Fusarium-Toxin in Getreide in Deutschland. Im Gegensatz zu Zearalenon ist die Entfernung während der Getreideverarbeitung nicht vollständig effizient (Karlovsky *et al.*, 2016), was unsere Ergebnisse erklären könnte. Ähnliche Ergebnisse wurden von anderen berichtet (Herrera *et al.*, 2019; Juan *et al.*, 2014; Pereira *et al.*, 2015).

3 Ergebnisse und Diskussion

T-2/HT-2 wurden in allen 15 haferhaltigen Produkten gefunden, jedoch erneut in sehr niedrigen Konzentrationen zwischen 1 und 8 µg/kg (Tabelle 6, Studie 2). Dies war nicht unerwartet, da frühere Untersuchungen gezeigt haben, dass Hafer das wichtigste, wenn nicht das einzige relevante Getreide in Europa in Bezug auf die T-2/HT-2-Kontamination ist (Curtui *et al.*, 2009; Gottschalk *et al.*, 2009; Kirinčič *et al.*, 2015). Keine der Proben überschritt den Richtwert von 15 µg/kg. Unsere Ergebnisse stimmen mit den Ergebnissen von Al-Taher *et al.* (2017) überein, die niedrige T-2/HT-2-Werte (<10 µg/kg) in haferbasierten und gemischten Getreide-Säuglingsnahrungen vom US-Markt berichteten.

Es war zu erwarten, dass ein beträchtlicher Teil der Proben (66%) aus jeder der sechs Produktkategorien positiv für Alternariol (0,4–2 µg/kg) war (Tabelle 6, Studie 2), da Alternariol das am häufigsten vorkommende Alternaria-Mykotoxin in Lebensmitteln ist (EFSA, 2011). Ähnliche Alternariol-Werte (<10 µg/kg) in Einzelgetreide- sowie in Mehrkorn-Babynahrung wurden auch von Scott *et al.* (2012) und Gotthardt *et al.* (2019) berichtet. Allerdings waren die Alternariol-Werte in positiven Proben durchweg sehr niedrig. In Ermangelung einer vollständigen toxikologischen Risikobewertung ist es schwierig, die Relevanz dieser Befunde zu bewerten. Wenn man (i) den von der EFSA empfohlenen TTC-Wert für AOH (2,5 ng/kg Körpergewicht und Tag; EFSA, 2011) anwendet, (ii) annimmt, dass 25 g Getreidebeikost (Trockenprodukt) eine vernünftige tägliche Portion darstellen, und (iii) eine Körpergewichts-Spanne (6–12 Monate) von 5–10 kg verwendet, würde die kritische Alternariol-Konzentration in Getreidebeikost bei 0,5–1 µg/kg liegen. Das bedeutet, dass mehrere Proben diese kritische Konzentration erreicht oder sogar überschritten hätten, ähnlich wie von der EFSA 2011 geschätzt (EFSA, 2011). Es muss betont werden, dass der „threshold of toxicological concern“-Ansatz für Alternariol von mehreren Unsicherheiten betroffen ist, einschließlich des Mangels an in vivo toxikologischen Daten. Das gleichzeitige Auftreten von Deoxynivalenol und Alternariol wurde in fünf Proben (13%) beobachtet. Von den 15 haferhaltigen Proben, die alle positiv auf T-2/HT-2 getestet wurden, enthielt eine zusätzlich Deoxynivalenol (haferbasiertes Produkt) und acht enthielten Alternariol (vier haferbasierte Produkte + vier Mischgetreideprodukte). Alle drei Toxine wurden in drei haferhaltigen Proben (Mischgetreideprodukte) gefunden. Dies ist nicht überraschend, da die Mehrheit (n = 7) dieser 12 co-kontaminierten haferhaltigen Proben aus Mischgetreiden bestand, was verschiedene Quellen für die Kontamination mit Pilzgiften bietet. Ähnliche Ergebnisse wurden bereits für Getreidebeikost-Produkte berichtet (Juan *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2018).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Kontaminationshäufigkeit von Getreidebeikost mit Deoxynivalenol, T-2/HT-2 und Alternariol im erwarteten Bereich lag, basierend auf früheren Studien. Die Kontaminationsniveaus waren jedoch alle im niedrigen Bereich, weit unterhalb der maximalen Grenzwerte. Das vollständige Fehlen nachweisbarer Mengen von Zearalenon

3 Ergebnisse und Diskussion

und Ergotalkaloiden könnte durch sorgfältige Getreidereinigung und Auswahlverfahren erklärt werden.

Diese Studie war die erste Untersuchung von Getreidebeikostprodukten auf dem deutschen Markt und die zweite weltweit (Assunção *et al.*, 2021), die zwei wichtige Kategorien der Lebensmittelsicherheit untersuchte: die mikrobiologische Qualität und die Kontamination mit Mykotoxinen. Obwohl pathogene, opportunistische oder Verderbsbakterien nicht direkt mit Pilzgiften in Verbindung stehen, kann ein allgemeines Defizit bei der Aufrechterhaltung wirksamer Maßnahmen zur Sicherstellung der Lebensmittelsicherheit und -qualität in Getreidebeikost-Produktionsstätten beide Bereiche negativ beeinflussen. Unsere Studie, obwohl in der Anzahl der Proben begrenzt, umfasste Produkte aller großen Unternehmen, die Getreidebeikost auf dem deutschen Markt anbieten. Alle Produkte erfüllten vollständig die aktuellen Vorschriften der Europäischen Union zu mikrobiologischen Kriterien und Mykotoxinkontaminationen. Nur sehr wenige Proben (Tabelle 4, Studie 2) wiesen in einem oder mehreren Parametern Werte auf, die das ansonsten unauffällige Datenset der analytischen Befunde übertrafen. Das Risiko durch niedrige Keimgehalte an *Cronobacter* spp. und enterotoxigenen *Bacillus* spp., die in Säuglingsnahrung für Frühgeborene und Neugeborene eine große Sorge darstellen, kann leicht vermieden werden, wenn Getreidebeikost frisch für jede Mahlzeit zubereitet und sofort danach verzehrt wird.

Studie 3: Akineden, Ö., Murata, K. J., Gross, M., Usleber, E., 2015.

Microbiological Quality of Raw Dried Pasta from the German Market, with Special Emphasis on *Cronobacter* Species. *Journal of Food Science*, 80 (12), M2860-M2867. Doi: 10.1111/1750-3841.13117.

In der nachfolgenden Arbeit wurden weitere lebensmittelhygienisch-relevante Fragestellungen in Bezug auf mikrobiologische Beschaffenheit von Trockenteigwaren insbesondere das Vorkommen von *Cronobacter* spp. bearbeitet.

Cronobacter spp. haben die Fähigkeit, sich an trockene Umweltbedingungen anzupassen und unter diesen Bedingungen zu überleben und zu persistieren, ähnlich wie bei pulverförmiger Säuglingsanfangsnahrung. Diese Fähigkeit könnte auch für trockene Teigwaren gelten. Bei Trockenteigwaren handelt es sich um beliebig geformte Erzeugnisse, die aus Getreidemahlerzeugnissen mit oder ohne Verwendung von Hühnereiern und/oder anderen Zutaten durch Einteigen, Formen und Trocknen ohne Anwendung eines Gärungs- oder Backverfahrens hergestellt werden. Zwar werden Nudeln und andere Teigwaren vor dem Verzehr mindestens einige Minuten gekocht. Jedoch ist es in Privathaushalten nicht unüblich, kleinen Kindern während dem Kochen rohe Nudeln zum Essen zu geben, und auch unter Jugendlichen ist es weit verbreitet, asiatische Instant-Nudelsuppen direkt und ungekocht aus der Verpackung zu essen, ähnlich einem Knabbererzeugnis. Ebenso sind einige Trockenteigwaren im Handel, bei welchen eine Kochzeit von 1-2 Minuten angegeben wird bzw. andere, die nur mit lauwarmem Wasser eingeweicht werden müssen. Obwohl das Vorkommen von *Cronobacter* spp. insbesondere in Milchtrockenerzeugnissen, aber auch in anderen Lebensmitteln wie beispielsweise in Getreide und Getreideerzeugnissen gut dokumentiert ist, wurde bezüglich einer Kontamination von Trockenteigwaren bis zur Veröffentlichung dieser Arbeit keine umfassenden Studien zur Häufigkeit von *Cronobacter* spp. in trockenen, rohen Teigwaren durchgeführt. Die weitverbreitete Präsenz von *Cronobacter* spp. in verschiedenen Lebensmitteln und Umweltproben, sowie die Fähigkeit dieser Bakterien, unter trockenen Bedingungen zu überleben, unterstreichen die Notwendigkeit einer gründlichen Untersuchung der Kontamination von trockenen Teigwaren. Dies ist besonders wichtig, um das Gesundheitsrisiko für empfindliche Bevölkerungsgruppen, wie Kinder und ältere Menschen, besser einschätzen zu können. Solche Daten sind notwendig, um das mögliche Risiko für Kinder und andere gefährdete Verbrauchergruppen zu bewerten.

Diese Studie untersuchte die mikrobiologische Beschaffenheit von 132 verschiedenen getrockneten Teigwaren aus dem Einzelhandel ($n=109$; weit überwiegend industriell hergestellte Ware) und von Direktvermarktern ($n=33$; weit überwiegend handwerklich hergestellte Ware), die auf dem deutschen Markt erhältlich waren und aus 11 verschiedenen

3 Ergebnisse und Diskussion

Ländern stammten. Die Produkte umfassen Teigwaren aus Weich- oder Hartweizen, einige mit zusätzlichen Zutaten wie Eiern, Gewürzen oder Gemüse. Tabelle 1 (Studie 3) gibt einen Überblick über die Merkmale und die Zusammensetzung der untersuchten Teigwarenproben.

Es wurden je 10 g Probe auf das Vorkommen von *Enterobacteriaceae* und *Cronobacter* spp. untersucht. Zusätzlich wurde die aerobe mesophile Koloniezahl bestimmt. Was die Gesamtkeimzahl betrifft, so wiesen 63,7 % der Proben eine aerobe mesophile Keimzahl von über 10^2 KbE/g auf. Die meisten Proben (46,3 %) wiesen einen Wert zwischen 10^2 und 10^4 KbE/g auf, aber 17,5 % der Proben wiesen mehr als 10^5 KbE/g auf (Tabelle 2, Studie 3). Diese Ergebnisse waren vergleichbar mit denen, die in früheren veröffentlichten Studien von Rayman *et al.* (1981), Swartzentruber *et al.* (1982), Spicher (1985) und Massa *et al.* (1986) für Nudelprodukte berichtet wurden. Die einzige spezifische Regelung, die wir für diesen Parameter in rohen, getrockneten Teigwaren finden konnten, ist ein Toleranzwert von 10^5 KbE/g, der von den Schweizer Behörden herausgegeben wurde (Eidgenössisches Departement des Inneren, 2005). Ein entsprechender Wert (10^6 KbE/g) wurde von der International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF 2011) als In-Prozess-Kriterium für ungefüllte Teigwaren und Nudeln empfohlen. Wir gehen davon aus, dass höhere Gehalte an aeroben mesophilen Mikroorganismen, wie sie in dieser Studie in 7,6 % der Teigwarenproben gefunden wurden, zumindest eine suboptimale Qualität der Rohstoffe oder eine suboptimale Verarbeitung widerspiegeln.

Die Nachweishäufigkeit für Schimmelpilze lag bei 25,8 %, und die größte Populationsverteilung für Schimmelpilze wurde im Bereich von 10^2 bis 10^3 KbE/g gefunden (Tabelle 2). In diesen Proben wurde die Mykoflora von *Aspergillus* spp. dominiert (27 Proben), gefolgt von *Penicillium* (15 Proben) und *Alternaria* (eine Probe). *Aspergillus* und *Penicillium* traten in neun Proben gemeinsam auf. Keine der Proben überschritt den Richtwert für Schimmelpilze in rohen, getrockneten Teigwaren von 10^3 KbE/g, der in den Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM, 2011) angegeben ist. Es wird zu dem Schluss gekommen, dass die Gesamtqualität der untersuchten Proben in Bezug auf Schimmelpilze zufriedenstellend war.

In der vorliegenden Studie wurde in 4,6 % der Proben präsumtives *B. cereus* oberhalb der Nachweisgrenze von 10^2 KbE/g nachgewiesen. Dieser sporenbildende Organismus ist ein weit verbreiteter Bodensaprophyt und lässt sich leicht auf viele Lebensmittel, insbesondere pflanzlichen Ursprungs, übertragen. Getrocknete Teigwaren können *B. cereus*-Sporen enthalten, die in trockenen Lebensmitteln überleben und hitzeresistent sind. *B. cereus* ist in mehrere Ausbrüche von Lebensmittelvergiftungen mit Brechreiz verwickelt, hauptsächlich bei stärkehaltigen Lebensmitteln wie Reis und Nudeln. Eine aktuelle Studie aus Deutschland zeigte, dass etwa 5 % der Teigwarenproben *B. cereus* enthielten. In drei Proben wurden

3 Ergebnisse und Diskussion

höhere Zahlen festgestellt, die den von der DGHM empfohlenen Richtwert von $>10^3$ KbE/g überschritten, aber den Auslösewert von 10^4 KbE/g nicht erreichten.

Nur drei Proben wiesen niedrige Koloniezahlen für *S. aureus* auf, mit Werten zwischen 10^2 und 10^4 KbE/g (Tabelle 2, Studie 3), und erfüllten den Auslösewert der DGHM und ICMSF von 10^4 KbE/g. Bemerkenswert ist jedoch, dass weitere PCR-Tests auf Enterotoxine ergaben, dass diese *S. aureus*-Isolate das Gen für Staphylococcus Enterotoxin H (SEH) besaßen. *S. aureus* wurde gelegentlich in Teigwaren wie Makkaroni, Spaghetti, Eiernudeln usw. nachgewiesen (Lee *et al.*, 1975; Eschment & Steuer, 1977; Rayman *et al.*, 1981; Swartzentruber *et al.*, 1982; Woolaway *et al.*, 1986).

Ein hoher Prozentsatz (38,6%) der Proben war qualitativ positiv für *Enterobacteriaceae*, die als Indikatoren für Hygiene und nachträgliche Kontamination gelten. Weitere biochemische Identifizierungen zeigten, dass *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Pantoea agglomerans*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* und *Serratia* spp. die vorherrschenden Spezies waren. Obwohl zahlreiche Proben *Enterobacteriaceae* enthielten, wurden in keiner der Proben *Salmonella* spp. gefunden. Ein weiteres pathogenes Genus innerhalb der Familie der *Enterobacteriaceae*, *Cronobacter* spp., konnte jedoch aus 14 Proben (10,6%) isoliert werden. Zehn Proben stammten aus Deutschland, zwei aus Italien und je eine aus Kasachstan und China. Mit einem kommerziell erhältlichen Identifikationskit (API32E-Streifen) wurden alle Isolate auf Genusebene als *Cronobacter* (*Enterobacter sakazakii*) identifiziert. Zusätzliche biochemische Tests ermöglichten die Klassifizierung aller präsumptive *Cronobacter*-Isolate in sechs verschiedene Biogruppen gemäß dem von Farmer (1980) und Iversen *et al.* (2006) verwendeten Schema (Tabelle 3, Studie 3). Eine weitere Identifikation der Isolate wurde mittels *rpoB*-Sequenzanalyse und MLST vorgenommen. *C. sakazakii* war die dominierende Spezies, was mit früheren Studien zur Häufigkeit von *Cronobacter*-Isolaten aus pflanzenbasierten Trockenlebensmitteln übereinstimmt (Iversen und Forsythe, 2004; Turcovský *et al.*, 2011; Chon *et al.*, 2012; Cetinkaya *et al.*, 2013). Zwei Isolate waren jedoch *C. turicensis* und eines war *C. muytjensii*. Außerdem wurde die Speziesidentifikation der 14 Isolate anhand der phylogenetischen Analyse bestimmt, die mit der neighbor-joining Methode auf Basis der *rpoB*-Gensequenzen erstellt wurden (Abbildung 1, Studie 3), und in allen Fällen gruppieren sich die Isolate identisch mit den *Cronobacter*-Speziesabgrenzungsclustern. Unter den in der MLST-Datenbank vorhandenen 63 verschiedenen *rpoB*-Allelen wurden einige Allelprofile (*rpoB* 2, *rpoB* 3, *rpoB* 4, *rpoB* 5, *rpoB* 6 und *rpoB* 7) von mehr als einer Spezies geteilt. Dies wurde bei Paarungen der folgenden Spezies beobachtet: *C. sakazakii*/*C. muytjensii*, *C. sakazakii*/*C. turicensis* und *C. sakazakii*/*C. condimenti* (Abbildung 1, Studie 3). Aufgrund des hohen Grades an Homologie zwischen diesen *Cronobacter* spp. war die *rpoB*-Sequenzanalyse nicht ausreichend, um zwischen diesen Spezies klar zu unterscheiden. Daher wurden die Isolate weiter mittels *fusA*-Allele- und MLST-Analyse untersucht.

3 Ergebnisse und Diskussion

Die *fusA*-Allele der 14 Isolate wurden weiter anhand der phylogenetischen Analyse verglichen, die mittels der neighbor-joining Methode mit denen der in der MLST-Datenbank vorhandenen *Cronobacter*-Referenzstämme erstellt wurden, und es wurde festgestellt, dass sie sich zur eindeutigen Differenzierung zwischen den Arten eigneten. Tatsächlich wurde keines der in Abbildung 2 (Studie 3) gezeigten Profile von zwei oder mehr Spezies geteilt. Neun Isolate gruppieren sich in demselben Cluster zusammen mit den *C. sakazakii*-Stämmen, jeweils zwei Isolate mit dem *C. malonaticus*-Typstamm und dem *C. turicensis*-Typstamm und ein Isolat mit dem *C. muytjensii*-Typstamm. Die Speziesidentifizierung der Isolate, die durch *fusA*-Allelanalyse abgeleitet wurden, stimmten mit denen überein, die durch Biotypisierung und, mit Ausnahme der Isolate N90, N153 und N160, auch durch die partiellen *rpoB*-Sequenzen erhalten wurden. Die 14 Isolate waren durch MLST heterogen und konnten neun verschiedenen MLST-Sequenztypen (ST) zugeordnet werden. Es wurde nur eine teilweise Überlappung zwischen Sequenz- und Biotypen beobachtet, wie von Baldwin *et al.* (2009) und Joseph *et al.* (2013) berichtet, da mehrere STs mehrere Biotypen abdeckten und umgekehrt. Zwei *C. sakazakii*-Isolate (N94 und N105), die aus verschiedenen Nudelproben aus Italien bzw. Deutschland isoliert wurden, wurden dem häufigen Sequenztyp ST1 zugeordnet. Ein weiteres Isolat (N96) gehörte zum Sequenztyp ST12, der mit nekrotisierender Enterokolitis assoziiert ist (Forsythe *et al.*, 2014). Weitere Stämme gehörten zu seltenen Sequenztypen (ST13, ST17, ST40), die in der MLST-Datenbank durch Lebensmittel-, Umwelt- und klinische Isolate vertreten sind. Weitere vier Isolate wurden den in dieser Studie erstmals beschriebenen Sequenztypen ST251, ST291, ST292 und ST293 zugeordnet. Ein *C. muytjensii*-Isolat (N40) konnte keinem Sequenztyp zugeordnet werden, da das *gltB*-Gen durch die in der *Cronobacter*-MLST-Datenbank angegebenen Primer nicht amplifiziert werden konnte. Die beiden Isolate der Biogruppe 16, identifiziert als *C. turicensis*, stammten aus zwei verschiedenen Packungen Paprika-Nudeln (N35 und N160) und zeigten zwei unterschiedliche, in dieser Studie erstmals beschriebene Sequenztypen (ST251 und ST293).

Die Makrorestriktionsanalyse mittels PFGE zeigte eine hohe Diversität der *Cronobacter* spp.-Isolate und wies auf die weitgehend unterschiedlichen Umwelt- und geografischen Quellen der Kontamination hin. Die PFGE-Ergebnisse zeigten insgesamt 14 verschiedene PFGE-Profile mit 9 bis 15 DNA-Fragmenten zwischen 48,5 und 630,5 kb (Abbildung 3, Studie 3).

Zusammenfassend zeigte diese Studie, dass die meisten mikrobiologischen Parameter in rohen getrockneten Nudeln auf dem deutschen Markt eine insgesamt zufriedenstellende Qualität aufweisen. Es konnte kein klarer Zusammenhang zwischen mikrobiologischen Ergebnissen und Nudelsorte (Weichweizen, Hartweizen), anderen Zutaten oder Herkunftsland festgestellt werden, obwohl *Cronobacter* spp. häufiger aus Hartweizennudeln als aus Weichweizennudeln isoliert wurden. Die Anzahl der Proben war jedoch zu klein, um eindeutige

Schlussfolgerungen zu ziehen. Die Fähigkeit von *Cronobacter* spp., in getrockneten Teigwaren zu überleben, könnte auf ihre Toleranz gegenüber Trockenheit und Hitze zurückzuführen sein (Breeuwer *et al.*, 2003; Dancer *et al.*, 2009). Zwei Befunde bedürfen jedoch weiterer Betrachtung. Die in einigen Proben gefundenen Mengen an *B. cereus* liegen nicht weit unter den kritischen Werten, insbesondere bei toxinbildenden Stämmen. Das häufige Vorkommen von *Cronobacter* spp. in rohen getrockneten Nudeln könnte eine zusätzliche Risikobewertung rechtfertigen, einschließlich gefährdeter Verbrauchergruppen außer Säuglingen. Derzeit gibt es keine Vorschriften für *Cronobacter* spp. in Lebensmitteln außer für Säuglingsanfangsnahrung, und es gibt keine veröffentlichten Belege für lebensmittelbedingte Erkrankungen durch *Cronobacter* spp. aus anderen Lebensmitteln. Die Studien von Patrick *et al.* (2014) sowie Alsonosi *et al.* (2015) legten jedoch nahe, dass es möglicherweise andere klinisch relevante Quellen für *Cronobacter*-Infektionen bei älteren Erwachsenen geben kann und pflanzenbasierte Lebensmittel derzeit nicht ausgeschlossen werden können.

3 Ergebnisse und Diskussion

Studie 4: Estuningsih, S., Kress, C., Hassan, A.A., Akineden, Ö., Schneider, E., Usleber, E., 2006.

Enterobacteriaceae in dehydrated powdered infant formula manufactured in Indonesia and Malaysia. *Journal of Food Protection*, 69: 3013-3017. Doi: 10.4315/0362-028X-69.12.3013.

Aus den vermehrten Nachweisen von pathogenen *Enterobacteriaceae*-Spezies in Säuglingsnahrungsmitteln aus den Industrieländern ergab sich die Frage nach der Situation in Südostasien. Zum Zeitpunkt der Veröffentlichung dieser Arbeit war diese soweit erste Veröffentlichung über die Kontamination von pulverförmiger Säuglingsnahrung aus Indonesien mit *E. sakazakii* und mehreren anderen opportunistischen Krankheitserregern der Familie *Enterobacteriaceae*. Während der Durchführung der Studie war die neue Taxonomie des Genus *Cronobacter* spp. noch nicht bekannt, weshalb die alte Nomenklatur *E. sakazakii* verwendet wurde. Zudem war die Kontamination von dehydrierter pulverförmiger Säuglingsnahrung mit bakteriellen Krankheitserregern in solchen Entwicklungsländern allgemein nicht gut dokumentiert, und es gab keine Daten zur Krankheitsbelastung durch den Verzehr dieser Lebensmittel durch Säuglinge. Muytjens *et al.* (1988) analysierten Säuglingsnahrung aus 35 Ländern und fanden relativ hohe Frequenzen von opportunistischen Krankheitserregern wie *Enterobacter sakazakii*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter agglomerans*, *Klebsiella pneumoniae* und *Citrobacter* spp. Proben aus Südostasien waren jedoch nicht in ihrer Untersuchung enthalten. Daten zur möglichen Kontamination von Säuglingsnahrung mit *Shigella* in Südostasien fehlten ebenfalls. Unter den *Enterobacteriaceae*, die als opportunistische Krankheitserreger gelten, wurde *E. sakazakii* in dem Untersuchungszeitraum als aufkommender lebensmittelbedingter Krankheitserreger anerkannt. Das Vorkommen von *E. sakazakii* in dehydrierter pulverförmiger Säuglingsnahrung war zu dieser Zeit schon gut dokumentiert und die epidemiologischen Daten weisen darauf hin, dass auf Milchpulver basierende Säuglingsnahrung eine wichtige Quelle für *E. sakazakii*-Infektionen darstellt. Mehrere andere *Enterobacteriaceae*-Arten, wie *K. pneumoniae*, *E. cloacae* und *Escherichia coli*, wurden mit nekrotisierender Enterokolitis bei Säuglingen in Verbindung gebracht. Darüber hinaus können *Pantoea agglomerans*, *Citrobacter* spp. und *Escherichia hermannii* nosokomiale Infektionen verursachen. Diese Arten wurden gemäß WHO als Kategorie-B-Organismen klassifiziert, die wahrscheinlich Krankheiten bei Säuglingen verursachen.

Im Rahmen der Arbeit zur vorgelegten Studie 4 wurden Untersuchungen zum Vorkommen von *Enterobacteriaceae* in Säuglingsnahrungsprodukten aus Südostasien auf der Ebene der Fertigprodukte in angebotener Form beschrieben und in den europäischen und internationalen Kontext eingeordnet. In Südostasien produzierten mehrere lokale Hersteller pulverförmige

3 Ergebnisse und Diskussion

Säuglingsnahrung für den regionalen Markt. Da nach unserem Wissen keine Daten über die Kontamination dieser Produkte in Indonesien mit *Enterobacteriaceae* verfügbar waren, lag der Fokus dieser Arbeit auf der mikrobiologischen Analyse pulverförmiger Säuglingsnahrungsmittel und weiterer Folgenahrung (≥ 4 Monate). Dabei wurden auch *E. sakazakii* und andere *Enterobacteriaceae*-Arten identifiziert. Zur Untersuchung kam eine Gesamtzahl von 74 verschiedenen Packungen pulverförmiger Säuglingsnahrung, produziert von fünf verschiedenen Herstellern (vier aus Indonesien und einer aus Malaysia) in Südostasien, und zwar aus Einzelhandelsmärkten in Jakarta und anderen Städten auf Java, Indonesien. Laut den Etiketten war das empfohlene Alter für den Verzehr älter als 4 Monate ($n = 29$), älter als 6 Monate ($n = 36$), älter als 8 Monate ($n = 4$) und älter als 9 Monate ($n = 5$). Alle Proben basierten auf Milchpulver, enthielten aber auch andere Zutaten (Getreide, weißen oder braunen Reis, Früchte, Gemüse, Schokolade, Honig oder Hühnerfleisch). Entsprechend ihrer Zusammensetzung und gemäß der Standarddefinition der Codex Alimentarius Kommission (Anonymous, 1979, 1981, 1987) wurden die Proben als „Folgenahrung“ kategorisiert, obwohl 29 Produkte ein empfohlenes Alter von unter 6 Monaten aufwiesen und daher auch als „Säuglingsanfangsnahrung“ eingestuft werden könnten.

Da ein erheblicher Teil der indonesischen Säuglingsnahrungsproduktion in regionalen Produktionsstätten mit lokalen Rohstoffen und Zutaten erfolgt, wurde vermutet, dass mangelhafte hygienische Praktiken während der Herstellung zu einer Kontamination durch pathogene *Enterobacteriaceae* führen könnten. Außerdem wurde vermutet, dass das Risiko einer Kontamination mit *Enterobacteriaceae* bei Folgemilch am höchsten sein könnte, da diese Produkte eine mehrkomponentige Zusammensetzung besitzen. Daher wurde zunächst eine Untersuchung auf das mögliche Vorhandensein von Salmonellen und Shigellen in den Proben durchgeführt. Diese Krankheitserreger wurden allerdings in keiner der Proben nachgewiesen, aber auf den dazu verwendeten Selektivmedien wurde jedoch häufig das Wachstum zahlreicher atypischer Kolonien beobachtet. Nach weiterer Identifizierung auf Violet Red Bile Glucose (VRBD)-Agar zeigte sich, dass mehrere dieser Kolonien phänotypisch ähnlich zu *E. cloacae* oder *E. sakazakii* waren. Nach der Überprüfung aller verdächtigen Isolate auf CASO-Agar wurde häufig das Wachstum gelber Kolonien festgestellt. Insgesamt wurden Kolonien aus 10 Proben (13,5 %) biochemisch durch API 20E als *E. sakazakii* bestätigt. Alle *E. sakazakii*-positiven Proben stammten von zwei indonesischen Herstellern (Tabelle 1, Studie 4).

Die Häufigkeit (13,5 %) von *E. sakazakii* in pulverförmiger Säuglingsnahrung aus Indonesien gehört zu den bisher höchsten berichteten Werten. Muytjens *et al.* (1988) analysierten pulverförmige Säuglingsnahrungsprodukte aus 35 Ländern auf das Vorhandensein von *Enterobacteriaceae*. *E. sakazakii* war in 14,2 % der Proben mit einer Keimzahl von 0,36 bis 66 KbE/100 g nachweisbar. In Kanada wurde das Vorhandensein von *E. sakazakii* in 6,7 % der

3 Ergebnisse und Diskussion

getesteten Proben berichtet, häufig im Bereich von 0,36 KbE/100 g (Nazarowec-White & Farber, 1997). Im Vereinigten Königreich wurde *E. sakazakii* in 3,9 % der pulverförmigen Säuglingsnahrungsproben bzw. 10,2 % der getrockneten Säuglingsnahrungsproben berichtet (Iversen & Forsythe, 2004).

Die *E. sakazakii*-Isolate in dieser Studie wurden aus 25-g-Testportionen der Proben gewonnen. Die Betrachtung der Keimzahl (mind. 1 KbE/25 g Probe) zeigte jedoch eine Belastung auf niedrigem Niveau. Wenn rekonstituierte, kontaminierte Säuglingsnahrung unter tropischen Bedingungen bei etwa 30 °C (typisch für Indonesien) unsachgemäß gelagert wird, könnte ein Kontaminationsniveau von mindestens 1 KbE/25-g-Testportion, wie in dieser Studie gefunden, als kritisch angesehen werden. Obwohl pulverförmige Säuglingsnahrung kein steriles Produkt ist, kann bei einem weniger gebildeten Teil der Bevölkerung davon ausgegangen werden, dass das Wissen über die potenziellen Risiken unsachgemäßer Handhabung oder außerplanmäßiger Verwendung solcher Produkte unzureichend ist. Aufgrund der typischerweise niedrigen Kontaminationsniveaus in pulverförmiger Säuglingsnahrung sind Probenahme und Probengröße entscheidend für die quantitative Isolierung von *E. sakazakii*., wobei die dreifache Analyse von 100-, 10- und 1-g-Testportionen von der U.S. Food and Drug Administration (FDA, 2002) und dreißig Testportionen (je 10 g) von der EU (Verordnung (EG) Nr. 2073/2005) vorgeschrieben werden.

Neben *E. sakazakii* wurden sieben weitere Spezies oder Speziesgruppen der Familie *Enterobacteriaceae* identifiziert, einige davon opportunistische Krankheitserreger. Die Gesamtfrequenz der identifizierten *Enterobacteriaceae* war in absteigender Reihenfolge: *Pantoea* spp. (n = 12 Proben), *E. hermanii* (n = 10), *E. sakazakii* (n = 10), *E. cloacae* (n = 8), *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* (n = 3), *Citrobacter* spp. (n = 2), *Serratia* spp. (n = 2) und *E. coli* (n = 2). Insgesamt waren 35 Proben (47 %) positiv für eine oder mehrere *Enterobacteriaceae*-Spezies. Obwohl *Pantoea* spp. aktuell gemäß der neuen Taxonomie zu der Familie *Erwiniaceae* angehören, werden sie hier nach der alten Zugehörigkeit behandelt. Im Allgemeinen waren die identifizierten Spezies und die Häufigkeit ihres Vorkommens ähnlich wie die von Muytjens *et al.* (1988) berichteten. Im Vergleich zu den Ergebnissen von Iversen und Forsythe (2004) für pulverförmige Säuglingsanfangsnahrung und getrocknete Säuglingsnahrung, die hauptsächlich im Vereinigten Königreich und in anderen europäischen Ländern hergestellt wurden, war die Kontaminationshäufigkeit mit *Enterobacteriaceae* in dieser Studie viel höher.

Die Häufigkeit positiver Ergebnisse und die in positiven Proben identifizierten Spezies waren nicht bei allen Herstellern identisch (Tabelle 1, Studie 4). Im Allgemeinen war die Kontaminationshäufigkeit mit *Enterobacteriaceae* bei Produkten von drei in Indonesien ansässigen Herstellern am höchsten, während Produkte eines vierten indonesischen

3 Ergebnisse und Diskussion

Herstellers und die eines malaysischen Herstellers weniger häufig kontaminiert waren. In 14 von 23 Packungen von Hersteller A konnten *Enterobacteriaceae* identifiziert werden, am häufigsten *E. sakazakii* und *E. cloacae*. Positive Produkte von Hersteller B (7 von 15 Packungen) waren typischerweise mit zwei oder mehr *Enterobacteriaceae*-Spezies kontaminiert, wobei *E. sakazakii* in drei Packungen identifiziert wurde. Obwohl *E. sakazakii* in Produkten von Hersteller C nicht identifiziert wurde, enthielten 10 von 12 Packungen *Enterobacteriaceae*, wobei *E. hermanii* in diesen Packungen am häufigsten identifiziert wurde. Produkte von Hersteller D enthielten nur *Pantoea* spp. in drei von acht Packungen. *Enterobacteriaceae* waren in Produkten von Hersteller E (aus Malaysia) viel seltener, nur 1 von 16 Packungen enthielt *Pantoea* spp. Obwohl diese Unterschiede zwischen den Herstellern hinsichtlich der Isolationshäufigkeit und der isolierten *Enterobacteriaceae* nicht überinterpretiert werden sollten, hatten die Hersteller A, B und C ein ausgeprägteres Kontaminationsproblem mit *Enterobacteriaceae* während der Herstellung von pulverförmiger Säuglingsnahrung.

Das Risiko einer Infektion mit opportunistischen Krankheitserregern durch pulverförmige Säuglingsanfangsnahrung ist in erster Linie ein Problem für Frühgeborene und Neugeborene (WHO/FAO, 2004; EFSA 2004; Gurtler *et al.*, 2005; Iversen & Forsythe, 2003). Allerdings muss auch Folgenahrung, die teilweise für Säuglinge ab 4 Monaten empfohlen wird, und in der vorliegenden Studie positiv auf *E. sakazakii* getestet wurde, als potenziell gefährlich angesehen werden. Die medizinische Überwachung war in Indonesien nicht gut etabliert, und statistische Daten zur Gesundheit von Säuglingen sind nicht verfügbar. Allerdings könnte ein relativ hoher Anteil von Säuglingen in Indonesien Ernährungs- oder Immunitätsdefizite aufweisen und daher zur Hochrisikogruppe für Infektionen mit *E. sakazakii* und anderen opportunistischen Krankheitserregern gehören (WHO/FAO, 2004). Wenn pulverförmige Säuglingsnahrung nicht ordnungsgemäß zubereitet und aufbewahrt wird, könnten diese Produkte daher ein Gesundheitsrisiko für Säuglinge in Indonesien darstellen. Die Untersuchung der Studie bildete aber eine Datengrundlage für weitere Expositionsabschätzungen.

3.2 Entwicklung von molekularbasierten Schnellnachweisverfahren von *Cronobacter* spp. in Säuglingsnahrungsmitteln

Studie 5: [Akineden, Ö., Wittwer, T., Geister, K., Plötz, M., Usleber, E., 2020.](#)

Nucleic acid lateral flow immunoassay (NALFIA) with integrated DNA probe degradation for the rapid detection of *Cronobacter sakazakii* and *Cronobacter malonaticus* in powdered infant formula. *Food Control*, 109:106952. Doi: 10.1016/j.foodcont.2019.106952.

In dieser Studie wurde die Entwicklung eines neuartigen Nukleinsäure-Lateral-Flow-Immunoassay (NALFIA)-Systems für die beiden pathogenen *Cronobacter*-Spezies, *C. sakazakii* und *C. malonaticus*, auf der Basis der Amplifikation des *rpoB*-Gens in Gegenwart einer heterobifunktionalen, *Cronobacter*-spezifischen DNA-Sonde vorgestellt. Im Mittelpunkt des entwickelten Systems stand der Nachweis der partiellen Degradierung der integrierten DNA-Sonde während der PCR-Amplifizierung, die anschließend durch Lateral-Flow-Immunoassay nachgewiesen wird.

C. sakazakii und *C. malonaticus* wurden als die weltweit vorherrschenden *Cronobacter*-Spezies in pulverförmiger Säuglingsnahrung identifiziert (Akineden *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2016) und sind verantwortlich für die Mehrheit der *Cronobacter*-Infektionen bei Säuglingen befunden (Block *et al.*, 2002; Holý & Forsythe, 2014; Mullane *et al.*, 2007; Van Acker *et al.*, 2001; Joseph *et al.*, 2012). Die minimale infektiöse Dosis ist bisher nicht bekannt, jedoch wurde *Cronobacter* in pulverförmiger Säuglingsnahrung in Konzentrationen von weniger als 1 KfE pro 100 g gefunden. Daher verlangt die Verordnung der Europäischen Union über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel (Europäische Kommission, 2005) das Nichtvorhandensein von *Cronobacter* spp. in 30×10 g Säuglingsanfangsnahrungsmitteln, die für spezielle medizinische Zwecke für Säuglinge unter 6 Monaten bestimmt sind. Die Referenzmethode ISO/TS 22964:2006, aktualisiert im Jahr 2017 durch ISO 22964:2017, wurde für dieses Kriterium vorgeschrieben (De Benito *et al.*, 2019). Diese kulturelle Isolierungsmethode ist sowohl arbeitsintensiv als auch zeitaufwendig und erlaubt zudem keine Unterscheidung zwischen den einzelnen *Cronobacter*-Spezies. Obwohl die Referenzmethode für alle rechtlichen Zwecke obligatorisch ist, benötigen Produktionsanlagen geeignete zusätzliche Mittel für eine schnellere Anwesenheits-/Abwesenheitsprüfung relevanter Lebensmittelsicherheitsparameter. Als Reaktion auf die Erfordernisse der Lebensmittelindustrie wurden in den letzten Jahren mehrere ergänzende Techniken entwickelt, entweder um Ergebnisse schneller zu erzielen oder um eine Unterscheidung der einzelnen *Cronobacter*-Spezies zu ermöglichen. Dazu gehören molekulare

3 Ergebnisse und Diskussion

Nachweismethoden wie Real Time-PCR (Yan & Fanning, 2015; Zhou *et al.*, 2016; Zimmermann *et al.*, 2014), Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (Almeida *et al.*, 2009), DNA-Microarray (Wang *et al.*, 2009) und Immunoassays (Blažková *et al.*, 2011; Park *et al.*, 2012; Scharinger *et al.*, 2016, 2017; Song *et al.*, 2015; Xu *et al.*, 2014). Ein relativ neuer Ansatz ist die PCR-Amplifikation kombiniert mit immunchemischem Nachweis, vorzugsweise als Lateral-Flow-Dipstick-Tests für den schnellen Nachweis. Diese Methoden kombinieren die Leistungsfähigkeit der Amplifikation der Zielgenesequenz mit der Empfindlichkeit und Benutzerfreundlichkeit von Dipstick-Immunoassay-Techniken. Eine vielversprechende Variante solcher Methoden ist NALFIA (Singh *et al.*, 2015), die erfolgreich zum Nachweis von z.B. *Cronobacter* spp. (Blažková *et al.*, 2011), *Listeria monocytogenes* (Blažková *et al.*, 2009), methicillinresistentem *Staphylococcus aureus* (Seidel *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2017), *Mycobacterium tuberculosis*-Komplex (Haridas, Thiruvengadam & Bishor, 2014) und *Toxoplasma gondii*-Infektionen (Wu *et al.*, 2017) angewendet wurde. Diese Methoden verwenden typischerweise am 5'-Ende markierte Primerpaare mit unterschiedlichen Markierungen für Vorwärts- und Rückwärtsprimer. Zum Beispiel verwendeten Blažková *et al.* (2011) Biotin und Digoxigenin zur Markierung des 5'-Endes der Vorwärts- und Rückwärtsprimer. Das doppelt markierte Amplikon wurde dann in einem Lateral-Flow-System in einem Anti-Digoxigenin-Kohlenstoff-Neutravidin-Sandwichkomplex visualisiert. Dieser Ansatz erwies sich als bequem und empfindlich für den Nachweis von *Cronobacter* auf Genusebene.

In dieser Studie wurde über die Evaluierung einer neuartigen NALFIA-Technik mit einer heterobifunktionalen DNA-Sonde berichtet. Die Sonde bindet an einen spezifischen DNA-Locus von *C. sakazakii* und *C. malonaticus*, der durch das verwendete Primerpaar zur Amplifikation umrahmt wird. Die während der Amplifikation in einer einstufigen Reaktion produzierten Abbauprodukte dieser Sonde werden dann durch Lateral-Flow-Immunoassay gemessen. Bewertungsparameter umfassten Empfindlichkeit, Spezifität und Testrobustheit bei der Anwendung zum Nachweis von *C. sakazakii* und *C. malonaticus* in Säuglingsnahrung. Das Testprinzip der NALFIA mit integrierter DNA-Sonden-Degradation (Abb. 1, Studie 5) basiert auf der Amplifikation des *rpoB*-Gens von *C. sakazakii* oder *C. malonaticus* in Anwesenheit einer heterobifunktionalen DNA-Sonde, die an den Enden mit zwei unterschiedlichen Haptenen markiert ist: Digoxigenin am 5'-Ende und Biotin am 3'-Ende. Diese Sonde bindet an einen spezifischen DNA-Locus von *C. sakazakii* und *C. malonaticus*, der durch das verwendete Primerpaar zur konventionellen PCR-Amplifikation umrahmt wird. Die während des Amplifikationsschritts produzierten Abbauprodukte dieser Sonde werden dann mittels Lateral-Flow-Immunoassay über Antikörper gegen das Hapten-Label gemessen. In positiven Proben bindet die Sonde an die DNA in einer Region, die von den Vorwärts- und Rückwärtsprimern umrahmt wird, und wird dann während der Amplifikation teilweise durch

3 Ergebnisse und Diskussion

Exonuklease abgebaut. Die Konzentration der Reagenzien wurde so gewählt, dass nur ein Teil der Sonde während des PCR-Prozesses abgebaut wird, sodass der intakte Teil der Sonde als interne Kontrolle verwendet werden kann. Das Abbauprodukt wird im Lateral-Flow-Dipstick-Format (Abb. 1, Studie 5) visualisiert, das typischerweise aus drei Teilen besteht: einem Probenpad zum Laden der Probe, einer Reaktionsmembran aus Nitrocellulose zur Bildung der detektierbaren Farblinien und schließlich einem Absorptionspad, das die kapillare Antriebskraft verstärkt und nicht reagierende Substanzen adsorbiert. Die Membran hat zwei Reaktionszonen: eine für den spezifischen Nachweis der abgebauten Sonde und eine als Kontrolllinie zur Identifizierung eines gültigen Tests. Auf den NALFIA-Teststreifen reagiert die intakte Sonde mit goldmarkierten anti-Digoxigenin-Monoklonalen Antikörpern (DIG-mAb) und wird auf einem Streptavidin-beschichteten Kontrollfeld visualisiert. In positiven Tests wird das digoxigenin-markierte Fragment der abgebauten Sonden nach Bindung an DIG-mAb schließlich auf einem mit anti-mAb beschichteten Testfeld sichtbar gemacht. Die Testauswertung kann entweder durch visuelle Abschätzung der Farbentwicklung oder durch instrumentelle Messung der Reflexion der Reaktionsfelder erfolgen.

Die Kombination der Amplifizierungsverstärkung durch PCR mit der Empfindlichkeit und Einfachheit von Lateral-Flow-Immunoassays bietet vielversprechende Anwendungen in der Lebensmittelsicherheit. Ein großer Nachteil solcher Schnelltestmethoden ist das Risiko unspezifischer Amplifikation, was zu falsch-positiven Ergebnissen führen kann. In der vorliegenden Studie haben wir eine neue NALFIA-Methode entwickelt und angewendet, die durch einen Sondenabbau-Schritt darauf abzielt, falsch-positive Ergebnisse zu reduzieren. Diese Methode wurde zum Nachweis von zwei wichtigen Infektionserregern in Säuglingsnahrung, *C. sakazakii* und *C. malonaticus*, eingesetzt. Beispiele für Lateral-Flow-Geräte für negative und positive Proben sind in Abbildung 2 (Studie 5) dargestellt. Die instrumentelle Auswertung der Testergebnisse durch Messung der Reflektanz ermöglichte quantitative Ergebnisse, die sich besser für Dokumentationszwecke eignen. Insgesamt erwies sich die Testdurchführung als unkompliziert und die Gesamttestzeit betrug weniger als 2 Stunden. Die Spezifität des NALFIA-Tests wurde durch den Ausschluss anderer *Enterobacteriaceae*-Spezies (Tab. 2, Studie 5) und einer ausgewählten Auswahl anderer Lebensmittelpathogene wie *Listeria monocytogenes* und *Salmonella enterica* gezeigt. Alle 10 getesteten Stämme von *C. sakazakii* und *C. malonaticus* ergaben positive Testergebnisse, wohingegen keine der anderen getesteten Spezies zu falsch-positiven Ergebnissen führte. Dies beweist die hohe Spezifität des entwickelten Tests. Die Sensitivität des Tests wurde durch Verdünnungsreihen von *C. sakazakii* und *C. malonaticus* gezeigt (Abb. 3, Studie 5), wobei die Nachweisgrenze für beide Spezies unter 10^2 KbE/ml lag. Diese Sensitivität entspricht den Anforderungen für die Anwendung in der Lebensmittelindustrie, insbesondere zur Qualitätskontrolle von Säuglingsnahrung.

3 Ergebnisse und Diskussion

Zusammenfassend ermöglicht das entwickelte NALFIA-System den spezifischen und empfindlichen Nachweis von *C. sakazakii* und *C. malonaticus* in Säuglingsnahrung. NALFIA-Systeme ohne integrierte Kontrolle über DNA-Sondenabbau wurden bereits zum Nachweis einiger Bakterien (Blažková *et al.*, 2011; Seidel *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2017) und Parasiten (Wu *et al.*, 2017) beschrieben. Soweit bekannt war dies jedoch die erste Veröffentlichung, die eine heterobifunktionale DNA-Sonde und den Nachweis von Abbauprodukten für Pathogene im Zusammenhang mit Lebensmittelsicherheit, insbesondere für *Cronobacter*-Spezies, verwendet. Die Integration einer heterobifunktionalen DNA-Sonde und der Nachweis ihrer Abbauprodukte erhöht die Zuverlässigkeit und Spezifität des Tests. Diese Methode bietet eine praktische und schnelle Alternative zu den herkömmlichen, zeitaufwendigen kulturellen Nachweismethoden und könnte zu einer verbesserten Lebensmittelsicherheit beitragen.

3 Ergebnisse und Diskussion

Studie 6: Hassan, A. A., Akineden, Ö., Kress, C., Estuningsih, S., Schneider, E., Usleber, E., 2007.

Characterization of the gene encoding the 16S rRNA of *Enterobacter sakazakii* and development of a species-specific PCR method. *International Journal of Food Microbiology* 116, 214-220. Doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2006.12.011.

In dieser Studie wurde die Entwicklung von zwei Genus-spezifischen PCR-Methoden für *Cronobacter* spp. (ehemals *E. sakazakii*) berichtet. Die 16S rRNA kodierenden Gensequenzen von diversen *Cronobacter* (*E. sakazakii*)–Stämmen (Referenzstamm ATCC 29544 und vier aus pulverförmiger Säuglingsnahrung isolierten Stämme) wurden hinsichtlich genetischer Variabilität im Vergleich zu anderen relevanten *Enterobacteriaceae* analysiert. Die Sequenzunterschiede zwischen *E. sakazakii* und anderen *Enterobacteriaceae* innerhalb der hypervariablen Regionen V1, V2 und V3 wurden genutzt, um zwei PCR-Methoden für *E. sakazakii* zu entwickeln.

Die beiden PCR-Methoden wurden an einer Reihe von 57 *E. sakazakii*- und 148 Nicht-*E. sakazakii*-Isolaten getestet. PCR1 ergab ein Amplifikon mit einer Größe von 406 bp und führte bei 100% der *E. sakazakii*-Isolate zu positiven Ergebnissen, erkannte jedoch auch *Citrobacter koseri/amalonaticus* und alle neun getesteten *Salmonella enterica*-Serovare. Im Gegensatz dazu ergab PCR2 (Amplifikongröße von 952 bp) nur für *E. sakazakii* positive Ergebnisse, wodurch eine spezifische Identifikation dieser Spezies ermöglicht wurde.

Diese Studie wurde vor der taxonomischen Reklassifizierung der Spezies *E. sakazakii* zur eigenständigen Gattung *Cronobacter* durchgeführt. Gemäß der damaligen Ausgabe der "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology" (Brenner & Farmer, 2005) umfasst die Gattung *Enterobacter* die Arten *E. cloacae*, *E. sakazakii*, *E. amnigenus*, *E. gergoviae*, *E. asburiae*, *E. cancerogenus*, *E. dissolvens*, *E. hormaechei*, *E. nimipressuralis*, *E. pyrinus*, *E. kobei* und *E. cowanii*. Zeitlich kurz vor dieser Studie wurden zwei neue Arten als Mitglieder dieser Gattung aufgenommen, nämlich *E. radicincitans* sp. nov. (Kämpfer *et al.*, 2005) und *E. ludwigii* sp. nov. (Hoffmann *et al.*, 2005). Andere Arten, die früher zur Gattung *Enterobacter* gehörten, wurden umklassifiziert, z. B. wurde *E. agglomerans* zur Gattung *Pantoea*, *E. aerogenes* zur Gattung *Klebsiella* (*Klebsiella mobilis*) und *E. intermedius* zur Gattung *Kluyvera* (*Kluyvera cochleae*) transferiert (Brenner und Farmer, 2005). Innerhalb der Gattung *Enterobacter* hat *E. sakazakii* in den letzten Jahren beträchtliche Aufmerksamkeit erhalten (Anonymous, 2004a, b). *E. sakazakii* wurde erstmals von Urmenyi und Franklin (1961) als "gelb-pigmentiertes *Enterobacter cloacae*" beschrieben. Im Jahr 1980 wurde es von Farmer *et al.* als eigenständige Art bezeichnet (Farmer *et al.*, 1980). Die Unterscheidung zwischen *E. sakazakii*

3 Ergebnisse und Diskussion

und *E. cloacae* basierte auf Unterschieden in biochemischen Reaktionen, der Fähigkeit von *E. sakazakii*-Kolonien, gelbe Pigmente zu produzieren, und auf DNA-DNA-Hybridisierung.

Niedrige Keimzahlen von *E. sakazakii* in Säuglingsnahrung wurden mit Infektionen in Verbindung gebracht. Als Folge davon wurde *E. sakazakii* kürzlich in Säuglingsnahrung innerhalb der Europäischen Union reguliert (Anonymous, 2005): Säuglingsnahrung, die für den Verzehr durch Säuglinge unter sechs Monaten bestimmt ist, muss in 10 g Testportionen (n=30) während der gesamten Haltbarkeitsdauer negativ auf *E. sakazakii* sein. Quantitative kulturelle Verfahren zum Nachweis von *E. sakazakii* nutzen morphologische und biochemische Merkmale (Muytjens *et al.*, 1988; Nazarowec-White und Farber, 1999; FDA, 2002; Kandhai *et al.*, 2004; Iversen *et al.*, 2004a; Leuschner & Bew, 2004; Guillaume-Gentil *et al.*, 2005). Mehrere Studien zur molekularen Charakterisierung von *E. sakazakii* wurden veröffentlicht, sowohl zur Klärung phylogenetischer Beziehungen als auch zur Identifizierung geeigneter PCR-Primer. Iversen *et al.* (2004b) verglichen die standardisierten biochemischen Methoden (api® 20 E und ID32 E) von *E. sakazakii* mit den Ergebnissen einer Sequenzierungstechnik von Teilsequenzen des 16S rRNA-Gens, dieselben Autoren untersuchten die phylogenetische Beziehung zwischen *E. sakazakii*-Stämmen basierend auf Teilsequenzen des 16S rRNA- und des hsp 60-Gens (Iversen *et al.*, 2004c). Mehrere Methoden zur PCR-Identifizierung von *E. sakazakii* wurden in Kombination mit Pulsfeld-Gelelektrophorese verwendet, um die genetische Beziehung von Isolaten aus klinischen Fällen (Clark *et al.*, 1990; Nazarowec-White & Farber, 1999; Block *et al.*, 2002) oder aus Säuglingsnahrungsproben (Lehmacher & Fiegen, 2005; van Acker *et al.*, 2001) zu untersuchen. Mehrere andere PCR-Methoden zur Identifizierung von *E. sakazakii* wurden kürzlich beschrieben, die das 16S rRNA-, das Makromolekül-Synthese-Operon (MMS) oder die α -Glukosidase-Aktivitätsgene als Zielsequenz verwenden (Römermann *et al.*, 2003; Lehner *et al.*, 2004, 2006; Seo und Brackett, 2005; Lau & Rotton, 2005; Malorny & Wagner, 2005). Ein kommerzielles PCR-System (BAX®, Oxoid) zur Identifizierung von *E. sakazakii* ist ebenfalls verfügbar. Allerdings wurden nicht alle dieser Identifizierungssysteme detailliert beschrieben oder gründlich auf Spezifität getestet, in der Tat wurde bei den meisten gezeigt, dass sie mit mehreren anderen nahe verwandten Arten reagierten. Zusammenfassend bleibt die präzise Identifizierung von *E. sakazakii* nach wie vor eine erhebliche Herausforderung (Weiss *et al.*, 2005), und falsch-positive oder falsch-negative Ergebnisse in Säuglingsnahrung können schwerwiegende Folgen haben.

Ziel dieser Studie war es, geeignete Marker-Sequenzen zu identifizieren und zu charakterisieren, um eine weitere Differenzierung eng verwandter *Enterobacteriaceae*-Arten zu ermöglichen und eine artspezifische PCR für *E. sakazakii* zu etablieren. Die Sequenz des 16S rRNA-Gens mehrerer *E. sakazakii*-Stämme wurde analysiert und mit der anderer *Enterobacteriaceae* verglichen. Basierend auf diesen Ergebnissen wurden dann PCR-

3 Ergebnisse und Diskussion

Methoden evaluiert, die Primer-Sequenzen in variablen Regionen des 16S rRNA-Gens verwenden.

Die Amplifikation des 16S rRNA-Gens von *E. sakazakii*-Isolaten (n=57) unter Verwendung der Primerpaare 16SUNI-L/Saka-2b und ESA-1/16SUNI-R ergab PCR-Produkte mit einer Größe von 977 bp bzw. 408 bp. Die PCR-Produkte von fünf ausgewählten Isolaten wurden sequenziert, und vier Sequenzen wurden in der NCBI-Datenbank unter den Zugangsnummern AY624069, AY624071, AY624070 und AY624073 hinterlegt. Der Sequenzvergleich des 16S rRNA-Gens dieser fünf Isolate mit *E. sakazakii*-Stamm JCM 1233 (NCBI Zugangsnummer AB004746) ergab eine Ähnlichkeit von 99,1–99,6%. Der Vergleich mit *E. cloacae*-Stamm 2783 (NCBI Zugangsnummer AF276988) zeigte eine Sequenzähnlichkeit von 91,3–91,8%. Zwei unterschiedliche Muster für *E. sakazakii* wurden identifiziert, eines umfasste den Stamm JCM 1233 und die Isolate ATCC 29544, 6a und 10a, während die Isolate 39a und 39b Unterschiede in den Positionen 556 (Nukleotid CTG) und 614 (Nukleotid CAG) aufwiesen (Sequenzvergleichsdaten nicht gezeigt). Der Vergleich der 16S rRNA-Gensequenzen der fünf *E. sakazakii*-Isolate mit denen von zehn *Enterobacter*-Arten und 22 anderen *Enterobacteriaceae*-Arten für drei hypervariable Regionen (V1, V2 und V3) ist in Abbildung 1 (Studie 6) dargestellt. Bei *E. sakazakii* befanden sich diese an den Nukleotiden 39–63 (V1), 412–445 (V2) und 969–991 (V3). Es wurde eine hohe Heterogenität zwischen *E. sakazakii* und den anderen Mikroorganismen festgestellt. Sequenzen aus den Regionen V1, V2 und V3 wurden verwendet, um Primer für die Entwicklung von PCR-Systemen zu entwerfen.

PCR1, unter Verwendung des Primerpaars Saka-1a und Saka-2a, reagierte positiv (406 bp) mit allen 57 *E. sakazakii*-Isolaten, zeigte jedoch auch positive Reaktionen mit allen neun getesteten Serovaren von *Salmonella enterica* und mit *Citrobacter koseri/amalonicus*. Im Gegensatz dazu detektierte PCR2, welche einen größeren Nukleotidsequenzbereich (952 bp) verwendet, der von V1 (Vorwärtsprimer Saka-1a) bis V3 (Rückwärtsprimer Saka-2b) reicht, ausschließlich alle 57 *E. sakazakii*-Isolate. Alle 205 in Tabelle 1 (Studie 6) aufgeführten Bakterienarten und Isolate, einschließlich aller *Salmonella* spp. und *C. koseri/amalonicus*, zeigten in PCR2 negative Reaktionen.

Das 16S rRNA-Gen wird häufig als Ziel verwendet, da es ein hochkonserviertes Gen ist, das in allen Organismen vorkommt und variable sowie hypervariable Regionen der Sequenz enthält. Molekulare Methoden, die auf diesem Gen basieren, sind als Standardmethode zur Charakterisierung und Identifizierung von Bakterien gut etabliert (Kolbert & Persing, 1999; Woo *et al.*, 2003), daher wurde dieser Ansatz auch in unserer Studie verwendet. Der Vergleich der Nukleotidsequenzen des 16S rRNA-Gens (1375 bp) von fünf *E. sakazakii*-Stämmen (ATCC 29544, 6a, 10a, 39a und 39b) zeigte eine Sequenzähnlichkeit von 99,1–99,6%, wobei Variationen in zwei Segmentpositionen gefunden wurden.

3 Ergebnisse und Diskussion

Es war bemerkenswert, dass die Isolate Nummer 6a, 10a, 39a und 39b aus Säuglingsnahrungsprodukten eines indonesischen Herstellers ("Hersteller A"; Estuningsih *et al.*, 2006, die vorgelegte Studie 4) stammten, und 39a und 39b beide aus derselben Packung kamen. Diese Variabilität stimmte mit den Ergebnissen von Lehner *et al.* (2004) überein, die zwei phylogenetisch unterschiedliche Linien im 16S rRNA-Gen nach Vergleich von 13 *E. sakazakii*-Stämmen fanden. Der Sequenzvergleich des 16S rRNA-Gens dieser 13 Stämme mit unseren fünf Isolaten zeigte, dass eine wesentliche Variabilität der 16S rRNA-Sequenz innerhalb derselben zwei Segmentpositionen liegt. Diese Vielfalt der 16S rRNA von *E. sakazakii* könnte auf die unterschiedlichen Ursprünge der bakteriellen Kontamination zurückzuführen sein. Iversen *et al.* (2004b) beobachteten ebenfalls Sequenzvariationen des 16S rRNA-Gens (500 bp) und nutzten diese Unterschiede, um *E. sakazakii*-Stämme in vier Cluster zu unterteilen.

Variable Regionen innerhalb des 16S rRNA-Gens wurden zur Unterscheidung zwischen Arten und Gattungen verwendet. Die Bestimmung dieser variablen Regionen im 16S rRNA-Gen wurde zuvor bei verschiedenen grampositiven und gramnegativen Bakterien untersucht (Bentley & Leigh, 1995; Monstein *et al.*, 1996, 2001; Bertilsson *et al.*, 2002; Tärnberg *et al.*, 2002). Ein Vergleich zwischen unseren fünf *E. sakazakii*-Isolaten und anderen Isolaten der *Enterobacteriaceae* zeigte eine erhebliche Heterogenität in den drei hypervariablen Regionen V1, V2 und V3 (Abb. 1, Studie 6). Die Heterogenität war in den Regionen V1 und V3 am ausgeprägtesten, während die Sequenzen für V2 zwischen den Arten etwas einheitlicher waren.

Basierend auf den Ergebnissen der Sequenzanalyse des 16S rRNA-Gens wurde in dieser Studie ein erster Ansatz zur Etablierung eines artspezifischen PCR-Systems für *E. sakazakii* entwickelt. Die Primer wurden aus den drei hypervariablen Regionen dieses Gens ausgewählt. Da die Heterogenität der V2-Region etwas weniger ausgeprägt war, war es nicht überraschend, dass das System PCR1, welches ein Primerpaar in den Regionen V1 und V2 (Saka-1a und Saka-2a) verwendet, nicht nur mit *E. sakazakii*, sondern auch mit einigen anderen Arten der *Enterobacteriaceae* reagierte, nämlich mit allen neun getesteten *S. enterica*-Serovaren und mit *C. koseri/amalonicus*. Diese Ergebnisse sind interessant im Hinblick auf die Sequenzähnlichkeit zwischen diesen Arten, die Gegenstand weiterer Untersuchungen sein könnten, sowie unter Berücksichtigung der Tatsache, dass sowohl *Salmonella* als auch *E. sakazakii* bedeutende Krankheitserreger in Säuglingsnahrung darstellen.

PCR1 war jedoch nicht geeignet, um *E. sakazakii* eindeutig zu identifizieren. Die meisten anderen, gut charakterisierten, bisher beschriebenen PCR-Systeme weisen ähnliche Spezifitätseigenschaften auf, das heißt, sie reagieren zumindest mit einigen nahe verwandten

3 Ergebnisse und Diskussion

Arten. Einige andere wurden nicht mit allen relevanten Enterobacteriaceae-Arten getestet, die möglicherweise als Verunreinigungen in Säuglingsnahrung auftreten könnten, und die Artenspezifität könnte daher in der praktischen Anwendung eingeschränkt sein.

Mit Primerpaaren in den Regionen V1 und V3 (Saka-1a und Saka-2b) konnte die Testspezifität maximiert werden. PCR2 zeigte eine positive Reaktion für alle *E. sakazakii*-Stämme und eine negative Reaktion mit allen 148 nicht-*E. sakazakii*-Stämmen. Unter den letzteren befanden sich Arten der Gattungen *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Pantoea*, *Hafnia* und *Escherichia*, die bekanntermaßen mit einer gewissen Häufigkeit in Säuglingsnahrung vorkommen (Anonymous, 2004a). Daher scheint das Risiko von falsch-positiven Ergebnissen bei Verwendung von PCR2 gering zu sein. Andererseits deckten die untersuchten *E. sakazakii*-Stämme ein breites Spektrum an Quellen ab, weshalb auch die Wahrscheinlichkeit von falsch-negativen Ergebnissen gering erscheint. Das einzige andere gut beschriebene PCR-System, das behauptet, artspezifisch für *E. sakazakii* zu sein und ebenfalls mit einer ähnlichen Bandbreite relevanter Bakterien getestet wurde, wurde kürzlich von Malorny und Wagner (2005) veröffentlicht. Es basiert auf der 16S rRNA-Sequenz, die von Harada *et al.* (1996) publiziert wurde. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass das neu beschriebene System PCR2 mit diesen Eigenschaften geeignet zu sein scheint, um *E. sakazakii* nach der Primärkultur von Proben auf Standardmedien zu identifizieren. Darüber hinaus könnte der Test nützlich sein, um *E. sakazakii* in nicht-selektiven Anreicherungsmedien schnell zu detektieren und von *Enterobacter* spp. sowie anderen wichtigen Arten der Familie *Enterobacteriaceae* zu unterscheiden. Dies könnte dazu beitragen, die Diagnose von *E. sakazakii* in Lebensmittelproben und bei neonatalen Infektionen zu verbessern.

4 Zusammenfassung

Dr. Ömer Akineden

***Cronobacter* spp. in Lebensmitteln: Vorkommen, Nachweis und Bedeutung für die Lebensmittelsicherheit unter besonderer Berücksichtigung von Säuglingsnahrung**

Die Identifizierung und Analyse von Lebensmittelsicherheitsrisiken sind zentrale Aspekte der Lebensmittelwissenschaften und des präventiven Verbraucherschutzes. Im Rahmen dieser Habilitationsschrift wurden Studien zu den weltweit bedeutenden lebensmittelassoziierten bakteriellen Infektionserregern *Cronobacter* spp. (ehemals *Enterobacter sakazakii*) im Lebensmittelbereich dargestellt. Diese opportunistischen Krankheitserreger haben in den letzten Jahrzehnten aufgrund ihrer direkten Assoziation mit lebensbedrohlichen Infektionen (Meningitis, Septikämie, nekrotisierende Enterokolitis), insbesondere bei Neugeborenen und Frühgeborenen, erhöhte Aufmerksamkeit erlangt. In den meisten Fällen wurde pulverförmige Säuglingsnahrung als Infektionsquelle identifiziert.

Die in dieser Arbeit zusammengestellten wissenschaftlichen Veröffentlichungen im ersten Themenkomplex befassen sich mit verschiedenen Aspekten des Vorkommens von *Cronobacter* spp. in Säuglingsnahrungsmitteln und Getreidebeikost für Kleinkinder sowie in Trockenteigwaren, um die Exposition des Verbrauchers abzuschätzen und zur Verbesserung der Lebensmittelsicherheit beizutragen.

In der ersten Studie (Studie 1) wurde die Kontaminationssituation von Säuglingsanfangsnahrung auf dem deutschen Markt mit *Cronobacter* spp. auf Speziesebene für die Jahre vor und um die Zeit, als die Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 am 1. Januar 2006 in Kraft trat, retrospektiv untersucht. Eine Neubewertung der *Cronobacter*-Isolate (zuvor als *E. sakazakii* isoliert) bot eine Datenbasis für Langzeitbeobachtungen. Für Deutschland waren bis zur Veröffentlichung dieser Studie (Studie 1) keine Daten zur Verteilung der Spezies innerhalb der Gattung *Cronobacter* in Säuglingsanfangsnahrung verfügbar. Nach Inkrafttreten der europäischen Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 für *Cronobacter* in Säuglingsanfangsnahrung war *E. sakazakii* im Jahr 2006 noch die zweithäufigste *Enterobacteriaceae*-Spezies in Säuglingsanfangsnahrung auf dem deutschen Markt. In der ersten Studie wurden alle untersuchten Isolate, die über viele Jahre hinweg aus Säuglingsnahrungsproben gewonnen wurden, entweder als *C. sakazakii* oder, in geringerem Maße, als *C. malonaticus* identifiziert. *C. sakazakii* war die vorherrschende *Cronobacter*-Spezies in pulverförmiger Säuglingsnahrung. Dies deutete stark darauf hin, dass die Kontaminationssituation von Säuglingsanfangsnahrung in Deutschland von *C. sakazakii* und gelegentlich von *C. malonaticus* dominiert wurde. Die Dominanz von *C. sakazakii* und *C. malonaticus* stimmte jedoch mit ähnlichen Studien aus anderen Ländern überein, die *Cronobacter*-Isolate aus

4 Zusammenfassung

Säuglingsanfangsnahrung und Produktionsumgebungen untersuchten. Eine weitere Schlussfolgerung war zudem, dass ein Vergleich von „neuen“ Isolaten mit den in dieser Studie beschriebenen dazu beitragen könnte, Trends und Entwicklungen bei der Kontamination von Säuglingsanfangsnahrung mit *C. sakazakii* und *C. malonaticus* zu identifizieren. Dies könnte wichtige Erkenntnisse für langfristige Strategien zur Minimierung solcher Kontaminationen in der Herstellung von Säuglingsanfangsnahrung liefern. Eine sich anschließende vergleichende Sequenzanalyse unterschiedlicher *Cronobacter* spp.-Stämme bildete die Grundlage, um erstmals zusammenhängende Fragen zum Nachweis sowie zur intra- und interspezifischen Variabilität des Genus *Cronobacter* beantworten zu können. Die Daten dieser Studie (Studie 1) zeigten eine vergleichsweise hohe Heterogenität der untersuchten Isolate, welche mittels hier etablierter Analyse (PFGE-, MLST- und 16S rRNA-Gen, *rpoB*-Gen, *fusA*-Gen) in den weiteren Studien auch diagnostisch genutzt werden konnte. Anhand der umfangreichen molekularbiologischen Untersuchungen konnten innerhalb des Genus zuverlässige Spezies-spezifische (Studie 5) und Genus-spezifische (Studie 6) Nachweisverfahren entwickelt werden, die in den im zweiten Themenkomplex angegebenen Studien dargestellt.

Die weitverbreitete Präsenz von *Cronobacter* spp. in verschiedenen Lebensmitteln, insbesondere in pulverförmigen Milchtrockenerzeugnissen und Umweltproben, sowie die Fähigkeit dieser Bakterien, unter trockenen Bedingungen zu überleben, verdeutlichen die dringende Notwendigkeit einer umfassenden Untersuchung der Kontamination von Getreidebeikost-Produkten für Säuglinge und Kleinkinder sowie trockenen Teigwaren. Bis zur Veröffentlichung der Studien lagen keine verlässlichen Daten zur Häufigkeit von *Cronobacter* spp. in solchen Produkten vor. Solche Untersuchungen sind besonders wichtig, um das Gesundheitsrisiko für empfindliche Bevölkerungsgruppen, wie Kinder und ältere Menschen, besser bewerten zu können. Diese Daten sind unerlässlich, um das potenzielle Risiko für Kinder und andere gefährdete Verbrauchergruppen fundiert einschätzen zu können.

Die zweite Studie (Studie 2) befasst sich mit der Lebensmittelsicherheit von Getreidebeikost für Säuglinge und Kleinkinder, insbesondere hinsichtlich mikrobiologischer Kriterien und Mykotoxinkontamination. In der Europäischen Union wird Getreidebeikost für Säuglinge und Kleinkinder gemäß der Richtlinie 2006/125/EG der Kommission reguliert, die jedoch keine mikrobiologischen Kriterien enthält. Während die mikrobiologischen Parameter *Cronobacter* spp., präsumtives *B. cereus* und *Enterobacteriaceae* in milchbasierte kommerzieller Säuglingsnahrung unter 6 Monaten durch die Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 reguliert werden, gilt diese Verordnung nicht für Getreidebeikost. Diese Studie stellte die erste umfassende Untersuchung von Getreidebeikost-Produkten auf dem deutschen Markt dar, die sowohl mikrobiologische Qualität als auch Mykotoxinkontamination untersuchte. Obwohl pathogene, opportunistische oder Verderbsbakterien nicht direkt mit Mykotoxinen assoziiert sind, kann ein allgemeines Defizit bei der Aufrechterhaltung wirksamer Maßnahmen zur

4 Zusammenfassung

Sicherstellung der Lebensmittelsicherheit und -qualität in der Produktion von Getreidebeikost beide Aspekte negativ beeinflussen. Die mikrobiologischen Analysen der untersuchten Getreidebeikost-Produkten aus dem Einzelhandel zeigten, dass nur eine sehr geringe Anzahl von Proben Werte in einem oder mehreren Parametern aufwies, die signifikant über dem unauffälligen Datenset der analytischen Befunde lagen. Es konnte jedoch keine klare Assoziation zwischen spezifischen Getreidebeikost-Zutaten oder Kombinationen von Zutaten und dem Auftreten bestimmter Bakterien festgestellt werden, da die Mehrheit der Produkte aus mehreren Getreidearten bestand. Diese Produkte wiesen die bemerkenswertesten Funde auf, einschließlich Isolate von *C. sakazakii*, *A. baumannii*, *P. brenneri* und *B. wiedmannii*. Obwohl *C. sakazakii* nur in geringem Umfang isoliert wurde, stellt das Risiko durch niedrige Keimgehalte von *Cronobacter* spp. in Säuglingsnahrung für Frühgeborene und Neugeborene eine bedeutende Gefahr dar, welche durch die frische Zubereitung und den sofortigen Verzehr von Getreidebeikost minimiert werden kann.

In der dritten Studie (Studie 3) werden weitere lebensmittelhygienisch relevante Fragestellungen zur mikrobiologischen Beschaffenheit von Trockenteigwaren, insbesondere im Hinblick auf das Vorkommen von *Cronobacter* spp., untersucht. Die Studie 3 stützt die Hypothese, dass die Fähigkeit dieses Bakteriums, in getrockneten Teigwaren zu überleben, auf dessen Toleranz gegenüber Trockenheit und Hitze zurückzuführen sein könnte. Ein hoher Prozentsatz (38,6%) der Proben war qualitativ positiv für verschiedene Indikatorkeime für Hygiene und opportunistische Krankheitserreger innerhalb der Familie der *Enterobacteriaceae* wie *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Pantoea agglomerans*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* und *Serratia* spp. *Cronobacter* spp. konnten aus 10,6% der Proben aus Deutschland, Italien, Kasachstan und China isoliert werden. Neben der unzureichenden biochemischen Identifizierung wurde eine weitere Identifikation der Isolate mittels *rpoB*-Sequenzanalyse und MLST vorgenommen. Aufgrund des hohen Grades an Homologie zwischen diesen *Cronobacter* spp. war die *rpoB*-Sequenzanalyse nicht ausreichend, um zwischen diesen Spezies klar zu unterscheiden. Daher wurden die Isolate weiter mittels *fusA*-Allele- und MLST-Analyse untersucht. *C. sakazakii* war in dieser Studie die dominierende Spezies, was mit der ersten Studie zur Häufigkeit von *Cronobacter*-Isolaten aus pulverförmigen Säuglingsnahrungsprodukten übereinstimmt (Studie 1). Zwei Isolate waren allerdings *C. turicensis* und eines war *C. muytjensii*. Diese Befunde bedürfen jedoch weiterer Betrachtung. Das häufige Vorkommen von *Cronobacter* spp. in rohen getrockneten Teigwaren könnte eine zusätzliche Risikobewertung rechtfertigen, einschließlich gefährdeter Verbrauchergruppen außer Säuglingen. Derzeit gibt es keine Vorschriften für *Cronobacter* spp. in Lebensmitteln außer für Säuglingsanfangsnahrung, und es gibt keine veröffentlichten Belege für lebensmittelbedingte Erkrankungen durch *Cronobacter* spp. aus anderen Lebensmitteln. Andere Studien aus der Fachliteratur legten aber nahe, dass es

4 Zusammenfassung

möglicherweise andere klinisch relevante Quellen für *Cronobacter*-Infektionen bei älteren Erwachsenen geben kann und pflanzenbasierte Lebensmittel derzeit nicht ausgeschlossen werden können.

Neben der Betrachtung zum Vorkommen von *Cronobacter* spp. in Säuglingsnahrungsmitteln (Studie 1) und Getreidebeikost-Produkten für Säuglinge und Kleinkinder (Studie 2) in Deutschland wurde eine Untersuchung an Folgenahrung aus Indonesien auf Enterobacteriaceae inklusive *Cronobacter* spp. vorgenommen. Die abschließende Studie zu diesem Themenkomplex (Studie 4) untersuchte die Kontaminationssituation von Säuglingsnahrungsprodukten aus Südostasien, insbesondere im Hinblick auf das Vorkommen von *Enterobacteriaceae*-Spezies in den fertigen Folgenahrungsprodukten. Bei den *Enterobacteriaceae* handelt es sich nicht um klassische Krankheitserreger, sondern um Bakterien, die an opportunistischen Infektionen beteiligt sein können und über Lebensmittel übertragen werden. Die Untersuchungen bestätigten die hohe Nachweishäufigkeit von *Enterobacteriaceae* in den Produkten mehrerer lokaler Hersteller. Die Charakterisierung der *Enterobacteriaceae*-Isolate zeigte ein breites Spektrum, darunter *E. sakazakii* sowie weitere *Enterobacteriaceae* wie *Pantoea* spp., *E. hermannii*, *E. cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter* spp., *Serratia* spp. und *E. coli*. Besonders bemerkenswert war die hohe Prävalenz von *E. sakazakii*, der in 13,5 % der untersuchten Proben nachgewiesen wurden, was zu den bis zum Zeitpunkt dieser Veröffentlichung dieser Studie höchsten berichteten Werten zählte. Die Untersuchungsergebnisse dieser Studie lieferten eine wichtige Datengrundlage für zukünftige Expositionsabschätzungen. Das Infektionsrisiko durch opportunistische Krankheitserreger in pulverförmiger Säuglingsnahrung betrifft in erster Linie Frühgeborene und Neugeborene. Allerdings sollte auch Folgenahrung, die teilweise für Säuglinge ab 4 Monaten empfohlen wird und in der vorliegenden Studie positiv auf *E. sakazakii* getestet wurde, als potenziell gefährlich eingestuft werden. Die medizinische Überwachung in Indonesien ist nicht gut etabliert, und es fehlen statistische Daten zur Gesundheit von Säuglingen. Dennoch könnte ein relativ hoher Anteil der Säuglinge in Indonesien Ernährungs- oder Immunitätsdefizite aufweisen, was sie zu einer Hochrisikogruppe für Infektionen mit *E. sakazakii* und anderen opportunistischen Krankheitserregern macht. Wenn pulverförmige Säuglingsnahrung nicht ordnungsgemäß zubereitet und gelagert wird, könnten diese Produkte daher ein erhebliches Gesundheitsrisiko für Säuglinge in Indonesien darstellen.

Die Arbeiten im zweiten Themenkomplex umfassen zwei Arbeiten zur Entwicklung von schnellen Nachweisverfahren von *Cronobacter* spp. mittels molekularbasierter Techniken in Säuglingsnahrungsfertigprodukten, um die mikrobiologische Sicherheit dieser Produkte zu erhöhen. In Anbetracht der Ergebnisse der vorliegenden Studien würde jedoch eine genauere Identifizierung und Charakterisierung aller *Cronobacter*-Isolate aus kontaminierter Säuglingsanfangsnahrung, die die Qualitätskontrollen der Hersteller umgehen konnte, die

4 Zusammenfassung

Passgenauigkeit einer spezifischen Risikobewertung verbessern. Insbesondere die neuen entwickelte PCR-basierten Nachweisverfahren (Studie 6) sowie das NALFIA-System (Studie 5) im Rahmen dieser Arbeit scheinen ein wichtiger Ansatz zu sein, um die Identifizierung einer potenziellen Häufung bestimmter Stämme aus unterschiedlichen Säuglingsnahrungsmitteln zu erleichtern. Ein besonderer Fortschritt wurde durch die Entwicklung des NALFIA-Systems erzielt. Dieses kombiniert die Effizienz der PCR-Amplifikation mit der Sensitivität und Benutzerfreundlichkeit von Lateral-Flow-Immunoassays. Es ermöglicht einen spezifischen und sensitiven Nachweis von *Cronobacter sakazakii* und *Cronobacter malonaticus* in Säuglingsnahrung bei Nachweisgrenzen unter 10^2 KbE/ml. Die Fähigkeit, Ergebnisse in weniger als zwei Stunden bereitzustellen, stellt eine erhebliche Verbesserung im Vergleich zu den zeitaufwendigen kulturbasierten Verfahren dar. Die Integration heterobifunktionaler DNA-Sonden und der Nachweis ihrer Abbauprodukte erhöhen die Zuverlässigkeit und Spezifität des Tests zusätzlich. Das NALFIA-System bietet eine praktikable, sensitive und spezifische Alternative zu traditionellen Nachweismethoden. Seine Implementierung könnte die mikrobiologische Sicherheit von Säuglingsnahrung signifikant verbessern, indem es dazu beiträgt, Qualitätskontrollmaßnahmen zu stärken und das Infektionsrisiko für empfindliche Bevölkerungsgruppen, wie Säuglinge und Kleinkinder, zu minimieren. In der zweiten Studie (Studie 6) wurde die Entwicklung von zwei Genus-spezifischen PCR-Methoden für *Cronobacter* spp. basierend auf den Sequenzen des 16S rRNA-Gens berichtet. Unterschiede in den hypervariablen Regionen V1, V2 und V3 ermöglichten die Konstruktion des PCR2Systems, das *Cronobacter* spp. zuverlässig identifiziert und von anderen *Enterobacteriaceae* differenziert. Das entwickelte PCR2-System erweist sich als vielversprechend, um *Cronobacter* spp. nach der Primärkultur auf Standardmedien oder direkt in nicht-selektiven Anreicherungsmedien zu detektieren. Diese Methode könnte die Diagnose von *Cronobacter* spp. in Lebensmitteln und bei neonatalen Infektionen verbessern, da sie eine schnelle und spezifische Identifizierung ermöglicht. Zusammenfassend stellen die entwickelten molekularen Nachweismethoden bedeutende Fortschritte dar, die eine verbesserte Kontrolle und Sicherheit in der Produktion von Säuglingsnahrung unterstützen und gleichzeitig die Diagnostik von *Cronobacter* spp. vereinfachen und beschleunigen.

5 Summary

Dr. Ömer Akineden

***Cronobacter* spp. in Food: Occurrence, Detection, and Importance for Food Safety with a Special Emphasis on Infant Formula**

The identification and analysis of food safety risks are central aspects of food science and preventive consumer protection. This habilitation thesis presents studies on the globally significant food-associated bacterial pathogens *Cronobacter* spp. (formerly *Enterobacter sakazakii*) in the food field. These opportunistic pathogens have gained increased attention in recent decades due to their direct association with life-threatening infections – such as meningitis, septicemia, necrotizing enterocolitis – particularly in neonates and preterm infants. In most cases, powdered infant formula has been identified as the primary source of infection.

The first thematic section of this thesis compiles scientific publications addressing various aspects of the occurrence of *Cronobacter* spp. in infant formulas, infant cereals, and dry pasta products. These studies aim to assess consumer exposure and contribute to improved food safety. In the first study (Study 1), the contamination situation of infant formula on the German market with *Cronobacter* spp. at the species level was retrospectively examined for the years before and around the time when Regulation (EC) No. 2073/2005 came into force on January 1, 2006. A reassessment of the *Cronobacter* isolates (previously isolated as *E. sakazakii*) provided a database for long-term monitoring. Prior to the publication of this study (Study 1), there were no data available for Germany regarding the distribution of species within the *Cronobacter* genus in infant formula. After the implementation of the European Regulation (EC) No. 2073/2005 for *Cronobacter* in infant formula, *E. sakazakii* was still the second most common *Enterobacteriaceae* species in infant formula on the German market in 2006. The first study identified all isolates, which were collected over many years from infant food samples, either as *C. sakazakii* or, to a lesser extent, as *C. malonaticus*. *C. sakazakii* was the predominant *Cronobacter* species in powdered infant formula. This strongly suggested that the contamination situation of infant formula in Germany was dominated by *C. sakazakii*, with occasional contamination by *C. malonaticus*. The dominance of *C. sakazakii* and *C. malonaticus* was also consistent with similar studies from other countries that examined *Cronobacter* isolates from infant formula and production environments. Another conclusion was that a comparison of "new" isolates with those described in this study could help identify trends and developments in the contamination of infant formula with *C. sakazakii* and *C. malonaticus*. This could provide valuable insights for long-term strategies to minimize such contamination in the production of infant formula. A subsequent comparative sequence analysis of different *Cronobacter* spp. strains formed the basis for addressing related questions

5 Summary

regarding the detection and intra- and interspecies variability of the *Cronobacter* genus for the first time. The data from this study (Study 1) showed a comparatively high heterogeneity among the examined isolates, which, through the analysis techniques established here (PFGE, MLST, and 16S rRNA gene, *rpoB* gene, *fusA* gene), could also be used diagnostically in subsequent studies. Extensive molecular biological investigations led to the development of reliable species-specific (Study 5) and genus-specific (Study 6) detection methods, which are presented in the studies of the second thematic section.

The widespread presence of *Cronobacter* spp. in various foods, particularly powdered milk products and environmental samples, as well as the ability of these bacteria to survive under dry conditions, highlights the urgent need for comprehensive investigations into the contamination of infant and toddler cereals and dry pasta products. Until the publication of these studies, no reliable data on the prevalence of *Cronobacter* spp. in such products were available. Such studies are especially important for better assessing the health risks to vulnerable population groups such as children and the elderly. These data are essential for assessing the potential risks to children and other at-risk consumer groups. The second study (Study 2) deals with the food safety of infant cereals, particularly concerning microbiological criteria and mycotoxin contamination. In the European Union, infant cereals are regulated by Commission Directive 2006/125/EC, which, however, does not include microbiological criteria. While microbiological parameters such as *Cronobacter* spp., presumptive *B. cereus*, and *Enterobacteriaceae* are regulated for milk-based commercial infant formula for infants under six months by Regulation (EC) No. 2073/2005, this regulation does not apply to infant cereals. This study represents the first comprehensive investigation of infant cereals on the German market, examining both microbiological quality and mycotoxin contamination. Although pathogenic, opportunistic, or spoilage bacteria are not directly associated with mycotoxins, a general deficit in maintaining effective measures to ensure food safety and quality in the production of infant cereals could negatively impact both aspects. Microbiological analyses of the examined infant cereal products from retail showed that only a very small number of samples had values in one or more parameters significantly higher than the typical analytical dataset. However, no clear association could be found between specific infant cereal ingredients or ingredient combinations and the occurrence of particular bacteria, as most of the products consisted of multiple cereal types. These products exhibited the most notable findings, including isolates of *C. sakazakii*, *A. baumannii*, *P. brenneri*, and *B. wiedmannii*. Although *C. sakazakii* was isolated to a lesser extent, the risk posed by low levels of *Cronobacter* spp. in infant formula for preterm and neonate infants remains a significant danger, which can be minimized by the fresh preparation and immediate consumption of infant cereals.

5 Summary

The third study investigates further food hygiene-related questions regarding the microbiological composition of dry pasta products, particularly in relation to the occurrence of *Cronobacter* spp. The study presented in Study 3 supports the hypothesis that the ability of this bacterium to survive in dry pasta may be due to its tolerance to dryness and heat. A high percentage (38.6%) of the samples tested positive for various indicator bacteria for hygiene and opportunistic pathogens within the *Enterobacteriaceae* family, such as *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Pantoea agglomerans*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, and *Serratia* spp. *Cronobacter* spp. were isolated from 10.6% of the samples from Germany, Italy, Kazakhstan, and China. In addition to insufficient biochemical identification, further identification of the isolates was carried out through *rpoB* sequence analysis and MLST. Due to the high degree of homology among these *Cronobacter* spp., *rpoB* sequence analysis was not sufficient to clearly differentiate between these species. Therefore, the isolates were further investigated using *fusA* allele and MLST analysis. *C. sakazakii* was the dominant species in this study, which corresponds to the first study on the prevalence of *Cronobacter* isolates from powdered infant food products (Study 1). However, two isolates were *C. turicensis*, and one was *C. muytjensii*. These findings, however, require further consideration. The frequent occurrence of *Cronobacter* spp. in raw dry pasta could warrant further risk assessment, including for vulnerable consumer groups beyond infants. Currently, there are no regulations for *Cronobacter* spp. in foods other than infant formula, and there is no published evidence of foodborne illnesses caused by *Cronobacter* spp. from other foods. However, other studies in the literature suggest that there may be clinically relevant sources of *Cronobacter* infections in older adults, and plant-based foods cannot be ruled out.

In addition to the examination of *Cronobacter* spp. in infant foods (Study 1) and infant cereals (Study 2) in Germany, a study on follow-up foods from Indonesia was conducted regarding *Enterobacteriaceae*, including *Cronobacter* spp. The final study in this thematic section (Study 4) investigated the contamination situation of infant food products from Southeast Asia, particularly concerning the occurrence of *Enterobacteriaceae* species in finished follow-up food products. *Enterobacteriaceae* are not classical pathogens but are bacteria involved in opportunistic infections that can be transmitted through food. The investigations confirmed the high detection frequency of *Enterobacteriaceae* in products from several local manufacturers. The characterization of the *Enterobacteriaceae* isolates showed a wide range, including *E. sakazakii* and other *Enterobacteriaceae* such as *Pantoea* spp., *E. hermannii*, *E. cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter* spp., *Serratia* spp., and *E. coli*. Particularly noteworthy was the high prevalence of *E. sakazakii*, which was detected in 13.5% of the samples, one of the highest reported values at the time of this study's publication. The findings of this study provide an important data basis for future exposure assessments. The infection risk posed by opportunistic pathogens in powdered infant formula primarily affects preterm and neonate

5 Summary

infants. However, follow-up foods, which are partly recommended for infants from four months, and which tested positive for *E. sakazakii* in this study, should also be considered potentially dangerous. Medical monitoring in Indonesia is not well-established, and statistical data on infant health is lacking. Nevertheless, a relatively high proportion of infants in Indonesia may have nutritional or immunity deficiencies, making them a high-risk group for infections with *E. sakazakii* and other opportunistic pathogens. If powdered infant formula is not prepared and stored properly, these products could therefore pose a significant health risk to infants in Indonesia.

The studies in the second thematic section focus on the development of rapid detection methods for *Cronobacter* spp. using molecular techniques in ready-to-eat infant formula products, aiming to enhance the microbiological safety of these products. Based on the findings of this research, a more precise identification and characterization of all *Cronobacter* isolates from contaminated infant formula that bypassed manufacturers' quality controls would improve the accuracy of specific risk assessments. In particular, the newly developed PCR-based detection methods (Study 6) and the NALFIA system (Study 5) represent significant advancements in identifying potential clusters of specific strains in various infant formula products. A notable breakthrough was achieved with the development of the NALFIA system, which combines the efficiency of PCR amplification with the sensitivity and user-friendliness of lateral flow immunoassays. This system enables specific and sensitive detection of *Cronobacter sakazakii* and *Cronobacter malonaticus* in infant formula at detection limits below 10^2 CFU/ml. The ability to provide results within less than two hours represents a significant improvement over time-consuming culture-based methods. The integration of heterobifunctional DNA probes and the detection of their degradation products further enhance the reliability and specificity of the test. The NALFIA system offers a practical, sensitive, and specific alternative to traditional detection methods. Its implementation could significantly improve the microbiological safety of infant formula by strengthening quality control measures and reducing infection risks for vulnerable populations, such as infants and young children. In the second study (Study 6), two genus-specific PCR methods for *Cronobacter* spp. were developed based on sequences of the 16S rRNA gene. Variations in the hypervariable regions V1, V2, and V3 enabled the construction of the PCR2 system, which reliably identifies *Cronobacter* spp. and differentiates them from other *Enterobacteriaceae*. The PCR2 system appears promising for detecting *Cronobacter* spp. either after primary culture on standard media or directly in non-selective enrichment media. This method has the potential to enhance the diagnosis of *Cronobacter* spp. in food products and neonatal infections by enabling rapid and specific identification. In summary, the developed molecular detection methods represent significant advancements that enhance the control and safety of infant formula production. They enable faster, more specific and reliable identification of *Cronobacter* spp. while

5 Summary

simultaneously simplifying and accelerating microbiological diagnostics. These innovations strengthen quality control measures and reduce the infection risk for highly vulnerable populations, such as infants and young children.

6 Literaturverzeichnis

1. Abdel-Galil, F.Y., H.K. Abdel-Latif, A.M. Ammar, S.M.E Fathy (2014): Studies on prevalence, antimicrobial resistance and survival of *Cronobacter sakazakii*. Int. J. Health Sci. Res. 6(3):95-106. doi: 10.21608/zjps.2014.38173.
2. Adamson, D.M., J.R. Rogers (1981): *Enterobacter sakazakii* meningitis with sepsis, Clinical Microbiology Newsletter 3:19-20. doi:10.1016/S0196-4399(81)80039-6.
3. Adékambi, T., M. Drancourt, D. Raoult (2009): The *rpoB* gene as a tool for clinical microbiologists. Trends Microbiol. 17(1):37-45. doi: 10.1016/j.tim.2008.09.008.
4. Adekunle, A., V.P. Valdramidis, B.K. Tiwari, N. Slone, P.J. Cullen, C.P. Donnell, A. Scannell (2010): Resistance of *Cronobacter sakazakii* in reconstituted powdered infant formula during ultrasound at controlled temperatures: a quantitative approach on microbial responses. Int. J. Food Microbiol. 142(1-2): 53-9. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.05.028.
5. Adeolu, M., S. Alnajjar, S. Naushad, S.R. Gupta (2016): Genome-based phylogeny and taxonomy of the 'Enterobacteriales': proposal for *Enterobacterales* ord. nov. divided into the families *Enterobacteriaceae*, *Erwiniaceae* fam. nov., *Pectobacteriaceae* fam. nov., *Yersiniaceae* fam. nov., *Hafniaceae* fam. nov., *Morganellaceae* fam. nov., and *Budviciaceae* fam. nov.. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 66(12):5575-5599. doi: 10.1099/ijsem.0.001485.
6. Alatoon, AA., S.A. Cunningham, S.M. Ihde, J. Mandrekar, R. Patel (2011): Comparison of direct colony method versus extraction method for identification of gram-positive cocci by use of Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. J. Clin. Microbiol. 49(8):2868-73. doi: 10.1128/JCM.00506-11.
7. Al-Holy, M.A., L.F. Castro, H.M. Al-Qadiri (2010): Inactivation of *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) in infant formula using lactic acid, copper sulfate and monolaurin. Lett Appl Microbiol. 50(3):246-51. doi: 10.1111/j.1472-765X.2009.02782.x.
8. Almajed, F.S., S.J. Forsythe (2016): *Cronobacter sakazakii* clinical isolates overcome host barriers and evade the immune response. Microb. Pathog. 90:55-63. doi: 10.1016/j.micpath.2015.11.014.
9. Alsonosi, A., S. Hariri, M. Kajsík, M. Orišková, V. Hanulík, M. Röderová, J. Petrželová, H. Kollárová, H. Drahovská, S. Forsythe, O. Holý (2015): The speciation and genotyping of *Cronobacter* isolates from hospitalised patients. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 34(10):1979-88. doi: 10.1007/s10096-015-2440-8.
10. Arbatsky, N.P., M. Wang, A.S. Shashkov, A.O. Chizhov, L. Feng, Y.A. Knirel, L. Wang (2010): Structure of the O-polysaccharide of *Cronobacter sakazakii* O2 with a randomly O-acetylated l-rhamnose residue. Carbohydr. Res. 345(14):2090-4. doi: 10.1016/j.carres.2010.07.014.

11. Arku, B., S. Fanning, K. Jordan (2011): Heat adaptation and survival of *Cronobacter* spp. (formerly *Enterobacter sakazakii*). *Foodborne Pathog. Dis.* 8(9):975-81. doi: 10.1089/fpd.2010.0819.
12. Arseni, A., E. Malamou-Ladas, C. Koutsia, M. Xanthou, E. Trika (1987): Outbreak of colonization of neonates with *Enterobacter sakazakii*. *J. Hospital Infec.* 9(2):143-150. doi: 10.1016/0195-6701(87)90052-1.
13. Arslan, S., H.G. Ertürk. (2021): Occurrence, virulence and antimicrobial susceptibility profiles of *Cronobacter* spp. from ready-to-eat foods. *Curr. Microbiol.* 78(9):3403-3416. doi: 10.1007/s00284-021-02585-8.
14. Asato, V.C., V.E. Vilches, M.G. Pineda, E. Casanueva, A. Cane, M.P. Moroni, S.P. Brengi, M.G. Pichel (2013): First clinical isolates of *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) in Argentina: characterization and subtyping by pulsed-field gel electrophoresis. *Rev. Argent. Microbiol.* 45(3):160-4. doi: 10.1016/s0325-7541(13)70018-x.
15. Back, S., H. Jin, S. Lee (2009): Inhibitory effect of organic acids against *Enterobacter sakazakii* in laboratory media and liquid foods. *Food Control*, 20(10):867-872. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.11.002>
16. Baldwin, A., M. Loughlin, J. Caubilla-Barron, E. Kucerova, G. Manning, C. Dowson, S. Forsythe (2009): Multilocus sequence typing of *Cronobacter sakazakii* and *Cronobacter malonaticus* reveals stable clonal structures with clinical significance which do not correlate with biotypes. *BMC Microbiol.* 9:223. doi: 10.1186/1471-2180-9-223.
17. Balebona, C.M., M.A. Morinigo, R. Cornax, J.J. Borrego, V.M. Torregrossa, M.J. Gauthier (1990): Modified most-probable-number technique for the specific determination of *Escherichia coli* from environmental samples using a fluorogenic method *J. Microbiol. Methods* 12:235-245
18. Baltimore, R.S., R.L. Duncan, E.D. Shapiro, S.C. Edberg (1989): Epidemiology of pharyngeal colonization of infants with aerobic gram-negative rod bacteria. *J. Clin. Microbiol.* 27(1):91-5. doi: 10.1128/jcm.27.1.91-95.1989.
19. Bar-Oz, B., A. Preminger, O. Peleg, C. Block, I. Arad (2001): *Enterobacter sakazakii* infection in the newborn. *Acta Paediatr.* 90(3):356-8. Doi: 10.1111/j.1651-2227.2001.tb00319.x
20. Barreira, E.R., D.C. de Souza, P. de Freitas G'ois, J.C. Fernandes (2003): *Enterobacter sakazakii* meningitis in a newborn infant: case report. *Pediatrics* 25:65–70
21. Barron, J.C., S.J. Forsythe (2007): Dry stress and survival time of *Enterobacter sakazakii* and other *Enterobacteriaceae* in dehydrated powdered infant formula. *J. Food Prot.* 70(9):2111-7. doi: 10.4315/0362-028x-70.9.2111.

22. Bartolucci, L., A. Pariani, F. Westall, F. Gardini, M.E. Guerzoni (1996): A proposed method for determining bacterial colonization in drinking-water pipe networks. *Water Supply* 14(3):457-463.
23. Baumgartner, A., M. Grand, M. Liniger, C. Iversen (2009): Detection and frequency of *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) in different categories of ready-to-eat foods other than infant formula. *Int. J. Food Microbiol.* 136(2):189-92. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.04.009.
24. Belal, M., A. Al-Mariri, L. Hallab, I. Hamad (2013): Detection of *Cronobacter* spp. (formerly *Enterobacter sakazakii*) from medicinal plants and spices in Syria. *J. Infect. Dev. Ctries.* 7(2):082-089.
25. Berthold-Pluta, A., M. Garbowska, I. Stefańska, A. Pluta (2017): Microbiological quality of selected ready-to-eat leaf vegetables, sprouts and non-pasteurized fresh fruit-vegetable juices including the presence of *Cronobacter* spp. *Food Microbiol.* 65:221-230. doi: 10.1016/j.fm.2017.03.005.
26. Beuchat, L.R., H. Kim, J.B. Gurtler, L.C. Lin, J.H. Ryu, G.M. Richards (2009): *Cronobacter sakazakii* in foods and factors affecting its survival, growth, and inactivation. *Int. J. Food Microbiol.* 136(2):204-13. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.02.029.
27. Biering, G., S. Karlsson, N.C. Clark, K.E. Jónsdóttir, P. Lúdvígsson, O. Steingrímsson (1989): Three cases of neonatal meningitis caused by *Enterobacter sakazakii* in powdered milk. *J. Clin. Microbiol.* 27(9):2054-6. doi: 10.1128/jcm.27.9.2054-2056.1989.
28. Bizzini, A., K. Jatón, D. Romo, J. Bille, G. Prod'hom, G. Greub (2011): Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry as an alternative to 16S rRNA gene sequencing for identification of difficult-to-identify bacterial strains. *J. Clin. Microbiol.* 49(2):693-6. doi: 10.1128/JCM.01463-10.
29. Blažková, M., B. Javurkova, J. Vlach, S. Goselova, P. Ogrodzki, S. Forsythe, L. Fukal (2015): Diversity of O-antigen designations within the genus *Cronobacter*: from disorder to order. *Appl. Environ. Microbiol.* 81:5574–82
30. Block, C., O. Peleg, N. Minster, B. Bar-Oz, A. Simhon, I. Arad, M. Shapiro (2002): Cluster of neonatal infections in Jerusalem due to unusual biochemical variant of *Enterobacter sakazakii*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 21(8):613-6. doi: 10.1007/s10096-002-0774-5.
31. Boehme, S., G. Werner, I. Klare, R. Reissbrodt, W. Witte (2004): Occurrence of antibiotic-resistant enterobacteria in agricultural foodstuffs. *Mol. Nutr. Food Res.* 48(7):522-31. doi: 10.1002/mnfr.200400030.
32. Boué, G., E. Cummins, S. Guillou, J.P. Antignac, B. Le Bizec, J.M. Membré (2017): Development and application of a probabilistic risk-benefit assessment model for infant

- feeding integrating microbiological, nutritional, and chemical components. *Risk Anal.* 37(12):2360-2388. doi: 10.1111/risa.12792.
33. Bowen, A., H.C. Wiesenfeld, J.L. Kloesz, A.W. Pasculle, A.J. Nowalk, L. Brink, E. Elliot, H. Martin, C.L. Tarr (2017) Notes from the Field: *Cronobacter sakazakii* Infection Associated with Feeding Extrinsically Contaminated Expressed Human Milk to a Premature Infant - Pennsylvania, 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 66(28):761-762. doi: 10.15585/mmwr.mm6628a5.
 34. Bowen, A.B., C.R. Braden (2006): Invasive *Enterobacter sakazakii* disease in infants. *Emerg Infect Dis.* 12(8):1185-9. doi: 10.3201/eid1208.051509.
 35. Brady, C., I. Cleenwerck, S. Venter, T. Coutinho, P. De Vos (2013): Taxonomic evaluation of the genus *Enterobacter* based on multilocus sequence analysis (MLSA): proposal to reclassify *E. nimipressuralis* and *E. amnigenus* into *Lelliottia* gen. nov. as *Lelliottia nimipressuralis* comb. nov. and *Lelliottia amnigena* comb. nov., respectively, *E. gergoviae* and *E. pyrinus* into *Pluralibacter* gen. nov. as *Pluralibacter gergoviae* comb. nov. and *Pluralibacter pyrinus* comb. nov., respectively, *E. cowanii*, *E. radicincitans*, *E. oryzae* and *E. arachidis* into *Kosakonia* gen. nov. as *Kosakonia cowanii* comb. nov., *Kosakonia radicincitans* comb. nov., *Kosakonia oryzae* comb. nov. and *Kosakonia arachidis* comb. nov., respectively, and *E. turicensis*, *E. helveticus* and *E. pulveris* into *Cronobacter* as *Cronobacter zurichensis* nom. nov., *Cronobacter helveticus* comb. nov. and *Cronobacter pulveris* comb. nov., respectively, and emended description of the genera *Enterobacter* and *Cronobacter*. *Syst. Appl. Microbiol.* 36(5):309-19. doi: 10.1016/j.syapm.2013.03.005.
 36. Brandão, M.L.L., N.S. Umeda, E. Jackson, S.J. Forsythe, I. de Filippis: (2017): Isolation, molecular and phenotypic characterization, and antibiotic susceptibility of *Cronobacter* spp. from Brazilian retail foods. *Food Microbiol.* 63:129-138. doi: 10.1016/j.fm.2016.11.011.
 37. Breeuwer, P., A. Lardeau, M. Peterz, H.M. Joosten (2003): Desiccation and heat tolerance of *Enterobacter sakazakii*. *J. Appl. Microbiol.* 95(5):967-73. doi: 10.1046/j.1365-2672.2003.02067.x.
 38. Brengi, S.P., S.B. O'Brien, M. Pichel, C. Iversen, M. Arduino, N. Binsztein, B. Jensen, F. Pagotto, E.M. Ribot, R. Stephan, N. Cernela, K. Cooper, S. Fanning (2012): Development and validation of a PulseNet standardized protocol for subtyping isolates of *Cronobacter* species. *Foodborne Pathog Dis.* 9(9):861-7. doi: 10.1089/fpd.2012.1161.
 39. Brenner, D.J. (1974): DNA reassociation for the clinical differentiation of enteric bacteria. *Public Health Lab.* 32:118–130.

6 Literaturverzeichnis

40. Bulgarelli, M.A., L.R. Beuchat, K.H. McWatters (1988): Microbiological quality of cowpea paste used to prepare Nigerian Akara. *J. Food Sci.* 53:442-444. doi: 10.1111/j.1365-2621.1988.tb07726.x.
41. Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) -Report 18.2 Berichte zur Lebensmittelsicherheit 2022, Berlin, Deutschland.
42. Cabassi, C.S., S. Taddei, G. Predari, G. Galvani, F. Ghidini, E. Schiano, S. Cavirani: (2004): Bacteriologic findings in ostrich (*Struthio camelus*) eggs from farms with reproductive failures. *Avian Dis.* 48(3):716-22. doi: 10.1637/7142.
43. Call, D.R., M.K. Bakko, M.J. Krug, M.C. Roberts (2003): Identifying antimicrobial resistance genes with DNA microarrays. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47(10):3290-5. doi: 10.1128/AAC.47.10.3290-3295.2003.
44. Camper, A.K., M.W. LeChevallier, S.C. Broadaway, G.A. McFeters (1986): Bacteria associated with granular activated carbon particles in drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* 52(3):434-8. doi: 10.1128/aem.52.3.434-438.1986.
45. Carvalho, G.G., A.P. Calarga, J.R. Teodoro, M.M. Queiroz, C.A. Astudillo-Trujillo, C.E. Levy, M. Brocchi, D.Y. Kabuki (2020): Isolation, comparison of identification methods and antibiotic resistance of *Cronobacter* spp. in infant foods. *Food Res. Int.* 137:109643. doi: 10.1016/j.foodres.2020.109643.
46. Casalnuovo, F., P. Rippa, L. Battaglia, N. Parisi (2014): Isolation of *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) from artisanal Mozzarella. *Ital. J. Food Saf.* 3(1):1526. doi: 10.4081/ijfs.2014.1526.
47. Castano, A., M.C. García Fontán, B. Prieto, M.E. Tornadijo, J. Carballo (2001): Counts, behaviour and species of *Enterobacteriaceae* during the manufacture of dry-cured lacon, a Spanish traditional meat-product. *Alimentaria* 323:61-66.
48. Caubilla-Barron, J., E. Hurrell, S. Townsend, P. Cheetham, C. Loc-Carrillo, O. Fayet, M.F. Prère, S.J. Forsythe (2007): Genotypic and phenotypic analysis of *Enterobacter sakazakii* strains from an outbreak resulting in fatalities in a neonatal intensive care unit in France. *J. Clin. Microbiol.* 45(12):3979-85. doi: 10.1128/JCM.01075-07.
49. Cechin, C.D.F., G.G. Carvalho, D.Y. Kabuki (2024): Occurrence, genetic characterization, and antibiotic susceptibility of *Cronobacter* spp. isolated from low water activity functional foods in Brazil. *Food Microbiol.* 122:104570. doi: 10.1016/j.fm.2024.104570.
50. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2002): *Enterobacter sakazakii* infections associated with the use of powdered infant formula-Tennessee, 2001. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 51(14):297-300. Verfügbar in <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5114a1.htm>

51. Cetin, S., H.R. Ford, L.R. Sysko, C. Agarwal, J. Wang, M.D. Neal, C. Baty, G. Apodaca, D.J. Hackam (2004): Endotoxin inhibits intestinal epithelial restitution through activation of Rho-GTPase and increased focal adhesions. *J. Biol. Chem.* 279(23):24592-600.
52. Cetinkaya, E., S. Joseph, K. Ayhan, S.J. Forsythe (2013): Comparison of methods for the microbiological identification and profiling of *Cronobacter* species from ingredients used in the preparation of infant formula. *Mol. Cell Probes.* 27(1):60-4. doi: 10.1016/j.mcp.2012.10.003.
53. Chap, J., P. Jackson, R. Siqueira, N. Gaspar, C. Quintas, J. Park, T. Osaili, R. Shaker, Z. Jaradat, S.H. Hartantyo, N. Abdullah Sani, S. Estuningsih, S.J. Forsythe (2009): International survey of *Cronobacter sakazakii* and other *Cronobacter* spp. in follow up formulas and infant foods. *Int. J. Food Microbiol.* 136(2):185-8. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.08.005.
54. Chaves, C.E.V., M.L.L Brandã, M.L.G.G. Lacerda, C.A.B.C. Rocha, S.M.D.V. Leone de Oliveira, T.C. Parpinelli, L. Vasconcellos, S.J. Forsythe, A.M.M. Paniago (2018): Fatal *Cronobacter sakazakii* Sequence Type 494 Meningitis in a Newborn, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* 24(10):1948-1950. doi: 10.3201/eid2410.180373.
55. Chaves-López, C., M. De Angelis, M. Martuscelli, A. Serio, A. Paparella, G. Suzzi (2006): Characterization of the *Enterobacteriaceae* isolated from an artisanal Italian ewe's cheese (Pecorino Abruzzese). *J. Appl. Microbiol.* 101(2):353-60. doi: 10.1111/j.1365-2672.2006.02941.x.
56. Chen, F., X. Ming, X. Chen, M. Gan, B. Wang, F. Xu, H. Wei (2014): Immunochromatographic strip for rapid detection of *Cronobacter* in powdered infant formula in combination with silica-coated magnetic nanoparticles separation and 16S rRNA probe. *Biosens. Bioelectron.* 61:306-13. doi: 10.1016/j.bios.2014.05.033.
57. Chenu, J.W., J.M. Cox (2009): *Cronobacter* ('*Enterobacter sakazakii*'): current status and future prospects. *Lett. Appl. Microbiol.* 49(2):153-9. doi: 10.1111/j.1472-765X.2009.02651.x.
58. Choi, S.H., J.J. Choi, S.B. Lee (1999): Gram-negative bacteria selective medium to detect post-pasteurization contamination of market milk by using dye reduction test. *Korean J. Dairy Sci.* 21:231-240.
59. Chon, J.W., K.Y. Song, S.Y. Kim, J.Y. Hyeon, K.H. Seo (2012): Isolation and characterization of *Cronobacter* from desiccated foods in Korea. *J. Food Sci.* 77(7):M354-8. doi: 10.1111/j.1750-3841.2012.02750.x.
60. Clark, N.C., B.C. Hill, C.M. O'Hara, O. Steingrimsson, R.C. Cooksey (1990): Epidemiologic typing of *Enterobacter sakazakii* in two neonatal nosocomial outbreaks. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 13(6):467-72. doi: 10.1016/0732-8893(90)90078-a.

61. Codex Alimentarius Commission (CAC) 2008: Code of hygienic practice for powdered formulae for infants and young children CAC/RCP Rep. 66–2008, FAO New York.
62. Aguirre Conde, A., A. Pérez Legorburu, I. Echániz Urcelay, Z. Hernando Zárate, J.K. Arrate Zugazabeitia (2007): Sepsis neonatal por *Enterobacter sakazakii* (Neonatal sepsis due to *Enterobacter sakazakii*). *Anales de Pediatría* (Barcelona), 66: 196–197.
63. Cordier, J.L. (2007): Production of powdered infant formulae and microbiological control measures. In *Enterobacter sakazakii*; John Wiley & Sons, Ltd.: Hoboken, NJ, USA, pp. 145–185 doi: 10.1128/9781555815608.ch6.
64. Corti, G., I. Panunzi, M. Losco, R. Buzzi. (2007): Postsurgical osteomyelitis caused by *Enterobacter sakazakii* in a healthy young man. *J. Chemother.* 19(1):94-6. doi: 10.1179/joc.2007.19.1.94.
65. Costerton, J.W., Z. Lewandowski, D.E. Caldwell, D.R. Korber, H.M. Lappin-Scott (1995): Microbial biofilms. *Annu. Rev. Microbiol.* 49:711-45. doi: 10.1146/annurev.mi.49.100195.003431.
66. Cottyn, B., E. Regalado, B. Lanoot, M. De Cleene, T.W. Mew, J. Swings (2001): Bacterial populations associated with rice seed in the tropical environment. *Phytopathology* 91(3):282-92. doi: 10.1094/PHYTO.2001.91.3.282
67. Coulin, P., Z. Farah, J. Assanvo, H. Spillmann, Z. Puhan (2006): Characterisation of the microflora of attiéké, a fermented cassava product, during traditional small-scale preparation. *Int. J. Food Microbiol.* 106(2):131-6. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2005.06.012.
68. Craven, H.M., C.M. McAuley, L.L. Duffy, N. Fegan (2010): Distribution, prevalence and persistence of *Cronobacter* (*Enterobacter sakazakii*) in the nonprocessing and processing environments of five milk powder factories. *J. Appl. Microbiol.* 109(3):1044-52. doi: 10.1111/j.1365-2672.2010.04733.x.
69. Cruz, A., J. Xicohtencatl-Cortes, B. González-Pedrajo, M. Bobadilla, C. Eslava, I. Rosas (2011): Virulence traits in *Cronobacter* species isolated from different sources. *Can. J. Microbiol.* 57(9):735-44. doi: 10.1139/w11-063.
70. Cruz-Córdova, A., L.M. Rocha-Ramírez, S.A. Ochoa, B. González-Pedrajo, N. Espinosa, C. Eslava, U. Hernández-Chiñas, G. Mendoza-Hernández, A. Rodríguez-Leviz, P. Valencia-Mayoral, S. Sadowinski-Pine, R. Hernández-Castro, I. Estrada-García, O. Muñoz-Hernández, I. Rosas, J. Xicohtencatl-Cortes (2012): Flagella from five *Cronobacter* species induce pro-inflammatory cytokines in macrophage derivatives from human monocytes. *PLoS One* 7(12):e52091. doi: 10.1371/journal.pone.0052091. Erratum in: *PLoS One*. 2013;8(5).
71. Cui, J., X. Du, H. Liu, G. Hu, G. Lv, B. Xu, X. Yang, W. Li, Z. Cui (2014). The genotypic characterization of *Cronobacter* spp. isolated in China. *PLoS One*. 16;9(7):e102179. doi: 10.1371/journal.pone.0102179.

72. Cui, J., J. Hu, X. Du, C. Yan, G. Xue, S. Li, Z. Cui, H. Huang, J. Yuan (2019): Genomic Analysis of Putative Virulence Factors Affecting Cytotoxicity of *Cronobacter*. *Front. Microbiol.* 10:3104. doi: 10.3389/fmicb.2019.03104.
73. Cui, J.H., B. Yu, Y. Xiang, Z. Zhang, T. Zhang, Y.C. Zeng, Z.G. Cui, X.X. Huo (2017): Two Cases of Multi-antibiotic Resistant *Cronobacter* spp. Infections of infants in China. *Biomed. Environ. Sci.* 30(8):601-605. doi: 10.3967/bes2017.079.
74. Cui, J.H., X.L. Du, R.J. Wei, H.J. Zhou, W. Li, S. Forsythe, Z.G. Cui (2015): Multilocus sequence typing analysis of *Cronobacter* spp. isolated from China. *Arch. Microbiol.* 197(5):665-72. doi: 10.1007/s00203-015-1097-0.
75. CXC 66-2008; Code of Hygienic Practice for Powdered Formulae for Infants and Young Children. CAC Standards: Ottawa, ON, Canada, 2008.
76. Czerwicka, M., K. Marszewska, S.J. Forsythe, A. Bychowska, A. Mazgajczyk, H. Dziadziuszko, K. Ossowska, P. Stepnowski, Z. Kaczyński (2013): Chemical structure of the O-polysaccharides isolated from *Cronobacter turicensis* sequence type 5 strains 57, 564, and 566. *Carbohydr. Res.* 373:89-92. doi: 10.1016/j.carres.2013.03.003.
77. Czerwicka, M., S.J. Forsythe, A. Bychowska, H. Dziadziuszko, D. Kunikowska, P. Stepnowski, Z. Kaczyński (2010): Structure of the O-polysaccharide isolated from *Cronobacter sakazakii* 767. *Carbohydr. Res.* 345(7):908-13. doi: 10.1016/j.carres.2010.01.020.
78. Dahlenborg, M., E. Borch, P. Rådström (2001): Development of a combined selection and enrichment PCR procedure for *Clostridium botulinum* Types B, E, and F and its use to determine prevalence in fecal samples from slaughtered pigs. *Appl. Environ. Microbiol.* 67(10):4781-8. doi: 10.1128/AEM.67.10.4781-4788.2001.
79. Dancer, G.I., J.H. Mah, M.S. Rhee, I.G. Hwang, D.H. Kang (2009): Resistance of *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) to environmental stresses. *J. Appl. Microbiol.* 107(5):1606-14. doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04347.x.
80. Dauga, C., P. Breuwer (2008): Taxonomy and Physiology of *Enterobacter sakazakii* (pages 1-26) in *Enterobacter sakazakii*. Editor(s): J. M. Farber, S. J. Forsythe, M. P. Doyle. ASM Press. ISBN: 9781683671541. doi: 10.1128/9781555815608.
81. De Clerck, E., T. Vanhoutte, T. Hebb, J. Geerinck, J. Devos, P. De Vos (2004): Isolation, characterization, and identification of bacterial contaminants in semifinal gelatin extracts. *Appl. Environ. Microbiol.* 70(6):3664-72. doi: 10.1128/AEM.70.6.3664-3672.2004.
82. De Haast, J., T.J. Britz (1986): Characterization of aerobic and facultative anaerobic bacteria from the liquid phase of an anaerobic fixed-bed digester treating a cheese whey substrate. *Microb. Ecol.* 12(2):173-9. doi: 10.1007/BF02011201.

83. Denter, J., B. Bisping (1994): Formation of B-vitamins by bacteria during the soaking process of soybeans for tempe fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 22(1):23-31. doi: 10.1016/0168-1605(94)90004-3.
84. Depardieu, F., I. Podglajen, R. Leclercq, E. Collatz, P. Courvalin (2007): Modes and modulations of antibiotic resistance gene expression. *Clin. Microbiol. Rev.* 20(1):79-114. doi: 10.1128/CMR.00015-06.
85. Dou, Y., F. Zhang, Y. Zhang, Y. Chen, G. Zhou (2015): Detection and analysis of two food-borne pathogens in tea samples from Wuhan market. *Food Science* 36(10):195. doi: 10.7506/spkx1002-6630-201510039
86. Drudy, D., M. O'Rourke, M. Murphy, N.R. Mullane, R. O'Mahony, L. Kelly, M. Fischer, S. Sanjaq, P. Shannon, P. Wall, M. O'Mahony, P. Whyte, S. Fanning (2006): Characterization of a collection of *Enterobacter sakazakii* isolates from environmental and food sources. *Int. J. Food Microbiol.* 110(2):127-34. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2006.02.008.
87. Edelson-Mammel, S.G., M.K. Porteous, R.L. Buchanan (2005): Survival of *Enterobacter sakazakii* in a dehydrated powdered infant formula. *J. Food Prot.* 68(9):1900-2. doi: 10.4315/0362-028x-68.9.1900.
88. Edelson-Mammel, S.G., M.K. Porteous, R.L. Buchanan (2006): Acid resistance of *Enterobacter sakazakii*, and impact of habituating the cells to an acidic environment. *J. Food Sci.* 71:201-207
89. Edelson-Mammel, S.G., R.L. Buchanan (2004): Thermal inactivation of *Enterobacter sakazakii* in rehydrated infant formula. *J. Food Prot.* 67(1):60-3. doi: 10.4315/0362-028x-67.1.60.
90. El-Gamal, M.S., R.K. El Dairouty, A.Y. Okda, S.H. Salah, S.M. El-Shamy (2013): Incidence and interrelation of *Cronobacter sakazakii* and other foodborne bacteria in some milk products and infant formula milks in Cairo and Giza area. *World Applied Sciences Journal* 26(9):1129-1141. doi: 10.5829/idosi.wasj.2013.26.09.13542
91. El-Sharoud, W.M., M.Z. El-Din, D.M. Ziada, S.F. Ahmed, J.D. Klena (2008): Surveillance and genotyping of *Enterobacter sakazakii* suggest its potential transmission from milk powder into imitation recombined soft cheese. *J. Appl. Microbiol.* 105(2):559-66. doi: 10.1111/j.1365-2672.2008.03777.x.
92. El-Sharoud, W.M., S. O'Brien, C. Negredo, C. Iversen, S. Fanning, B. Healy B (2009): Characterization of *Cronobacter* recovered from dried milk and related products. *BMC Microbiol.* 9:24. doi: 10.1186/1471-2180-9-24.
93. Emami, C.N., R. Mittal, L. Wang, H.R. Ford, N.V. Prasadarao (2011): Recruitment of dendritic cells is responsible for intestinal epithelial damage in the pathogenesis of

- necrotizing enterocolitis by *Cronobacter sakazakii*. J. Immunol. 186(12):7067-79. doi: 10.4049/jimmunol.1100108.
94. Emery, C.L., L.A. Weymouth (1997): Detection and clinical significance of extended-spectrum beta-lactamases in a tertiary-care medical center. J. Clin. Microbiol. 35(8):2061-7. doi: 10.1128/jcm.35.8.2061-2067.1997.
 95. Eshwar, A.K., T. Tasara, R. Stephan, A. Lehner (2015): Influence of FkpA variants on survival and replication of *Cronobacter* spp. in human macrophages. Res Microbiol. 166(3):186-95. doi: 10.1016/j.resmic.2015.02.005.
 96. Estuningsih, S. and Sani, N.A. (2008): Powdered infant formula in developing and other countries – issues and prospects. In *Enterobacter sakazakii* In *Enterobacter sakazakii* (Emerging Issues in Food Safety) ed. J.M. Farber and S.J. Forsythe pp. 221–234. Washington, DC: ASM Press.
 97. European Commission (EC) (2005): Commission Regulation (EC) No. 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs. Available at: http://www.fsai.ie/uploadedFiles/Reg2073_2005%281%29.pdf.
 98. FAO/WHO (2004): Workshop on *Enterobacter sakazakii* and other microorganism in powdered infant formula. World Health Organization, Rome, Italy (2004), p. 59 Rome, Italy; Geneva, Switzerland
 99. FAO/WHO (2006): *Enterobacter sakazakii* and *Salmonella* in powdered infant formula: meeting report. Microbiological Risk Assessment Series No.10, Rome, Italy.
 100. FAO/WHO (2008): *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) in powdered following formula: meeting report. Microbiological Risk Assessment Series No.15 (MRA), Rome, Italy (2008), p. 97 Available at: http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/mra_followup/en/
 101. Farmer, J.J. III, A.M. Hickmann, D.J. Brenner (1980): *Enterobacter sakazakii*: a new species of 'Enterobacteriaceae' isolated from clinical specimens. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 30, 569–584. doi:10.1099/00207713-30-3-569.
 102. Farmer, J.J., B.R. Davis, F.W. Hickman-Brenner, A. McWhorter, G.P. Huntley-Carter, M.A. Asbury, C. Riddle, H.G. Wathen-Grady, C. Elias, G.R. Fanning (1985): Biochemical identification of new species and biogroups of *Enterobacteriaceae* isolated from clinical specimens. J. Clin. Microbiol. 21:1. <https://doi.org/10.1128/jcm.21.1.46-76.1985>
 103. Farmer, J.J., M.A. Asbury, F.W. Hickman, D.J. Brenner, the *Enterobacteriaceae* Study Group (USA) (1980): *Enterobacter sakazakii*: a new species of "*Enterobacteriaceae*" isolated from clinical specimens. Int. J. Syst. Bacteriol. 30:569-584.
 104. FDA (2022) - U.S. Food and Drug Administration. GenomeTrakr Network. Available online: <https://www.fda.gov/food/whole-genome-sequencing-wgs-program/genometrakr-network> (accessed on 5 May 2022).

105. FDA/CFSAN, Isolation and enumeration of *Enterobacter sakazakii* from dehydrated powdered infant formula [Online] <http://www.cfsan.fda.gov/~comm/mmesakaz.html>
106. Fei, P., C. Man, B. Lou, S.J. Forsythe, Y. Chai, R. Li, J. Niu, Y. Jiang (2015): Genotyping and source tracking of *Cronobacter sakazakii* and *C. malonaticus* isolates from powdered infant formula and an infant formula production factory in China. *Appl. Environ. Microbiol.* 81(16):5430-9. doi: 10.1128/AEM.01390-15.
107. Fei, P., H. Jing, Y. Ma, G. Dong, Y. Chang, Z. Meng, S. Jiang, Q. Xie, S. Li, X. Chen, W. Yang (2022): *Cronobacter* spp. in commercial powdered infant formula collected from nine provinces in China: Prevalence, genotype, biofilm formation, and antibiotic susceptibility. *Front. Microbiol.* 13:900690. doi: 10.3389/fmicb.2022.900690.
108. Fei, P., Y. Jiang, S. Gong, R. Li, Y. Jiang, X. Yuan, Z. Wang, H. Kang, M.A. Ali (2018): Occurrence, genotyping, and antibiotic susceptibility of *Cronobacter* spp. in drinking water and food samples from Northeast China. *J. Food Prot.* 81(3):456-460. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-17-326.
109. Fei, P., Y. Jiang, Y. Jiang, X. Yuan, T. Yang, J. Chen, Z. Wang, H. Kang, S.J. Forsythe (2017): Prevalence, molecular characterization, and antibiotic susceptibility of *Cronobacter sakazakii* isolates from powdered infant formula collected from Chinese retail markets. *Front. Microbiol.* 8:2026. doi: 10.3389/fmicb.2017.02026.
110. Filloux, A. (2011): Protein Secretion Systems in *Pseudomonas aeruginosa*: An Essay on Diversity, Evolution, and Function. *Front. Microbiol.* 2:155. doi: 10.3389/fmicb.2011.00155.
111. Flores, J.P., S.A. Medrano, J.S. Sánchez, E. Fernández-Escartín (2011): Two cases of hemorrhagic diarrhea caused by *Cronobacter sakazakii* in hospitalized nursing infants associated with the consumption of powdered infant formula. *J. Food Prot.* 74(12):2177-81. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-11-257.
112. Forlani, G., M. Mantelli, M. Branzoni, F. Nielsen, F. Favilli (1995): Differential sensitivity of plant-associated bacteria to sulfonyleurea and imidazolinone herbicides. *Plant Soil*, 176:243-253. doi: 10.1007/BF00011788.
113. Forsythe, S.J. (2018): Updates on the *Cronobacter* Genus. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 9:23-44. doi: 10.1146/annurev-food-030117-012246.
114. Forsythe, S.J., B. Dickins, K.A. Jolley (2014): *Cronobacter*, the emergent bacterial pathogen *Enterobacter sakazakii* comes of age; MLST and whole genome sequence analysis. *BMC Genomics.* 15(1):1121. doi: 10.1186/1471-2164-15-1121.
115. Fouad, K.E., G.D. Hegeman (1993): Microbial Spoilage of Tofu (Soybean Curd). *J. Food Prot.* 56(2):157-164. doi: 10.4315/0362-028X-56.2.157.
116. Franco, A.A., M.H. Kothary, G. Gopinath, K.G. Jarvis, C.J. Grim, L. Hu, A.R. Datta, B.A. McCardell, B.D. Tall (2011): Cpa, the outer membrane protease of *Cronobacter*

- sakazakii*, activates plasminogen and mediates resistance to serum bactericidal activity. Infect. Immun. 79(4):1578-87. doi: 10.1128/IAI.01165-10.
117. Friedemann, M. (2008): Gesundheitliches Gefährdungspotenzial von *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp. nov.) in Säuglingsnahrung [*Enterobacter sakazakii* in powdered infant formula]. Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz. 51(6):664-74. German. doi: 10.1007/s00103-008-0543-4.
118. Friedemann, M (2009): Epidemiology of invasive neonatal *Cronobacter* (*Enterobacter sakazakii*) infections. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 28(11):1297-304. doi: 10.1007/s10096-009-0779-4.
119. Friedemann, M. (2007): *Enterobacter sakazakii* in food and beverages (other than infant formula and milk powder). Int. J. Food Microbiol. 116(1):1-10. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2006.12.018.
120. Fu, S., J. Gao, Y. Liu, H. Chen (2011): Isolation of *Cronobacter* spp. isolates from infant formulas and their survival in the production process of infant formula. Czech J. Food Sci. 29(4):391-399. doi: 10.17221/255/2010-CJFS.
121. Fu, Z.P., S. Lee, R.Y. Wang, Y.Q. Wang (2024): *Cronobacter sakazakii* induced sepsis-associated arrhythmias through its outer membrane vesicles. iScience. 27(9):110572. doi: 10.1016/j.isci.2024.110572.
122. Gakuya, F.M., M.N. Kyule, P.B. Gathura, S. Kariuki (2001): Antimicrobial resistance of bacterial organisms isolated from rats. East Afr. Med. J. 78(12):646-9. doi: 10.4314/eamj.v78i12.8934.
123. Gallagher, P.G., W.S. Ball (1991): Cerebral infarctions due to CNS infection with *Enterobacter sakazakii*. Pediatr. Radiol. 21:135-136.
124. Galli, A., L. Franzetti, S. Bonora, G. Ponticelli (1990): Indagine preliminare sulla qualità microbiologica delle insalate della quarta gamma. Ann. Microbiol. 40:33-46
125. Gan, X., M. Li, J. Xu, S. Yan, W. Wang, F. Li (2022): Emerging of Multidrug-Resistant *Cronobacter sakazakii* Isolated from Infant Supplementary Food in China. Microbiol. Spectr. 10(5):e0119722. doi: 10.1128/spectrum.01197-22.
126. Garbowska, M., A. Berthold-Pluta, L. Stasiak-Róžańska (2015): Microbiological quality of selected spices and herbs including the presence of *Cronobacter* spp. Food Microbiol. 49:1-5. doi: 10.1016/j.fm.2015.01.004.
127. Gardner, J.M., A.W. Feldman, R.M. Zablutowicz (1982): Identity and behavior of xylem-residing bacteria in rough lemon roots of Florida citrus trees. Appl. Environ. Microbiol. 43(6):1335-42. doi: 10.1128/aem.43.6.1335-1342.1982.
128. Gasseem, M.A (1999): Study of the micro-organisms associated with the fermented bread (khamir) produced from sorghum in Gizan region, Saudi Arabia. J. Appl. Microbiol. 86(2):221-5. doi: 10.1046/j.1365-2672.1999.00648.x.

129. Geiges, O., B. Stählin, B. Baumann (1990): The microbiological evaluation of prepared salad vegetables and sprouts Mitt. Lebensm.unters. Hyg. 81:684-721.
130. Gilmour, M.W., A.B. Olson, A.K. Andrysiak, L.K. Ng, L. Chui (2007): Sequence-based typing of genetic targets encoded outside of the O-antigen gene cluster is indicative of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serogroup lineages. J. Med. Microbiol. 56:620-628. doi: 10.1099/jmm.0.47053-0.
131. Giri, C.P., K. Shima, B.D. Tall, S. Curtis, V. Sathyamoorthy, B. Hanisch, K.S. Kim, D.J. Kopecko (2012): *Cronobacter* spp. (previously *Enterobacter sakazakii*) invade and translocate across both cultured human intestinal epithelial cells and human brain microvascular endothelial cells. Microb. Pathog. 52(2):140-7. doi: 10.1016/j.micpath.2011.10.003.
132. González, S., G.J. Flick, F.M. Arritt, D. Holliman, B. Meadows (2006): Effect of high-pressure processing on strains of *Enterobacter sakazakii*. J. Food Prot. 69(4):935-7. doi: 10.4315/0362-028x-69.4.935.
133. Gonzales-Barron, U., M.H. Zwietering, F. Butler (2013): A novel derivation of a within-batch sampling plan based on a Poisson-gamma model characterising low microbial counts in foods. Int. J. Food Microbiol. 161(2):84-96. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.11.026.
134. Gopinath, G.R., H.R. Chase, J. Gangiredla, A. Eshwar, H. Jang, I. Patel, F. Negrete, S. Finkelstein, E. Park, T. Chung, Y. Yoo, J. Woo, Y. Lee, J. Park, H. Choi, S. Jeong, S. Jun, M. Kim, C. Lee, H. Jeong, S. Fanning, R. Stephan, C. Iversen, F. Reich, G. Klein, A. Lehner, B.D. Tall (2018): Genomic characterization of malonate positive *Cronobacter sakazakii* serotype O:2, sequence type 64 strains, isolated from clinical, food, and environment samples. Gut Pathog. 10:11. doi: 10.1186/s13099-018-0238-9.
135. Gosney, M.A., M.V. Martin, A.E. Wright, M. Gallagher (2006): *Enterobacter sakazakii* in the mouths of stroke patients and its association with aspiration pneumonia. Eur. J. Intern. Med. 17(3):185-8. doi: 10.1016/j.ejim.2005.11.010.
136. Goulet, P., B. Picard (1986): Characterization of *Enterobacter cloacae* and *E. sakazakii* by electrophoretic polymorphism of acid phosphatase, esterases, and glutamate, lactate and malate dehydrogenases. J. Gen. Microbiol. 132(11):3105-12. doi: 10.1099/00221287-132-11-3105..
137. Gray, K.J., D.M. Gascoyne-Binzi, P. Nicholson, J. Heritage, P.M. Hawkey (2001): Transmissible fosfomycin resistance markers in urinary isolates and imported foodstuffs in the UK during 1994 and 1995. J. Antimicrob. Chemother. 48(5):744-5. doi: 10.1093/jac/48.5.744.
138. Grim, C.J., M.H. Kothary, G. Gopinath, K.G. Jarvis, J.J. Beaubrun, M. McClelland, B.D. Tall, A.A. Franco (2012): Identification and characterization of *Cronobacter* iron

- acquisition systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 78(17):6035-50. doi: 10.1128/AEM.01457-12.
139. Grim, C.J., M.L. Kotewicz, K.A. Power, G. Gopinath, A.A. Franco, K.G. Jarvis, Q.Q. Yan, S.A. Jackson, V. Sathyamoorthy, L. Hu, F. Pagotto, C. Iversen, A. Lehner, R. Stephan, S. Fanning, B.D. Tall (2013): Pan-genome analysis of the emerging foodborne pathogen *Cronobacter* spp. suggests a species-level bidirectional divergence driven by niche adaptation. *BMC Genomics.* 14:366. doi: 10.1186/1471-2164-14-366.
140. Grimm, M., R. Stephan, C. Iversen, G.G. Manzardo, T. Rattei, K. Riedel, A. Ruepp, D. Frishman, A. Lehner (2008): Cellulose as an extracellular matrix component present in *Enterobacter sakazakii* biofilms. *J. Food Prot.* 71(1):13-8. doi: 10.4315/0362-028x-71.1.13.
141. Grishin, A., S. Papillon, B. Bell, J. Wang, H.R. Ford (2013): The role of the intestinal microbiota in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis. *Semin Pediatr Surg.* 22(2):69-75. doi: 10.1053/j.sempedsurg.2013.01.002.
142. Guillaume-Gentil, O., V. Sonnard, M.C. Kandhai, J.D. Marugg, H. Joosten (2005): A simple and rapid cultural method for detection of *Enterobacter sakazakii* in environmental samples. *J. Food Prot.* 68(1):64-9. doi: 10.4315/0362-028x-68.1.64.
143. Gurtler, J.B., J.L. Kornacki, L.R. Beuchat (2005): *Enterobacter sakazakii*: a coliform of increased concern to infant health. *Int. J. Food Microbiol.* 104(1):1-34. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2005.02.013.
144. Gurtler, J.B., L.R. Beuchat (2005): Performance of media for recovering stressed cells of *Enterobacter sakazakii* as determined using spiral plating and ecometric techniques. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(12):7661-9. doi: 10.1128/AEM.71.12.7661-7669.2005.
145. Gurtler, J.B., L.R. Beuchat (2007): Survival of *Enterobacter sakazakii* in powdered infant formula as affected by composition, water activity, and temperature. *J. Food Prot.* 70(7):1579-86. doi: 10.4315/0362-028x-70.7.1579.
146. Habraken, C., D. Mossel, Den RSv (1986): Management of *Salmonella* risks in the production of powdered milk products. *Neth. Milk Dairy J.* 40, 99–116.
147. Hamby, S.E., S. Joseph, S.J. Forsythe, N. Chuzhanova (2011): In Silico identification of pathogenic strains of *Cronobacter* from Biochemical data reveals association of inositol fermentation with pathogenicity. *BMC Microbiol.* 11:204. doi: 10.1186/1471-2180-11-204.
148. Hamilton, J.V., M.J. Lehane, H.R. Braig (2003): Isolation of *Enterobacter sakazakii* from midgut of *Stomoxys calcitrans*. *Emerg. Infect. Dis.* 9(10):1355-6. doi: 10.3201/eid0910.030218.

6 Literaturverzeichnis

149. Hariri, S., S. Joseph, S.J. Forsythe (2013): *Cronobacter sakazakii* ST4 strains and neonatal meningitis, United States. *Emerg. Infect. Dis.* 19(1):175-7. doi: 10.3201/eid1901.120649.
150. Harris, L.S., P.J. Oriel (1989). Heteropolysaccharide produced by *Enterobacter sakazakii*. US Patent No. 4806636
151. Hartmann, I., P. Carranza, A. Lehner, R. Stephan, L. Eberl, K. Riedel (2010): Genes involved in *Cronobacter sakazakii* biofilm formation. *Appl. Environ. Microbiol.* 76(7):2251-61. doi: 10.1128/AEM.00930-09.
152. Hassan, A.A., O. Akineden, C. Kress, S. Estuningsih, E. Schneider, E. Usleber (2007): Characterization of the gene encoding the 16S rRNA of *Enterobacter sakazakii* and development of a species-specific PCR method. *Int. J. Food Microbiol.* 116(2):214-20. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2006.12.011.
153. Haston, J.C., S. Miko, J.R. Cope, H. McKeel, C. Walters, L.A. Joseph, T. Griswold, L.S. Katz, A.A. Andújar, L. Tourdot, J. Rounds, P. Vagnone, C. Medus, J. Harris, R. Geist, D. Neises, A. Wiggington, T. Smith, M.S. Im, C. Wheeler, P. Smith P, H.A. Carleton, C.C. Lee (2023): *Cronobacter sakazakii* infections in two infants linked to powdered infant formula and breast pump equipment - United States, 2021 and 2022. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 72(9):223-226. doi: 10.15585/mmwr.mm7209a2.
154. Hawkins, R.E., C.R. Lissner, J.P. Sanford (1991): *Enterobacter sakazakii* bacteremia in an adult. *South Med J.* 84(6):793-5. doi: 10.1097/00007611-199106000-00033.
155. Hayman, M.M., S.G. Edelson-Mammel, P.J. Carter, Y.I. Chen, M. Metz, J.F. Sheehan, B.D. Tall, C.J. Thompson, L.A. Smoot (2020): Prevalence of *Cronobacter* spp. and *Salmonella* in milk powder manufacturing facilities in the United States. *J. Food Prot.* 83(10):1685-1692. doi: 10.4315/JFP-20-047.
156. Healy, B., S. Cooney, S. O'Brien, C. Iversen, P. Whyte, J. Nally, J.J. Callanan, S. Fanning (2010): *Cronobacter (Enterobacter sakazakii)*: an opportunistic foodborne pathogen. *Foodborne Pathog. Dis.* 7(4):339-50. doi: 10.1089/fpd.2009.0379.
157. Healy, B., S. Huynh, N. Mullane, S. O'Brien, C. Iversen, A. Lehner, R. Stephan, C.T. Parker, S. Fanning (2009): Microarray-based comparative genomic indexing of the *Cronobacter* genus (*Enterobacter sakazakii*). *Int. J. Food Microbiol.* 136(2):159-64. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.07.008.
158. Hein, I., B. Gadzov, D. Schoder, H. Foissy, B. Malorny, W. Wagner (2009): Temporal and spatial distribution of *Cronobacter* isolates in a milk powder processing plant determined by pulsed-field gel electrophoresis. *Foodborne Pathog. Dis.* 6(2):225-33. doi: 10.1089/fpd.2008.0175.

159. Heperkan, D., G. Dalkilic-Kaya, V.K. Juneja (2017): *Cronobacter sakazakii* in baby foods and baby food ingredients of dairy origin and microbiological profile of positive samples, LWT 75: 402-407. doi: 10.1016/j.lwt.2016.09.013.
160. Heuvelink, A.E., F.D. Kodde, J.T.M. Zwartkruis-Nahuis, E. De Boer (2001): *Enterobacter sakazakii* in melkpoeder. Keuringsdienst van Waren Oost. Project number OT 0110
161. Himelright, I., E. Harris, V. Lorch, M. Anderson (2002): *Enterobacter sakazakii* infections associated with the use of powdered infant formula—Tennessee, 2001. J. Am. Med. Assoc. 287:2204–5.
162. Hochel, I., J. Škvor (2009): Characterisation of antibodies for the immunochemical detection of *Enterobacter sakazakii*. Czech J. Food Sci. 27(11):SII66-SII74. doi: 10.17221/206/2009-CJFS.
163. Hochel, I., H. Růžičková, L. Krásný, K. Demnerová (2012): Occurrence of *Cronobacter* spp. in retail foods. J. Appl. Microbiol. 112(6):1257-65. doi: 10.1111/j.1365-2672.2012.05292.x.
164. Holý, O., A. Cruz-Córdova, J. Xicohtencatl-Cortes, I. Hochel, J. Parra-Flores, J. Petrželová, K. Fačevicová, S. Forsythe, A. Alsonosi (2018): Occurrence of virulence factors in *Cronobacter sakazakii* and *Cronobacter malonaticus* originated from clinical samples. Microb. Pathog. 127:250-256. doi: 10.1016/j.micpath.2018.12.011.
165. Holy, O., S.J. Forsythe (2014): *Cronobacter* species as emerging causes of healthcare-associated infection. J. Hosp. Infect. 86:169–77
166. Holý, O., J. Petrželová, V. Hanulík, M. Chromá, I. Matoušková, S.J. Forsythe (2014): Epidemiology of *Cronobacter* spp. isolates from patients admitted to the Olomouc University Hospital (Czech Republic). Epidemiol. Mikrobiol. Imunol. 63(1):69-72.
167. Huang, Y., Y. Pang, H. Wang, Z. Tang, Y. Zhou, W. Zhang, X. Li, D. Tan, J. Li, Y. Lin, X. Liu, W. Huang, Y. Shi (2015): Occurrence and Characterization of *Cronobacter* spp. in Dehydrated Rice Powder from Chinese Supermarket. PLoS One. 10(7):e0131053. doi: 10.1371/journal.pone.0131053.
168. Hunter, C.J., J.F. Bean (2013): *Cronobacter*: an emerging opportunistic pathogen associated with neonatal meningitis, sepsis and necrotizing enterocolitis. J Perinatol. 33(8):581-5. doi: 10.1038/jp.2013.26.
169. Hunter, C.J., N. Chokshi, H.R. Ford (2008): Evidence vs experience in the surgical management of necrotizing enterocolitis and focal intestinal perforation. J Perinatol. 28 Suppl 1:S14-7. doi: 10.1038/jp.2008.44.
170. Hurrell, E., E. Kucerova, M. Loughlin, J. Caubilla-Barron, A. Hilton, R. Armstrong, C. Smith, J. Grant, S. Shoo, S. Forsythe (2009): Neonatal enteral feeding tubes as loci for colonisation by members of the *Enterobacteriaceae*. BMC Infect. Dis. 9:146. doi: 10.1186/1471-2334-9-146.

171. Hurrell, E., E. Kucerova, M. Loughlin, J. Caubilla-Barron, S.J. Forsythe (2009): Biofilm formation on enteral feeding tubes by *Cronobacter sakazakii*, *Salmonella* serovars and other *Enterobacteriaceae*. *Int. J. Food Microbiol.* 136(2):227-31. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.08.007.
172. Huson, D.H., D. Bryant (2006): Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Mol. Biol. Evol.* 23(2):254-67. doi: 10.1093/molbev/msj030.
173. Hyeon, J.Y., C. Park, I.S. Choi, P.S. Holt, K.H. Seo (2010): Development of multiplex real-time PCR with Internal amplification control for simultaneous detection of *Salmonella* and *Cronobacter* in powdered infant formula. *Int. J. Food Microbiol.* 144(1):177-81. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.09.022.
174. Infant Formula Act 21 U.S.C. 350a und verwandte Gesetze 21 CFR 106, 107
175. ICMSF (2002): International Commission on Microbiological Specifications for Foods. Microorganisms in foods number 7. Microbiological testing in food safety management, Chap. 8 Selection of cases and attribute plans. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
176. ISO 22964:2017-08 (2017): Microbiology of the food chain—horizontal method for the detection of *Cronobacter* spp. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland
177. ISO/TS 22964: IDF/RM 210:2006 (2006): International Organization for Standardization, International Dairy Federation Milk and Milk Products—Detection of *Enterobacter sakazakii*, ISO/TS 22964/IDF/RM 210, 1st edn. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
178. Iversen, C., A. Lehner, C. Fricker-Feer, K. Gschwend, R. Stephan (2009): Genotyping of *Cronobacter* (*Enterobacter sakazakii*) strains isolated from an infant formula processing plant. *Archiv für Lebensmittelhygiene* 60(2):66-72.
179. Iversen, C., A. Lehner, N. Mullane, E. Bidlas, I. Cleenwerck, J. Marugg, S. Fanning, R. Stephan, H. Joosten (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. *BMC Evol. Biol.* 7:64. doi: 10.1186/1471-2148-7-64.
180. Iversen, C., L. Lancashire, M. Waddington, S. Forsythe, G. Ball (2006): Identification of *Enterobacter sakazakii* from closely related species: The use of Artificial Neural Networks in the analysis of biochemical and 16S rRNA data. *BMC Microbiol.* 6:28-10.1186/1471-2180-6-28.

181. Iversen, C., M. Lane, S.J. Forsythe (2004): The growth profile, thermotolerance and biofilm formation of *Enterobacter sakazakii* grown in infant formula milk. Lett. Appl. Microbiol. 38(5):378-82. doi: 10.1111/j.1472-765X.2004.01507.x.
182. Iversen, C., M. Waddington, J.J. Farmer, S. Forsythe (2006): The biochemical differentiation of *Enterobacter sakazakii* genotypes. BMC Microbiol. 6:94-10.1186/1471-2180-6-94.
183. Iversen, C., M. Waddington, S.L. On, S. Forsythe (2004): Identification and phylogeny of *Enterobacter sakazakii* relative to *Enterobacter* and *Citrobacter* species. J. Clin. Microbiol. 42:5368-5370. 10.1128/JCM.42.11.5368-5370.2004.
184. Iversen, C., N. Mullane, B. McCardell, B.D. Tall, A. Lehner, S. Fanning, R. Stephan, H. Joosten (2008): *Cronobacter* gen. nov., a new genus to accommodate the biogroups of *Enterobacter sakazakii*, and proposal of *Cronobacter sakazakii* gen. nov., comb. nov., *Cronobacter malonaticus* sp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov., *Cronobacter* genomospecies 1, and of three subspecies, *Cronobacter dublinensis* subsp. *dublinensis* subsp. nov., *Cronobacter dublinensis* subsp. *lausannensis* subsp. nov. and *Cronobacter dublinensis* subsp. *lactaridi* subsp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 58(6):1442-7. doi: 10.1099/ijs.0.65577-0.
185. Iversen, C., P. Druggan, S. Forsythe (2004): A selective differential medium for *Enterobacter sakazakii*, a preliminary study. Int. J. Food Microbiol. 96(2):133-9. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.01.024.
186. Iversen, C., S. Forsythe (2003): Risk profile of *Enterobacter sakazakii*, an emergent pathogen associated with infant milk formula. Trends in Food Science & Technology 14(11):443-454. doi:10.1016/S0924-2244(03)00155-9.
187. Iversen, C., S. Forsythe (2004): Isolation of *Enterobacter sakazakii* and other *Enterobacteriaceae* from powdered infant formula milk and related products Food Microbiol. 21(6):771-777. doi:10.1016/j.fm.2004.01.009.
188. Iversen, C., S.J. Forsythe (2007): Comparison of media for the isolation of *Enterobacter sakazakii*. Appl. Environ. Microbiol. 73(1):48-52. doi: 10.1128/AEM.01562-06.
189. Jackson, E.E., H. Sonbol, N. Masood, S.J. Forsythe (2014): Genotypic and phenotypic characteristics of *Cronobacter* species, with particular attention to the newly reclassified species *Cronobacter helveticus*, *Cronobacter pulveris*, and *Cronobacter zurichensis*. Food Microbiol. 44:226-35. doi: 10.1016/j.fm.2014.06.013.
190. Jackson, E.E., J.P. Flores, E. Fernández-Escartín, S.J. Forsythe (2015): Reevaluation of a Suspected *Cronobacter sakazakii* Outbreak in Mexico. J. Food Prot. 78(6):1191-6. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-14-563.

191. Jackson, E.E., S.J. Forsythe (2016): Comparative study of *Cronobacter* identification according to phenotyping methods. BMC Microbiol. 16(1):146. doi: 10.1186/s12866-016-0768-6.
192. Jacobs, C., P. Braun, P. Hammer (2011): Reservoir and routes of transmission of *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) in a milk powder-producing plant. J. Dairy Sci. 94(8):3801-10. doi: 10.3168/jds.2011-4318.
193. Jang, H., H.R. Chase, J. Gangiredla, C.J. Grim, I.R. Patel, M.H. Kothary, S.A. Jackson, M.K. Mammel, L. Carter, F. Negrete, S. Finkelstein, L. Weinstein, Q. Yan, C. Iversen, F. Pagotto, R. Stephan, A. Lehner, A.K. Eshwar, S. Fanning, J. Farber, G.R. Gopinath, B.D. Tall, M. Pava-Ripoll (2020): Analysis of the Molecular Diversity Among *Cronobacter* Species Isolated From Filth Flies Using Targeted PCR, Pan Genomic DNA Microarray, and Whole Genome Sequencing Analyses. Front. Microbiol. 11:561204. doi: 10.3389/fmicb.2020.561204.
194. Jaradat, Z.W., Q.O. Ababneh, I.M. Saadoun, N.A. Samara, A.M. Rashdan (2009): Isolation of *Cronobacter* spp. (formerly *Enterobacter sakazakii*) from infant food, herbs and environmental samples and the subsequent identification and confirmation of the isolates using biochemical, chromogenic assays, PCR and 16S rRNA sequencing. BMC Microbiol. 9:225. doi: 10.1186/1471-2180-9-225.
195. Jaradat, Z.W., W. Al Mousa, A. Elbetieha, A. Al Nabulsi, B.D. Tall (2014): *Cronobacter* spp.-opportunistic food-borne pathogens. A review of their virulence and environmental-adaptive traits. J. Med. Microbiol. 63(8):1023-1037. doi: 10.1099/jmm.0.073742-0.
196. Jaradat, Z.W., W.A. Al-Mousa, A.M. Elbetieha, Q.O. Ababneh, A.A. Al-Nabulsi, H. Jang, J. Gangiredla, I.R. Patel, G.R. Gopinath, B.D. Tall (2022): Virulence, antimicrobial susceptibility and phylogenetic analysis of *Cronobacter sakazakii* isolates of food origins from Jordan. J. Appl. Microbiol. 133(4):2528-2546. doi: 10.1111/jam.15723.
197. Jarvis, K.G., C.J. Grim, A.A. Franco, G. Gopinath, V. Sathyamoorthy, L. Hu, J.A. Sadowski, C.S. Lee, B.D. Tall (2011): Molecular characterization of *Cronobacter* lipopolysaccharide O-antigen gene clusters and development of serotype-specific PCR assays. Appl. Environ. Microbiol. 77(12):4017-26. doi: 10.1128/AEM.00162-11.
198. Jarvis, C. (2005): New Investigator Award, Blue Ribbon Abstract Award: Fatal *Enterobacter sakazakii* infection associated with powdered infant formula in a neonatal intensive care unit in New Zealand. Am. J. Infec. Cont. 33(5):e19. doi: 10.1016/j.ajic.2005.04.012.
199. Jason, J. (2012): Prevention of invasive *Cronobacter* infections in young infants fed powdered infant formulas. Pediatrics. 130(5):e1076-84. doi: 10.1542/peds.2011-3855.
200. Javrková, B., M. Blazková, L. Fukal, P. Rauch (2012): Rapid detection of genus *Cronobacter* in powdered infant formula milk European Food Research and Technology

6 Literaturverzeichnis

- = Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung. A; Heidelberg Bd. 234, Ausg. 6:1099-1104. doi:10.1007/s00217-012-1704-0
201. Jayarao, B.M., L. Wang (1999) A study on the prevalence of gram-negative bacteria in bulk tank milk. J. Dairy Sci. 82(12):2620-4. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(99)75518-9.
202. Jiménez, E.B., C. Romeu Giménez (1982): Septic shock due to *Enterobacter sakazakii*. Clinical Microbiology Newsletter 4(4):30.
203. Jiménez, S.M., M.C. Tiburzi, M.S. Salsi, M.E. Pirovani, M.A. Moguelevsky (2003): The role of visible faecal material as a vehicle for generic *Escherichia coli*, coliform, and other enterobacteria contaminating poultry carcasses during slaughtering. J. Appl. Microbiol. 95(3):451-6. doi: 10.1046/j.1365-2672.2003.01993.x.
204. Johnson, T.J., L.K. Nolan (2009): Plasmid Replicon Typing. Methods of Molecular Biology 51:27-35. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-60327-999-4_3
205. Joker, R.N., T. Norholm, K.E. Siboni (1965): A case of neonatal meningitis caused by a yellow enterobacter. Dan. Med. Bull. 12(5):128-30.
206. Jolley, K.A., J.E. Bray, M.C.J. Maiden (2018): Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. Wellcome Open Res. 3:124. doi: 10.12688/wellcomeopenres.14826.1.
207. Jongenburger, I., M.W. Reij, E.P. Boer, L.G. Gorris, M.H. Zwietering (2011): Actual distribution of *Cronobacter* spp. in industrial batches of powdered infant formula and consequences for performance of sampling strategies. Int. J. Food Microbiol. 151(1):62-9. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.08.003.
208. Jongenburger, I., M.W. Reij, E.P. Boer, M.H. Zwietering, L.G. Gorris (2012): Modelling homogeneous and heterogeneous microbial contaminations in a powdered food product. Int. J. Food Microbiol. 157(1):35-44. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.04.009.
209. Joseph, S., E. Cetinkaya, H. Drahovska, A. Levican, M.J. Figueras, S.J. Forsythe (2012): *Cronobacter condimenti* sp. nov., isolated from spiced meat, and *Cronobacter universalis* sp. nov., a species designation for *Cronobacter* sp. genomospecies 1, recovered from a leg infection, water and food ingredients. Int. J. Sys. Evol. Microbiol. 62(Pt_6):1277-83.
210. Joseph, S., H. Sonbol, S. Hariri, P. Desai, M. McClelland, S.J. Forsythe (2012): Diversity of the *Cronobacter* genus as revealed by multilocus sequence typing. J. Clin. Microbiol. 50(9):3031-9. doi: 10.1128/JCM.00905-12.
211. Joseph, S., S. Hariri, N. Masood, S. Forsythe (2013): Sialic acid utilization by *Cronobacter sakazakii*. Microb. Inform. Exp. ;3(1):3. doi: 10.1186/2042-5783-3-3.
212. Joseph, S., S. Hariri, S.J. Forsythe (2013): Lack of continuity between *Cronobacter* biotypes and species as determined using multilocus sequence typing. Mol. Cell Probes. 27(3-4):137-9. doi: 10.1016/j.mcp.2013.02.002.

213. Joseph, S., S.J. Forsythe (2011): Predominance of *Cronobacter sakazakii* sequence type 4 in neonatal infections. *Emerg. Infect. Dis.* 17(9):1713-5. doi: 10.3201/eid1709.110260.
214. Joseph, S., S.J. Forsythe (2012): Insights into the Emergent Bacterial Pathogen *Cronobacter* spp., Generated by Multilocus Sequence Typing and Analysis. *Front. Microbiol.* 3:397. doi: 10.3389/fmicb.2012.00397.
215. Juhas, M., D.W. Crook, D.W. Hood (2008): Type IV secretion systems: tools of bacterial horizontal gene transfer and virulence. *Cell Microbiol.* 10(12):2377-86. doi: 10.1111/j.1462-5822.2008.01187.x.
216. Jung, J.H., N.Y. Choi, S.Y. Lee (2013): Biofilm formation and exopolysaccharide (EPS) production by *Cronobacter sakazakii* depending on environmental conditions. *Food Microbiol.* 34(1):70-80. doi: 10.1016/j.fm.2012.11.008.
217. Jung, M.K., J.H. Park (2006): Prevalence and Thermal Stability of *Enterobacter sakazakii* from Unprocessed Ready-to-Eat Agricultural Products and Powdered Infant Formulas. *Food Science and Biotechnology* 15:152-157. <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:102153316>.
218. Kandhai, M.C., M.W. Reij, L.G. Gorris, O. Guillaume-Gentil, M. van Schothorst (2004): Occurrence of *Enterobacter sakazakii* in food production environments and households. *Lancet.* 363(9402):39-40. doi: 10.1016/S0140-6736(03)15169-0.
219. Kang, S.E., Y.S. Nam, K.W. Hong (2007): Rapid detection of *Enterobacter sakazakii* using TaqMan real-time PCR assay. *J. Microbiol. Biotechnol.* 17(3):516-9.
220. Kanivets, V.I., I.N. Pishchur (2001): Bakterail'naia mikroflora protravlennykh semian sakharnoĭ svekly [Bacterial microflora on disinfected sugar beets]. *Mikrobiologiya.* 70(3):370-3. Russian.
221. Karamonová, L., P. Junková, D. Mihalová, B. Javůrková, L. Fukal, P. Rauch, M. Blažková (2013): The potential of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for the identification of biogroups of *Cronobacter sakazakii*. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 27(3):409-18. doi: 10.1002/rcm.6464.
222. Keyser, M., R.C. Witthuhn, L.C. Ronquest, T.J. Britz (2003): Treatment of winery effluent with upflow anaerobic sludge blanket (UASB)-granular sludges enriched with *Enterobacter sakazakii*. *Biotechnol. Lett.* 25(22):1893-8. doi: 10.1023/b:bile.0000003978.72266.96.
223. Killer, J., E. Skřivanová, I. Hochel, M. Marounek (2015): Multilocus Sequence Typing of *Cronobacter* Strains Isolated from Retail Foods and Environmental Samples. *Foodborne Pathog. Dis.* 12(6):514-21. doi: 10.1089/fpd.2014.1884.
224. Kilonzo-Nthenge, A., E. Rotich, S. Godwin, S. Nahashon, F. Chen (2012): Prevalence and antimicrobial resistance of *Cronobacter sakazakii* isolated from domestic kitchens in

- middle Tennessee, United States. J. Food Prot. 75(8):1512-7. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-11-442.
225. Kilonzo-Nthenge, A., F.C. Chen, S.L. Godwin (2008): Occurrence of *Listeria* and *Enterobacteriaceae* in domestic refrigerators. J. Food Prot. 71(3):608-12. doi: 10.4315/0362-028x-71.3.608.
226. Kim, H., J.H. Ryu, L.R. Beuchat (2006): Attachment of and biofilm formation by *Enterobacter sakazakii* on stainless steel and enteral feeding tubes. Appl. Environ. Microbiol. 72(9):5846-56. doi: 10.1128/AEM.00654-06.
227. Kim, H., L.R. Beuchat (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(12):2541-52. doi: 10.4315/0362-028x-68.12.2541.
228. Kim, K., K.P. Kim, J. Choi, J.A. Lim, J. Lee, S. Hwang, S. Ryu (2010): Outer membrane proteins A (OmpA) and X (OmpX) are essential for basolateral invasion of *Cronobacter sakazakii*. Appl. Environ. Microbiol. 76(15):5188-98. doi: 10.1128/AEM.02498-09.
229. Kim, K., S.S. Jang, S.K. Kim, J.H. Park, S. Heu, S. Ryu (2008): Prevalence and genetic diversity of *Enterobacter sakazakii* in ingredients of infant foods. Int. J. Food Microbiol. 122(1-2):196-203. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.072.
230. Kim, K.P., M.J. Loessner (2008): *Enterobacter sakazakii* invasion in human intestinal Caco-2 cells requires the host cell cytoskeleton and is enhanced by disruption of tight junction. Infect. Immun. 76(2):562-70. doi: 10.1128/IAI.00937-07.
231. Kim, S.A., S.W. Oh, Y.M. Lee, J.Y. Imm, I.G. Hwang, D.H. Kang, M.S. Rhee (2011): Microbial contamination of food products consumed by infants and babies in Korea. Lett. Appl. Microbiol. 53(5):532-8. doi: 10.1111/j.1472-765X.2011.03142.x.
232. Kimura, B., S. Kawasaki, T. Fujii, J. Kusunoki, T. Itoh, S.J. Flood (1999): Evaluation of TaqMan PCR assay for detecting *Salmonella* in raw meat and shrimp. J. Food Prot. 62(4):329-35. doi: 10.4315/0362-028x-62.4.329.
233. Kleiman, M.B., S.D. Allen, P. Neal, J. Reynolds (1981): Meningoencephalitis and compartmentalization of the cerebral ventricles caused by *Enterobacter sakazakii*. J. Clin. Microbiol. 14(3):352-4. doi: 10.1128/jcm.14.3.352-354.1981.
234. Kleinsteuber, I. (2015): Herstellung und Charakterisierung monoklonaler Antikörper zum Nachweis von *Cronobacter* spp. Dissertation, LMU München: Tierärztliche Fakultät. doi: 10.5282/edoc.17925.
235. Kothary, M.H., B.A. McCardell, C.D. Frazar, D. Deer, B.D. Tall (2007): Characterization of the zinc-containing metalloprotease encoded by *zpx* and development of a species-specific detection method for *Enterobacter sakazakii*. Appl. Environ. Microbiol. 73(13):4142-51. doi: 10.1128/AEM.02729-06.

236. Kraemer, I. (2008): Untersuchungen zum Vorkommen von *Enterobacter sakazakii* in Speiseeis mit real-time-PCR-Verfahren. Dissertation, LMU München: Tierärztliche Fakultät. doi: 10.5282/edoc.8377
237. Kragh, K.N., J.B. Hutchison, G. Melaugh, C. Rodesney, A.E. Roberts, Y. Irie, P.Ø. Jensen, S.P. Diggle, R.J. Allen, V. Gordon, T. Bjarnsholt (2016): Role of Multicellular Aggregates in Biofilm Formation. *mBio*. 7(2):e00237. doi: 10.1128/mBio.00237-16.
238. Kress, C., A.A. Hassan, Ö. Akineden., E. Schneider, Estuningsih, H. Becker, E. Usleber (2005): *Enterobacter sakazakii* in Trockenerzeugnissen auf Milchbasis. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (27.-30. September 2005 in Garmisch-Partenkirchen), Tagungsbericht, Gießen, DVG.
239. Krishnan, S., N.V. Prasadarao (2012): Outer membrane protein A and OprF: versatile roles in Gram-negative bacterial infections. *FEBS J.* 279(6):919-31. doi: 10.1111/j.1742-4658.2012.08482.x.
240. Krznarić-Sucić, Z., H. Weisglass (1979): *Prashechia*, novi rod, *Prashechia flavescens*, nova vrsta kao uzročnik pleuropneumonije kod devetogodisnje djevojčice [*Prashechia*-- a new genus, *Prashechia flavescens*-- a new species as the causative agent of pleuropneumonia in a nine-year-old girl (author's transl)]. *Lijec Vjesn.* 101(12):795-6. Croatian.
241. Kucerova, E., S. Joseph, S. Forsythe (2011): The *Cronobacter* genus: ubiquity and diversity. *Qual. Assess. Saf. Crops Foods* 3:104–22. doi:10.1111/j.1757-837X.2011.00104.x.
242. Kucerova, E., S.W. Clifton, X.Q. Xia, F. Long, S. Porwollik, L. Fulton, C. Fronick, P. Minx, K. Kyung, W. Warren, R. Fulton, D. Feng, A. Wollam, N. Shah, V. Bhonagiri, W.E. Nash, K. Hallsworth-Pepin, R.K. Wilson, M. McClelland, S.J. Forsythe (2010): Genome sequence of *Cronobacter sakazakii* BAA-894 and comparative genomic hybridization analysis with other *Cronobacter* species. *PLoS One.* 5(3):e9556. doi: 10.1371/journal.pone.0009556.
243. Kuklinsky-Sobral, J., W.L. Araújo, R. Mendes, A.A. Pizzirani-Kleiner, J.L. Azevedo (2005): Isolation and characterization of endophytic bacteria from soybean (*Glycine max*) grown in soil treated with glyphosate herbicide. *Plant and Soil*, 1-2:91-99. doi: 10.1007/s11104-004-6894-1.
244. Kuklinsky-Sobral, J., W.L. Araújo, R. Mendes, I.O. Geraldi, A.A. Pizzirani-Kleiner, J.L. Azevedo (2004): Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. *Environ. Microbiol.* 6(12):1244-51. doi: 10.1111/j.1462-2920.2004.00658.x.

245. Kurz, Charlotte (2009): Vorkommen und Bedeutung von Enterobacteriaceae in Säuglingsfertignahrungsmitteln unter besonderer Berücksichtigung von *Enterobacter sakazakii*. Diss. med. vet. JLU Gießen. VVB Laufersweiler Verlag, Gießen, Deutschland.
246. Kuzina, L.V., J.J. Peloquin, D.C. Vacek, T.A. Miller (2001): Isolation and identification of bacteria associated with adult laboratory Mexican fruit flies, *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae). *Curr. Microbiol.* 42(4):290-4. doi: 10.1007/s002840110219.
247. Lafarge, V., J.C. Ogier, V. Girard, V. Maladen, J.Y. Leveau, A. Gruss, A. Delacroix-Buchet (2004): Raw cow milk bacterial population shifts attributable to refrigeration. *Appl. Environ. Microbiol.* 70(9):5644-50. doi: 10.1128/AEM.70.9.5644-5650.2004.
248. 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. 10.1097/00005792-200103000-00004.,
249. Lampel, K.A., Y. Chen (2009): Method for the isolation and detection of *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter*) from powdered infant formula. *Int. J. Food Microbiol.* 136(2):179-84. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.08.016.
250. Leclerc, H., D.A. Mossel, S.C. Edberg, C.B. Struijk (2001): Advances in the bacteriology of the coliform group: their suitability as markers of microbial water safety. *Annu. Rev. Microbiol.* 55:201-34. doi: 10.1146/annurev.micro.55.1.201.
251. Leclerc, H., F. Gavini, C. Oger (1981): Les indicateurs bacteriens dans le controle bacteriologique de l'eau: exigences et limites. *J. Fr. Hydrol.* 12: 213-228.
252. Leclercq, A., C. Wanegue, P. Baylac (2002): Comparison of fecal coliform agar and violet red bile lactose agar for fecal coliform enumeration in foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(4):1631-8. doi: 10.1128/AEM.68.4.1631-1638.2002.
253. Lee, D.G., S.J. Kim (2003): Bacterial species in biofilm cultivated from the end of the Seoul water distribution system. *J. Appl. Microbiol.* 95(2):317-24. doi: 10.1046/j.1365-2672.2003.01978.x.
254. Lehner, A., B. Tall, S. Fanning, S. Srikumar (2018): *Cronobacter* spp. opportunistic foodborne pathogens: An Update on Evolution, Osmotic Adaptation and Pathogenesis. *Curr. Clin. Microbiol. Rep.* 5, 97–105.
255. Lehner, A., C. Fricker-Feer, R. Stephan (2012): Identification of the recently described *Cronobacter condimenti* by an *rpoB*-gene-based PCR system. *J. Med. Microbiol.* 61(Pt 7):1034-1035. doi: 10.1099/jmm.0.042903-0.
256. Lehner, A., C. Fricker-Feer, R. Stephan (2008): Pathogene Mikroorganismen: *Cronobacter*. Taxonomie, Eigenschaften und Präventionsmaßnahmen. 1. Aufl., Behr's Verlag, Hamburg, S. 17-18, 22-30, 37, 63-74
257. Lehner, A., K. Riedel, L. Eberl, P. Breeuwer, B. Diep, R. Stephan (2005): Biofilm formation, extracellular polysaccharide production, and cell-to-cell signaling in various

- Enterobacter sakazakii* strains: aspects promoting environmental persistence. J. Food Prot. 68(11):2287-94. doi: 10.4315/0362-028x-68.11.2287.
258. Lehner, A., T. Tasara, R. Stephan (2004): 16S rRNA gene based analysis of *Enterobacter sakazakii* strains from different sources and development of a PCR assay for identification. BMC Microbiol. 4: 43. doi: 10.1186/1471-2180-4-43.
259. Leuschner, R.G., J. Bew (2004): A medium for the presumptive detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula: interlaboratory study. J. AOAC Int. 87(3):604-13.
260. Li, C., H. Zeng, J. Zhang, W. He, N. Ling, M. Chen, S. Wu, T. Lei, H. Wu, Y. Ye, Y. Ding, J. Wang, X. Wei, Y. Zhang, Q. Wu (2019): Prevalence, antibiotic susceptibility, and molecular characterization of *Cronobacter* spp. isolated from edible mushrooms in China. Front. Microbiol. 10:283. doi: 10.3389/fmicb.2019.00283.
261. Li, Q., C. Li, L. Chen, Z. Cai, S. Wu, Q. Gu, Y. Zhang, X. Wei, J. Zhang, X. Yang, S. Zhang, Q. Ye, Q. Wu (2023): *Cronobacter* spp. isolated from quick-frozen foods in China: Incidence, Genetic Characteristics, and Antibiotic Resistance. Foods. 12(16):3019. doi: 10.3390/foods12163019.
262. Li, X., W. Li, Q. Yang, X. Gong, W. Guo, C. Dong, J. Liu, L. Xuan, J. Chang (2014): Rapid and quantitative detection of prostate specific antigen with a quantum dot nanobeads-based immunochromatography test strip. ACS Appl. Mater. Interfaces. 6(9):6406-14. doi: 10.1021/am5012782.
263. Li, Y., L. Cao, J. Zhao, Q. Cheng, F. Lu, X. Bie, Z. Lu (2012): Use of *rpoB* gene sequence analysis for phylogenetic identification of *Cronobacter* species. J. Microbiol Methods. 88(2):316-8. doi: 10.1016/j.mimet.2011.12.002.
264. Li, Z., W. Ge, K. Li, J. Gan, Y. Zhang, Q. Zhang, R. Luo, L. Chen, Y. Liang, Q. Wang, M. Xi, X. Xia, X. Wang, B. Yang (2016): Prevalence and characterization of *Cronobacter sakazakii* in retail milk-based infant and baby foods in Shaanxi, China. Foodborne Pathog. Dis. 13(4):221-7. doi: 10.1089/fpd.2015.2074.
265. Lin, L.C., L.R. Beuchat (2007): Survival of *Enterobacter sakazakii* in infant cereal as affected by composition, water activity, and temperature. Food Microbiol. 24:767-777.
266. Ling, N., C. Li, J. Zhang, Q. Wu, H. Zeng, W. He, Y. Ye, J. Wang, Y. Ding, M. Chen, L. Xue, Q. Ye, W. Guo (2018): Prevalence and molecular and antimicrobial characteristics of *Cronobacter* spp. isolated from raw vegetables in China. Front. Microbiol. 9:1149. doi: 10.3389/fmicb.2018.01149.
267. Ling, N., S. Forsythe, Q. Wu, Y. Ding, J. Zhang, H. Zeng (2020): Insights into *Cronobacter sakazakii* biofilm formation and control strategies in the food industry. Engineering 6:393-405. doi: 10.1016/j.eng.2020.02.007.

268. Liu, H., Y. Yang, J. Cui, L. Liu, H. Liu, G. Hu, Y. Shi, J. Li (2013): Evaluation and implementation of a membrane filter method for *Cronobacter* detection in drinking water. *FEMS Microbiol. Lett.* 344(1):60-8. doi:10.1111/1574-6968.12155.
269. Liu, X., J. Fang, M. Zhang, X. Wang, W. Wang, Y. Gong, X. Xi, M. Li (2012): Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for detection of *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*). *World J. Microbiol Biotechnol.* 28(3):1013-20. doi: 10.1007/s11274-011-0899-8.
270. Liu, Y., Q. Gao, X. Zhang, Y. Hou, J. Yang, X. Huang (2006): PCR and oligonucleotide array for detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula. *Mol. Cell Probes.* 20(1):11-7. doi: 10.1016/j.mcp.2005.08.004.
271. Löfström, C., R. Knutsson, C.E. Axelsson, P. Rådström (2004): Rapid and specific detection of *Salmonella* spp. in animal feed samples by PCR after culture enrichment. *Appl. Environ. Microbiol.* 70(1):69-75. doi: 10.1128/AEM.70.1.69-75.2004.
272. Lou, X., T. Liu, W. Zhang, H. Yu, H. Wang, S. Song, Q. Chen, Z. Fang (2019): The occurrence and distribution characteristics of *Cronobacter* in diverse cereal kernels, flour, and flour-based products. *Food Microbiol.* 84:103269. doi: 10.1016/j.fm.2019.103269.
273. Lou, Y., A.E. Yousef (1996): Resistance of *Listeria monocytogenes* to heat after adaptation to environmental stresses. *J. Food Prot.* 59(5):465-471. doi: 10.4315/0362-028X-59.5.465.
274. Lu, Y., P. Liu, C. Li, M. Sha, J. Fang, J. Gao, X. Xu, K.R. Matthews (2019): Prevalence and genetic diversity of *Cronobacter* species isolated from four infant formula production factories in China. *Front. Microbiol.* 10:1938. doi: 10.3389/fmicb.2019.01938.
275. Lu, Y., Y. Chen, X.A. Lu, J. Lv, C.X. Man, Y.L. Chai, Y.J. Jiang (2014): Comparison of methods for the microbiological identification and typing of *Cronobacter* species in infant formula. *J Dairy Sci.* 97(2):632-41. doi: 10.3168/jds.2013-7147.
276. Lv, X., X. Gu, L. Wang, X. He, C. He, J. Zhang, L. Zhao (2021): Rapid and absolute quantification of VBNC *Cronobacter sakazakii* by PMAxx combined with single intact cell droplet digital PCR in infant foods. *LWT* 2021 45, 111388. doi:/10.1016/j.lwt.2021.111388.
277. MacLean, L.L., F. Pagotto, J.M. Farber, M.B. Perry (2009): The structure of the O-antigen in the endotoxin of the emerging food pathogen *Cronobacter* (*Enterobacter*) *mytjensii* strain 3270. *Carbohydr. Res.* 344(5):667-71. doi: 10.1016/j.carres.2009.01.020.
278. Maiden, M.C., J.A. Bygraves, E. Feil, G. Morelli, J.E. Russell, R. Urwin, Q. Zhang, J. Zhou, K. Zurth, D.A. Caugant, I.M. Feavers, M. Achtman, B.G. Spratt (1998): Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of

- pathogenic microorganisms. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95(6):3140-5. doi: 10.1073/pnas.95.6.3140.
279. Malorny, B., M. Wagner (2005): Detection of *Enterobacter sakazakii* strains by real-time PCR. J. Food Prot. 68(8):1623-7. doi: 10.4315/0362-028x-68.8.1623.
280. Mange, J.P., R. Stephan, N. Borel, P. Wild, K.S. Kim, A. Pospischil, A. Lehner (2006): Adhesive properties of *Enterobacter sakazakii* to human epithelial and brain microvascular endothelial cells. BMC Microbiol. 6:58. doi: 10.1186/1471-2180-6-58.
281. Masaki, H., N. Asoh, M. Tao, H. Ikeda, S. Degawa, K. Matsumoto, K. Inokuchi, K. Watanabe, H. Watanabe, K. Oishi, T. Nagatake (2001): [Detection of gram-negative bacteria in patients and hospital environment at a room in geriatric wards under the infection control against MRSA]. Kansenshogaku Zasshi. 75(2):144-50. Japanese. doi: 10.11150/kansenshogakuzasshi1970.75.144.
282. Masood, N., K. Moore, A. Farbos, K. Paszkiewicz, B. Dickins, A. McNally, S. Forsythe (2015): Genomic dissection of the 1994 *Cronobacter sakazakii* outbreak in a French neonatal intensive care unit. BMC Genomics. 16:750. doi: 10.1186/s12864-015-1961-y.
283. Masood, N., K. Moore, A. Farbos, S. Hariri, K. Paszkiewicz, B. Dickins, A. McNally, S. Forsythe (2013): Draft genome sequence of the earliest *Cronobacter sakazakii* sequence type 4 strain, NCIMB 8272. Genome Announc. 1(5):e00782-13. doi: 10.1128/genomeA.00782-13.
284. McMahan, M.A., J. Xu, J.E. Moore, I.S. Blair, D.A. McDowell (2007): Environmental stress and antibiotic resistance in food-related pathogens. Appl. Environ. Microbiol. 73(1):211-7. doi: 10.1128/AEM.00578-06.
285. Mead, P.S., L. Slutsker, V. Dietz, L.F. McCaig, J.S. Bresee, C. Shapiro, P.M. Griffin, R.V. Tauxe (1999): Food-related illness and death in the United States. Emerg. Infect. Dis. 5(5):607-25. doi: 10.3201/eid0505.990502.
286. Mensah, P., D. Yeboah-Manu, K. Owusu-Darko, A. Ablordey (2002): Street foods in Accra, Ghana: how safe are they? Bull. WHO, 80: 546-554.
287. Miled-Bennour, R., T.C. Eells, F.J. Pagotto, J.M. Farber, A. K erouanton, T. Meheut, P. Colin, H. Joosten, A. Leclercq, N.G. Besse (2010): Genotypic and phenotypic characterisation of a collection of *Cronobacter* (*Enterobacter sakazakii*) isolates. Int. J. Food Microbiol. 139(1-2):116-25. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.01.045.
288. Ministry of Health of the People's Republic of China (2010): GB4789.40-2010. National Food Safety Standard: Food Microbiological Examination: *Enterobacter sakazakii*[S]. Beijing: China Standard Press.
289. Miranda, C.D., C. Kehrenberg, C. Ulep, S. Schwarz, M.C. Roberts (2003): Diversity of tetracycline resistance genes in bacteria from Chilean salmon farms. Antimicrob. Agents Chemother. 47(3):883-8. doi: 10.1128/AAC.47.3.883-888.2003.

290. Mittal, R., Y. Wang, C.J. Hunter, I. Gonzalez-Gomez, N.V. Prasadarao (2009): Brain damage in newborn rat model of meningitis by *Enterobacter sakazakii*: a role for outer membrane protein A. Lab. Invest. 89(3):263-77. doi: 10.1038/labinvest.2008.164.
291. Mohan Nair, M.K., K. Venkitanarayanan (2007): Role of bacterial OmpA and host cytoskeleton in the invasion of human intestinal epithelial cells by *Enterobacter sakazakii*. Pediatr. Res. 62(6):664-9. doi: 10.1203/PDR.0b013e3181587864.
292. Mohan Nair, M.K., K.S. Venkitanarayanan (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(4):2539-46. doi: 10.1128/AEM.72.4.2539-2546.2006.
293. Molloy, C., C. Cagney, S. O'Brien, C. Iversen, S. Fanning, G. Duffy (2009): Surveillance and characterisation by pulsed-field gel electrophoresis of *Cronobacter* spp. in farming and domestic environments, food production animals and retail foods. Int. J. Food Microbiol. 136(2):198-203. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.07.007.
294. Monroe, P.W., W.L. Tift (1979): Bacteremia associated with *Enterobacter sakazakii* (yellow, pigmented *Enterobacter cloacae*). J. Clin. Microbiol. 10(6):850-1. doi: 10.1128/jcm.10.6.850-851.1979.
295. Montgomery, J.M., D. Gillespie, P. Sastrawan, T.M. Fredeking, G.L. Stewart (2002): Aerobic salivary bacteria in wild and captive Komodo dragons. J. Wildl. Dis. 38(3):545-51. doi: 10.7589/0090-3558-38.3.545.
296. Morales, P., E. Fernandez-García, P. Gaya, M. Nunez (2003): Formation of volatile compounds by wild *Lactococcus lactis* strains isolated from raw ewes' milk cheese. Int. Dairy J. 13:201-209. doi.:10.1016/S0958-6946(02)00151-6.
297. Morales, P., I. Feliu, E. Fernández-García, M. Nuñez (2004): Volatile compounds produced in cheese by *Enterobacteriaceae* strains of dairy origin. J. Food Prot. 67(3):567-73. doi: 10.4315/0362-028x-67.3.567.
298. Moriez, R., C. Salvador-Cartier, V. Theodorou, J. Fioramonti, H. Eutamene, L. Bueno (2005): Myosin light chain kinase is involved in lipopolysaccharide-induced disruption of colonic epithelial barrier and bacterial translocation in rats. Am. J. Pathol. 167(4):1071-9. doi: 10.1016/S0002-9440(10)61196-0.
299. Mosso, M.A., M.C. de la Rosa, C. Vivar, M.R. Medina (1994): Heterotrophic bacterial populations in the mineral waters of thermal springs in Spain. J. Appl. Bacteriol. 77(4):370-81. doi: 10.1111/j.1365-2672.1994.tb03437.x.
300. Mramba, F., A. Broce, L. Zurek (2006): Isolation of *Enterobacter sakazakii* from stable flies, *Stomoxys calcitrans* L. (Diptera: Muscidae). J. Food Prot. 69(3):671-3. doi: 10.4315/0362-028x-69.3.671.

301. Mullane, N.R., M. Ryan, C. Iversen, M. Murphy, P. O'Gaora, T. Quinn, P. Whyte, P.G. Wall, S. Fanning (2008): Development of multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis for the molecular subtyping of *Enterobacter sakazakii*. Appl. Environ. Microbiol. 74(4):1223-31. doi: 10.1128/AEM.01726-07.
302. Mullane, N.R., P. Whyte, P.G. Wall, T. Quinn, S. Fanning (2007): Application of pulsed-field gel electrophoresis to characterise and trace the prevalence of *Enterobacter sakazakii* in an infant formula processing facility. Int. J. Food Microbiol. 116(1):73-81. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2006.12.036.
303. Müller, A., H. Hächler, R. Stephan, A. Lehner (2014): Presence of AmpC beta-lactamases, CSA-1, CSA-2, CMA-1, and CMA-2 conferring an unusual resistance phenotype in *Cronobacter sakazakii* and *Cronobacter malonaticus*. Microb. Drug Resist. 20(4):275-80. doi: 10.1089/mdr.2013.0188.
304. Müller, A., R. Stephan, C. Fricker-Feer, A. Lehner (2013): Genetic diversity of *Cronobacter sakazakii* isolates collected from a Swiss infant formula production facility. J. Food Prot. 76(5):883-7. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-12-521.
305. Musgrove, M.T., D.R. Jones, J.K. Northcutt, N.A. Cox, M.A. Harrison (2004): Identification of *Enterobacteriaceae* from washed and unwashed commercial shell eggs. J. Food Prot. 67(11):2613-6. doi: 10.4315/0362-028x-67.11.2613.
306. Muytjens, H.L., H. Roelofs-Willems, G.H. Jaspars (1988): Quality of powdered substitutes for breast milk with regard to members of the family *Enterobacteriaceae*. J. Clin. Microbiol. 26: 743-746.
307. Muytjens, H.L., H.C. Zanen, H.J. Sonderkamp, L.A. Kollee, I.K. Wachsmuth, J.J. Farmer (1983): Analysis of 8 cases of neonatal meningitis and sepsis due to *Enterobacter sakazakii*. J. Clin. Microbiol. 18: 115-120.
308. Muytjens, H.L., J. van der Ros-van de Repe, H.A. van Druten (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(4):684-6. doi: 10.1128/jcm.20.4.684-686.1984.
309. Nair, M.K., K. Venkitanarayanan, L.K. Silbart, K.S. Kim (2009): Outer membrane protein A (OmpA) of *Cronobacter sakazakii* binds fibronectin and contributes to invasion of human brain microvascular endothelial cells. Foodborne Pathog. Dis. 6(4):495-501. doi: 10.1089/fpd.2008.0228.
310. Nassereddin, R.A., M.I. Yamani (2005): Microbiological quality of sous and tamarind, traditional drinks consumed in Jordan. J. Food Prot. 68(4):773-7. doi: 10.4315/0362-028x-68.4.773.

311. Nauta, M. (2021): Chapter 2—Microbial food safety risk assessment. In Foodborne Infections and Intoxications, 5th ed.; Morris, J.G., Vugia, D.J., Eds.; Academic Press: Cambridge, MA, USA; pp. 19–34. doi:10.1016/B978-0-12-819519-2.00015-3
312. Nazarowec-White, M., J.M. Farber (1997): *Enterobacter sakazakii*: a review. Int. J. Food Microbiol. 34(2):103-13. doi: 10.1016/s0168-1605(96)01172-5.
313. Nazarowec-White, M., J.M. Farber (1999): Phenotypic and genotypic typing of food and clinical isolates of *Enterobacter sakazakii*. J. Med. Microbiol. 48(6):559-567. doi: 10.1099/00222615-48-6-559.
314. Nketsia-Tabiri, J., A. Adu-Gyamfi, K.G. Montford, C.M. Gbedemah, S. Sefa-Dedeh (2003): Optimising processing conditions for irradiated cured fish. Int. Atomic Energy Agency Techn. Doc.1337:207-216.
315. No, H.K., N.Y. Park, S.H. Lee, H.J. Hwang, S.P. Meyers (2002): Antibacterial activities of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights on spoilage bacteria isolated from tofu. J. Food Sci., 67:1511-1514. doi: 10.1111/j.1365-2621.2002.tb10314.x.
316. Noriega, F.R., K.L. Kotloff, M.A. Martin, R.S. Schwalbe (1990): Nosocomial bacteremia caused by *Enterobacter sakazakii* and *Leuconostoc mesenteroides* resulting from extrinsic contamination of infant formula. Pediatr. Infect. Dis. J. 9(6):447-9.
317. Odeyemi, O.A., N. Abdullah Sani (2019): Antibiotic resistance, putative virulence factors and curli fimbriation among *Cronobacter* species. Microb Pathog. 136:103665. doi: 10.1016/j.micpath.2019.103665.
318. Oger, C., F. Gavini, J.M. Delattre, H. Leclerc (1981): A propos des coliformes et de la colimétrie des eaux d'alimentation [On the coliform organisms and their count in water supply analysis (author's transl)]. Ann Microbiol (Paris). 132(2):183-9. French.
319. Ogier, J.C., V. Lafarge, V. Girard, A. Rault, V. Maladen, A. Gruss, J.Y. Leveau, A. Delacroix-Buchet (2004): Molecular fingerprinting of dairy microbial ecosystems by use of temporal temperature and denaturing gradient gel electrophoresis. Appl. Environ. Microbiol. 70(9):5628-43. doi: 10.1128/AEM.70.9.5628-5643.2004.
320. Ogrodzki, P., S. Forsythe (2015): Capsular profiling of the *Cronobacter* genus and the association of specific *Cronobacter sakazakii* and *C. malonaticus* capsule types with neonatal meningitis and necrotizing enterocolitis. BMC Genomics. 16:758. doi: 10.1186/s12864-015-1960-z.
321. Ogrodzki, P., S.J. Forsythe (2017): DNA-Sequence Based Typing of the *Cronobacter* Genus Using MLST, CRISPR-cas Array and Capsular Profiling. Front. Microbiol. 8:1875. doi: 10.3389/fmicb.2017.01875.
322. Oliver, J.D. (2010): Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. FEMS Microbiol. Rev. 34(4):415-25. doi: 10.1111/j.1574-6976.2009.00200.x.

323. Oliver, E.D. (1997): Atypical, non-lactose fermenting isolates shown to be total coliforms by the β -galactosidase (ONPG) reaction. AWWA Water Technology Conference, Seite: 225-231.
324. Ongrádi, J. (2002): Vaginal infection by *Enterobacter sakazakii*. Sex. Transm. Infect. 78(6):467. doi: 10.1136/sti.78.6.467-a.
325. Osaili, T., S. Forsythe (2009): Desiccation resistance and persistence of *Cronobacter* species in infant formula. Int. J. Food Microbiol. 136(2):214-20. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.08.006.
326. Osaili, T.M., R.R. Shaker, A.N. Olaimat, A.A. Al-Nabulsi, M.A. Al-Holy, S.J. Forsythe (2008): Detergent and sanitizer stresses decrease the thermal resistance of *Enterobacter sakazakii* in infant milk formula. J. Food Sci. 73(3):M154-7. doi: 10.1111/j.1750-3841.2008.00671.x.
327. Osaili, T.M., R.R. Shaker, M.S. Al-Haddaq, A.A. Al-Nabulsi, R.A. Holley (2009): Heat resistance of *Cronobacter species (Enterobacter sakazakii)* in milk and special feeding formula. J. Appl. Microbiol. 107(3):928-35. doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04271.x.
328. Osterblad, M., O. Pensala, M. Peterzéns, H. Heleniusc, P. Huovinen (1999): Antimicrobial susceptibility of *Enterobacteriaceae* isolated from vegetables. J. Antimicrob. Chemother. 43(4):503-9. doi: 10.1093/jac/43.4.503.
329. O'Toole, G., H.B. Kaplan, R. Kolter (2000): Biofilm formation as microbial development. Annu. Rev. Microbiol. 54:49-79. doi: 10.1146/annurev.micro.54.1.49.
330. Ottaviani F., M. Zucchi, G. Tugnoli, C. Mazzini (1992): Remarks on gram-negative bacteria recovered from vegetable salads by Fc and presumptive *Escherichia coli*-tests. Ind. Aliment. 31:541-545.
331. Ozturk, S., S. Ercisli (2006): The chemical composition of essential oil and in vitro antibacterial activities of essential oil and methanol extract of *Ziziphora persica* Bunge. J. Ethnopharmacol. 106(3):372-6. doi: 10.1016/j.jep.2006.01.014.
332. Pagotto, F.J., J.M. Farber (2009): *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*): advice, policy and research in Canada. Int. J. Food Microbiol. 136(2):238-45. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.05.010.
333. Pagotto, F.J., M. Nazarowec-White, S. Bidawid, J.M. Farber (2003): *Enterobacter sakazakii*: infectivity and enterotoxin production in vitro and in vivo. J. Food Prot. 66(3):370-5. doi: 10.4315/0362-028x-66.3.370.
334. Pakbin, B., W.M. Brück, S. Allahyari, J.W.A. Rossen, R. Mahmoudi (2022): Antibiotic resistance and molecular characterization of *Cronobacter sakazakii* strains isolated from powdered infant formula milk. Foods. 11(8):1093. doi: 10.3390/foods11081093.
335. Pan, Z., J. Cui, G. Lyu, X. Du, L. Qin, Y. Guo, B. Xu, W. Li, Z. Cui, C. Zhao (2014): Isolation and molecular typing of *Cronobacter* spp. in commercial powdered infant

- formula and follow-up formula. *Foodborne Pathog. Dis.* 11(6):456-61. doi: 10.1089/fpd.2013.1691.
336. Pangalos, G. (1929): Sur un bacille chromogène isolé par hémoculture. *C.R. Soc. Biol. (Comptes Rendus Seances Soc. Biol.)*, 100:1097.
337. Park, S., S. Shukla, Y. Kim, S. Oh, S. Hun Kim, M. Kim (2012): Development of sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Cronobacter muytjensii* (formerly called *Enterobacter sakazakii*). *Microbiol Immunol.* 56(7):472-9. doi: 10.1111/j.1348-0421.2012.00466.x.
338. Parra-Flores, J., A. Rodriguez, F. Riffo, S.M. Arvizu-Medrano, E.V. Arias-Rios, J. Aguirre (2015): Investigation on the factors affecting *Cronobacter sakazakii* contamination levels in reconstituted powdered infant formula. *Front. Pediatr.* 3:72. doi: 10.3389/fped.2015.00072.
339. Parra-Flores, J., F. Cerda-Leal, A. Contreras, N. Valenzuela-Riffo, A. Rodríguez, J. Aguirre (2018): *Cronobacter sakazakii* and microbiological parameters in dairy formulas associated with a food alert in Chile. *Front. Microbiol.* 9:1708. doi: 10.3389/fmicb.2018.01708.
340. Parra-Flores, J., O. Holý, F. Riffo, S. Lepuschitz, E. Maury-Sintjago, A. Rodríguez-Fernández, A. Cruz-Córdova, J. Xicohtencatl-Cortes, J. Mancilla-Rojano, M. Troncoso, G. Figueroa, W. Ruppitsch, S. Forsythe (2021): Profiling the virulence and antibiotic resistance genes of *Cronobacter sakazakii* strains isolated from powdered and dairy formulas by whole-genome sequencing. *Front. Microbiol.* 12:694922. doi: 10.3389/fmicb.2021.694922.
341. Parra-Flores, J., O. Holý, S. Acuña, S. Lepuschitz, A. Pietzka, A. Contreras-Fernández, P. Chavarría-Sepulveda, A. Cruz-Córdova, J. Xicohtencatl-Cortes, J. Mancilla-Rojano, A. Castillo, W. Ruppitsch, S. Forsythe (2022): Genomic characterization of *Cronobacter* spp. and *Salmonella* spp. strains isolated from powdered infant formula in Chile. *Front. Microbiol.* 13:884721. doi: 10.3389/fmicb.2022.884721.
342. Patrick, M.E., B.E. Mahon, S.A. Greene, J. Rounds, A. Cronquist, K. Wymore, E. Boothe, S. Lathrop, A. Palmer, A. Bowen (2014): Incidence of *Cronobacter* spp. infections, United States, 2003-2009. *Emerg Infect Dis.* 2014 Sep;20(9):1520-3. doi: 10.3201/eid2009.140545.
343. Pava-Ripoll, M., R.E. Pearson, A.K. Miller, G.C. Ziobro (2012): Prevalence and relative risk of *Cronobacter* spp., *Salmonella* spp., and *Listeria monocytogenes* associated with the body surfaces and guts of individual filth flies. *Appl. Environ. Microbiol.* 78(22):7891-902. doi: 10.1128/AEM.02195-12.

344. Pavlovic, M., R. Konrad, I. Huber, U. Busch (2011): Einsatz von MALDI-TOF MS zur Identifizierung von Mikroorganismen in der Lebensmittelanalytik. *Deutsche Lebensmittelrundschau* 107(3):9-16.
345. Pei, X., Y. Li, H. Zhang, L. Zhan, X. Yu, G. Lan, H. Jia, N. Li, D. Yang, L. Mei (2019): Surveillance and characterisation of *Cronobacter* in powdered infant formula processing factories *Food Control* 96:318-323. doi: 10.1016/j.foodcont.2018.09.009.
346. Pightling, A.W., F. Pagotto (2014): Draft Genome Sequence of *Cronobacter sakazakii* Clonal Complex 45 Strain HPB5174, Isolated from a Powdered Infant Formula Facility in Ireland. *Genome Announc.* 2(4):e00778-14. doi: 10.1128/genomeA.00778-14.
347. Pitout, J.D., E.S. Moland, C.C. Sanders, K.S. Thomson, S.R. Fitzsimmons (1997): Beta-lactamases and detection of beta-lactam resistance in *Enterobacter* spp. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41(1):35-9. doi: 10.1128/AAC.41.1.35.
348. Poirel, L., P. Nordmann, C. De Champs, C. Eloy (2007): Nosocomial spread of QnrA-mediated quinolone resistance in *Enterobacter sakazakii*. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 29(2):223-224. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2006.08.011.
349. Posautz, A., M.P. Szostak, A. Cabal Rosel, F. Allerberger, A. Stöger, G. Rab, A.T. Feßler, J. Spargser, A. Küber-Heiss, S. Schwarz, S.J. Forsythe, Ruppitsch, I. Loncaric (2022): Outbreak of *Cronobacter turicensis* in European brown hares (*Lepus europaeus*). *Lett. Appl. Microbiol.* 74(6):1008-1015. doi: 10.1111/lam.13685.
350. Power, K.A., Q. Yan, E.M. Fox, S. Cooney, S. Fanning (2013): Genome sequence of *Cronobacter sakazakii* SP291, a persistent thermotolerant isolate derived from a factory producing powdered infant formula. *Genome Announc.* 1(2):e0008213. doi: 10.1128/genomeA.00082-13.
351. Pribyl, C., R. Salzer, J. Beskin, R.J. Haddad, B. Pollock, R. Beveille, B. Holmes, W.J. Mogabgab (1985): Aztreonam in the treatment of serious orthopedic infections. *Am. J. Med.* 78:51-56.
352. Prosser, J.I., B.J. Bohannon, T.P. Curtis, R.J. Ellis, M.K. Firestone, R.P. Freckleton, J.L. Green, L.E. Green, K. Killham, J.J. Lennon, A.M. Osborn, M. Solan, C.J. van der Gast, J.P. Young (2007): The role of ecological theory in microbial ecology. *Nat. Rev. Microbiol.* 5(5):384-92. doi: 10.1038/nrmicro1643.
353. Proudly, I., D. Bouglé, R. Leclercq, M. Vergnaud (2008): Tracing of *Enterobacter sakazakii* isolates in infant milk formula processing by BOX-PCR genotyping, *J. Appl. Microbiol.* 105(2):550–558. doi: 10.1111/j.1365-2672.2008.03775.x.
354. Putthana, V., M. Marounek, N. Brenova, J. Mrazek, D. Lukesova (2012): Isolation and characterization of *Cronobacter* spp. from environmental and food resources. *Agricultura Tropica et Subtropica*, 45(1):5-11. doi: 10.2478/v10295-012-0001-z.

6 Literaturverzeichnis

355. Rahn, O. (1937): New principles for the classification of bacteria. Zentralbl. Bakteriolog. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt 2 96:273–286.
356. Ravisankar, S., S.S. Syed, P. Garg, J. Higginson (2014): Is *Cronobacter sakazakii* infection possible in an exclusively breastfed premature neonate in the neonatal intensive care unit? J. Perinatol. 34(5):408-9. doi: 10.1038/jp.2014.14.
357. Ray, P., A. Das, V. Gautam, N. Jain, A. Narang, M. Sharma (2007): *Enterobacter sakazakii* in infants: novel phenomenon in India. Indian J. Med. Microbiol. 25(4):408-10. doi: 10.4103/0255-0857.37351.
358. Reeves, P.R., M. Hobbs, M.A. Valvano, M. Skurnik, C. Whitfield, D. Coplin, N. Kido, J. Klena, D. Maskell, C.R. Raetz, P.D. Rick (1996): Bacterial polysaccharide synthesis and gene nomenclature. Trends Microbiol. 4(12):495-503. doi: 10.1016/s0966-842x(97)82912-5.
359. Reich, F., R. König, W. von Wiese, G. Klein (2010): Prevalence of *Cronobacter* spp. in a powdered infant formula processing environment. Int. J. Food Microbiol. 140(2-3):214-7. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.03.031.
360. Reij, M.W., I. Jongenburger, E. Gkogka, L.G. Gorris, M.H. Zwietering (2009): Perspective on the risk to infants in the Netherlands associated with *Cronobacter* spp. occurring in powdered infant formula. Int. J. Food Microbiol. 136(2):232-7. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.07.011.
361. Restaino, L., E.W. Frampton, W.C. Lionberg, R.J. Becker (2006): A chromogenic plating medium for the isolation and identification of *Enterobacter sakazakii* from foods, food ingredients, and environmental sources. J. Food Prot. 69(2):315-22. doi: 10.4315/0362-028x-69.2.315.
362. Richards, G.M., J.B. Gurtler, L.R. Beuchat (2005): Survival and growth of *Enterobacter sakazakii* in infant rice cereal reconstituted with water, milk, liquid infant formula, or apple juice. J. Appl. Microbiol. 99(4):844-50. doi: 10.1111/j.1365-2672.2005.02656.x.
363. Richardson, A.N., S. Lambert, M.A. Smith (2009): Neonatal mice as models for *Cronobacter sakazakii* infection in infants. J. Food Prot. 72(11):2363-7. doi: 10.4315/0362-028x-72.11.2363.
364. Richtlinie 1999/21/EG der Kommission vom 25. März 1999 über diätetische Lebensmittel für besondere medizinische Zwecke (Text von Bedeutung für den EWR). Official Journal L 091 , 07/04/1999 P. 0029 – 0036.
365. Richtlinie 2006/141/EG der Kommission vom 22. Dezember 2006 über Säuglingsanfangsnahrung und Folgenahrung und zur Änderung der Richtlinie 1999/21/EG Text von Bedeutung für den EWR. Official Journal L 401, 30/12/2006, P. 1-33.

366. Riedel, K., A. Lehner (2007): Identification of proteins involved in osmotic stress response in *Enterobacter sakazakii* by proteomics. *Proteomics*. 7(8):1217-31. doi: 10.1002/pmic.200600536.
367. Rietschel, E.T., T. Kirikae, F.U. Schade, U. Mamat, G. Schmidt, H. Loppnow, A.J. Ulmer, Zähringer U., Seydel U., Di Padova F., *et al.* (1994): Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB J.* 8(2):217-25. doi: 10.1096/fasebj.8.2.8119492.
368. Robertson, L.J., G.S. Johannessen, B.K. Gjerde, S. Loncarevic (2002): Microbiological analysis of seed sprouts in Norway. *Int. J. Food Microbiol.* 75(1-2):119-26. doi: 10.1016/s0168-1605(01)00738-3.
369. Roig-Sagués, A.X., A.P. Molina, M.M. Hernández-Herrero (2002): Histamine and tyromine-forming microorganisms in Spanish traditional cheeses. *European Food Research Technology*, 215:96-100.
370. Ruan, J., M. Li, Y.P. Liu, Y.Q. Li, Y.X. Li (2013): Rapid and sensitive detection of *Cronobacter* spp. (previously *Enterobacter sakazakii*) in food by duplex PCR combined with capillary electrophoresis-laser-induced fluorescence detector. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 921-922:15-20. doi: 10.1016/j.jchromb.2013.01.008.
371. Salmon, S.A., J.L. Watts, F.M. Aarestrup, J.W. Pankey, R.J. Jr. Yancey (1998): Minimum inhibitory concentrations for selected antimicrobial agents against organisms isolated from the mammary glands of dairy heifers in New Zealand and Denmark. *J. Dairy Sci.* 81(2):570-8. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(98)75610-3.
372. Samadpour, M., L. Benoit, S. Myoda, B. Hans, C. Nadala, S.H. Kim, E. Themeli, R. Cantera, T. Nguyen, H. Richter (2024): Microbiological survey and genomic analysis of *Cronobacter sakazakii* strains isolated from US households and retail foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 90(7):e0070024. doi: 10.1128/aem.00700-24.
373. Sanjaq, S. (2008): *Enterobacter sakazakii* - Risikoprofil und Untersuchungen zum Nachweis in Säuglingsnahrungen. Diss. oec. troph. JLU Gießen, VVB Laufersweiler Verlag, Gießen, Deutschland.
374. 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), Calgary, Canada, 13-16 Aug. 2006.
375. Schalch, B., H. Eisgruber, A. Stolle (1994): Microwave-reheating of vacuum-packaged cooked sausage cold cuts for shelf life improvement. *Fleischerei* 45:4-12.
376. Scharinger, E.J., R. Dietrich, T. Wittwer, E. Märtlbauer, K. Schauer (2017): Multiplexed Lateral Flow Test for Detection and Differentiation of *Cronobacter sakazakii* Serotypes O1 and O2. *Front. Microbiol.* 8:1826. doi: 10.3389/fmicb.2017.01826.

6 Literaturverzeichnis

377. Scheepe-Leberkuhne, M., F. Wagner (1986): Optimization and preliminary characterization of an exopolysaccharide synthesised by *Enterobacter sakazakii*. *Biotechnology Letter* 8:695–700.
378. Schindler, P.R.G., H. Metz (1990): Enumeration of coliforms in rinsed beer mugs-identification via the API 20E-system and antibiotic resistance patterns. *Öffentl. Gesundheits.* 52: 592-597
379. See, K.C., H.A. Than, T. Tang (2007): *Enterobacter sakazakii* bacteraemia with multiple splenic abscesses in a 75-year-old woman: a case report. *Age Ageing*. 36(5):595-6. doi: 10.1093/ageing/afm092.
380. Seo, K.H., R.E. Brackett (2005): Rapid, specific detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula using a real-time PCR assay. *J. Food Prot.* 68(1):59-63. doi: 10.4315/0362-028x-68.1.59.
381. Shaker, R.R., T.M. Osaili, A.S. Abu Al-Hasan, M.M. Ayyash, S.J. Forsythe (2008): Effect of desiccation, starvation, heat, and cold stresses on the thermal resistance of *Enterobacter sakazakii* in rehydrated infant milk formula. *J. Food. Sci.* 73(7):M354-9. doi: 10.1111/j.1750-3841.2008.00880.x.
382. Shaker, R., T. Osaili, W. Al-Omary, Z. Jaradat, M. Al-Zuby (2007): Isolation of *Enterobacter sakazakii* and other *Enterobacter* sp. from food and food production environments. *Food Control* 18(10):1241-1245. doi:10.1016/j.foodcont.2006.07.020.
383. Shashkov, A.S., M. Wang, E.M. Turdymuratov, S. Hu, N.P. Arbatsky, X. Guo, L. Wang, Y.A. Knirel (2015): Structural and genetic relationships of closely related O-antigens of *Cronobacter* spp. and *Escherichia coli*: *C. sakazakii* G2594 (serotype O4)/*E. coli* O103 and *C. malonaticus* G3864 (serotype O1)/*E. coli* O29. *Carbohydr. Res.* 404:124-31. doi: 10.1016/j.carres.2014.11.014.
384. Shin, H., J.H. Lee, Y. Kim, S. Ryu (2012): Complete genome sequence of *Cronobacter sakazakii* bacteriophage CR3. *J. Virol.* 86(11):6367-8. doi: 10.1128/JVI.00636-12.
385. Silva, J.N., L. Vasconcellos, S.J. Forsythe, I. de Filippis, M. Luiz Lima Brandão (2019): Molecular and phenotypical characterization of *Cronobacter* species isolated with high occurrence from oats and linseeds. *FEMS Microbiol. Lett.* 366(1). doi: 10.1093/femsle/fny289.
386. Simmons, B.P., M.S. Gelfand, M. Haas, L. Metts, J. Ferguson (1989): *Enterobacter sakazakii* infections in neonates associated with intrinsic contamination of a powdered infant formula. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 10(9):398-401. doi: 10.1086/646060.
387. Singamsetty, V.K., Y. Wang, H. Shimada, N.V. Prasadarao (2008): Outer membrane protein A expression in *Enterobacter sakazakii* is required to induce microtubule condensation in human brain microvascular endothelial cells for invasion. *Microb Pathog.* 45(3):181-91. doi: 10.1016/j.micpath.2008.05.006.

388. Singh, N., G. Goel, M. Raghav (2015): Insights into virulence factors determining the pathogenicity of *Cronobacter sakazakii*. *Virulence* 6(5):433-40. doi: 10.1080/21505594.2015.1036217.
389. Siqueira Santos, R.F., N. da Silva, V.C. Amstalden Junqueira, M. Kajsik, S. Forsythe, J.L. Pereira (2013): Screening for *Cronobacter* species in powdered and reconstituted infant formulas and from equipment used in formula preparation in maternity hospitals. *Ann. Nutr. Metab.* 63(1-2):62-8. doi: 10.1159/000353137.
390. Smith, S.G., Mahon, V., Lambert, M.A., Fagan, R.P. (2007): A molecular Swiss army knife: OmpA structure, function and expression. *FEMS Microbiol. Lett.* 273(1):1-11. doi: 10.1111/j.1574-6968.2007.00778.x.
391. Sonbol, H., S. Joseph, C.M. McAuley, H.M. Craven, S.J. Forsythe (2013): Multilocus sequence typing of *Cronobacter* spp. from powdered infant formula and milk powder production factories. *Int. Dairy Journal* 30(1):1-7. doi:10.1016/j.idairyj.2012.11.004.
392. Song, D., Q. Su, A. Jia, S. Fu, X. Ma, T. Li, C. Man, X. Yang, Y. Jiang (2023): A Method to Directly Identify *Cronobacter sakazakii* in Liquid Medium by MALDI-TOF MS. *Foods*. 12(10):1981. doi: 10.3390/foods12101981.
393. Soriano, J.M., H. Rico, J.C. Moltó, J. Mañes (2001): Incidence of microbial flora in lettuce, meat and Spanish potato omelette from restaurants. *Food Microbiol.* 18(2):159-163. doi:10.1006/fmic.2000.0386.
394. Stephan, R., A. Lehner, P. Tischler, T. Rattei (2011): Complete genome sequence of *Cronobacter turicensis* LMG 23827, a food-borne pathogen causing deaths in neonates. *J. Bacteriol.* 193(1):309-10. doi: 10.1128/JB.01162-10.
395. Stephan, R., C.J. Grim, G.R. Gopinath, M.K. Mammel, V. Sathyamoorthy, L.H. Trach, H.R. Chase, S. Fanning, B.D. Tall (2014): Re-examination of the taxonomic status of *Enterobacter helveticus*, *Enterobacter pulveris* and *Enterobacter turicensis* as members of the genus *Cronobacter* and their reclassification in the genera *Franconibacter* gen. nov. and *Siccibacter* gen. nov. as *Franconibacter helveticus* comb. nov., *Franconibacter pulveris* comb. nov. and *Siccibacter turicensis* comb. nov., respectively. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 64(10):3402-3410. doi: 10.1099/ijs.0.059832-0.
396. Stephan, R., S. Van Trappen, I. Cleenwerck, C. Iversen, H. Joosten, P. De Vos, A. Lehner (2008): *Enterobacter pulveris* sp. nov., isolated from fruit powder, infant formula and an infant formula production environment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58(1):237-41. doi: 10.1099/ijs.0.65427-0.
397. Stephan, R., S. Van Trappen, I. Cleenwerck, M. Vancanneyt, P. De Vos, A. Lehner (2007): *Enterobacter turicensis*, sp. nov. and *Enterobacter helveticus*, sp. nov. isolated from fruit powder. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57: 820-826. 10.1099/ijs.0.64650-0.

6 Literaturverzeichnis

398. Stoll, B.J., N. Hansen, A.A. Fanaroff, J.A. Lemons (2004): *Enterobacter sakazakii* is a rare cause of neonatal septicemia or meningitis in VLBW infants. *J. Pediatr.* 144(6):821-3. doi: 10.1016/j.jpeds.2004.02.045.
399. Stoop, B., A. Lehner, C. Iversen, S. Fanning, R. Stephan (2009): Development and evaluation of *rpoB* based PCR systems to differentiate the six proposed species within the genus *Cronobacter*. *Int. J. Food Microbiol.* 136(2):165-8. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.04.023.
400. Strydom, A., M. Cameron, R. Corli Witthuhn (2011): PCR-RFLP analysis of the *rpoB* gene to distinguish the five species of *Cronobacter*. *Food Microbiol.* 28(8):1472-7. doi: 10.1016/j.fm.2011.08.015.
401. Strydom, J., J.R. Cope, H. Martin, C. Tarr, K. Hise, S. Collier, A. Bowen (2020): Food safety and invasive *Cronobacter* infections during early infancy, 1961-2018. *Emerg. Infect. Dis.* 26(5):857–65. doi: 10.3201/eid2605.190858.
402. Sun, Y., M. Wang, H. Liu, J. Wang, X. He, J. Zeng, X. Guo, K. Li, B. Cao, L. Wang (2011): Development of an O-antigen serotyping scheme for *Cronobacter sakazakii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 77(7):2209-14. doi: 10.1128/AEM.02229-10.
403. Sun, Y., M. Wang, Q. Wang, B. Cao, X. He, K. Li, L. Feng, L. Wang (2012): Genetic analysis of the *Cronobacter sakazakii* O4 to O7 O-antigen gene clusters and development of a PCR assay for identification of all *C. sakazakii* O serotypes. *Appl. Environ. Microbiol.* 78(11):3966-74. doi: 10.1128/AEM.07825-11.
404. Szafranek, J., M. Czerwicka, J. Kumirska, M. Paszkiewicz, E. Łojkowska (2005): Repeating unit structure of *Enterobacter sakazakii* ZORB 741 O-Polysaccharide. *Polish Journal of Chemistry*, 79:287–295.
405. Tall, B.D., J. Gangiredla, G.R. Gopinath, Q. Yan, H.R. Chase, B. Lee, S. Hwang, L. Trach, E. Park, Y. Yoo, T. Chung, S.A. Jackson, I.R. Patel, V. Sathyamoorthy, Pava- M. Ripoll, M.L. Kotewicz, L. Carter, C. Iversen, F. Pagotto, R. Stephan, A. Lehner, S. Fanning, C.J. Grim (2015): Development of a Custom-Designed, Pan Genomic DNA Microarray to Characterize Strain-Level Diversity among *Cronobacter* spp. *Front. Pediatr.* 30;3:36. doi: 10.3389/fped.2015.00036.
406. Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei, S. Kumar (2011): MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28(10):2731-9. doi: 10.1093/molbev/msr121.
407. Teramoto, S., Y. Tanabe, E. Okano, T. Nagashima, M. Kobayashi, Y. Etoh (2010): A first fatal neonatal case of *Enterobacter sakazakii* infection in Japan. *Pediatr. Int.* 52(2):312-3. doi: 10.1111/j.1442-200X.2010.03030.x.

408. Townsend, S., E. Hurrell, S. Forsythe (2008): Virulence studies of *Enterobacter sakazakii* isolates associated with a neonatal intensive care unit outbreak. BMC Microbiol. 8:64. doi: 10.1186/1471-2180-8-64.
409. Townsend, S.M., E. Hurrell, I. Gonzalez-Gomez, J. Lowe, J.G. Frye, S. Forsythe, J.L. Badger (2007): *Enterobacter sakazakii* invades brain capillary endothelial cells, persists in human macrophages influencing cytokine secretion and induces severe brain pathology in the neonatal rat. Microbiology (Reading). 153(10):3538-3547. doi: 10.1099/mic.0.2007/009316-0.
410. Tseng, T.T., B.M. Tyler, J.C. Setubal (2009): Protein secretion systems in bacterial-host associations, and their description in the Gene Ontology. BMC Microbiol. 9 Suppl 1:S2. doi: 10.1186/1471-2180-9-S1-S2.
411. Turcovský, I., K. Kuniková, H. Drahovská, E. Kačíková (2011): Biochemical and molecular characterization of *Cronobacter* spp. (formerly *Enterobacter sakazakii*) isolated from foods. Antonie Van Leeuwenhoek. 99(2):257-69. doi: 10.1007/s10482-010-9484-7.
412. Umeda, N.S., I. de Filippis, S.J. Forsythe, M.L.L. Brandão (2017): Phenotypic characterization of *Cronobacter* spp. strains isolated from foods and clinical specimens in Brazil. Food Res. Int. 102:61-67. doi: 10.1016/j.foodres.2017.09.083.
413. Urmenyi, A.M., A.W. Franklin (1961): Neonatal death from pigmented coliform infection. Lancet. 1(7172):313-5. doi: 10.1016/s0140-6736(61)91481-7.
414. van Acker, J., F. de Smet, G. Muyldermans, A. Bougateg, A. Naessens, S. Lauwers (2001): Outbreak of necrotizing enterocolitis associated with *Enterobacter sakazakii* in powdered milk formula. J. Clin. Microbiol. 39(1):293-7. doi: 10.1128/JCM.39.1.293-297.2001.
415. Vasconcellos, L., C.T. Carvalho, R.O. Tavares, V. de Mello Medeiros, C. de Oliveira Rosas, J.N. Silva, S.M. Dos Reis Lopes, S.J. Forsythe, M.L.L. Brandão (2018): Isolation, molecular and phenotypic characterization of *Cronobacter* spp. in ready-to-eat salads and foods from Japanese cuisine commercialized in Brazil. Food Res. Int. 107:353-359. doi: 10.1016/j.foodres.2018.02.048.
416. Vlach, J., B. Javůrková, L. Karamonová, M. Blažková, L. Fukal (2017): Novel PCR-RFLP system based on *rpoB* gene for differentiation of *Cronobacter* species. Food Microbiol. 62:1-8. doi: 10.1016/j.fm.2016.08.004.
417. Vojkowska, H., R. Karpiskova, M. Orieskova, H. Drahovska (2016): Characterization of *Cronobacter* spp. isolated from food of plant origin and environmental samples collected from farms and from supermarkets in the Czech Republic. Int. J. Food Microbiol. 217:130-6. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.10.017.

418. Von Westerholt, F., F.A. Butler (2020): Bayesian estimation of the concentration of microbial organisms in powdered foods arising from repeat testing for microbial contamination. *Microb. Risk Anal.* 14:100083.
419. Von Westerholt, F., U. Gonzales-Barron, F. Butler (2016): A Bayesian approach to estimating the uncertainty in the distribution of *Cronobacter* spp. in powdered infant formula arising from microbiological criteria test outcomes. *Microb. Risk Anal.* 4:36-42. doi:10.1016/j.mran.2016.08.002.
420. Wang, L., Q. Wang, P.R. Reeves (2010): The variation of O antigens in gram-negative bacteria. *Subcell Biochem.* 53:123-52. doi: 10.1007/978-90-481-9078-2_6.
421. Wang, Q., S.J. Forsythe, X.J. Zhao, Z.W. Wang, D. Li, D. Ma, J.Y. Cao, J. Zeng (2019): Species identification and molecular characterization of *Cronobacter* spp. isolated from food imported over nine years into Beijing, China. *Food Microbiol.* 82:11-19. doi: 10.1016/j.fm.2019.01.011.
422. Wang, Q., X.J. Zhao, Z.W. Wang, L. Liu, Y.X. Wei, X. Han, J. Zeng, W.J. Liao (2017): Identification of *Cronobacter* species by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry with an optimized analysis method. *J. Microbiol. Methods.* 139:172-180. doi: 10.1016/j.mimet.2017.05.016.
423. Wang, W., A.V. Perepelov, L. Feng, S.D. Shevelev, Q. Wang, S.N. Senchenkova, W. Han, Y. Li, A.S. Shashkov, Y.A. Knirel, P.R. Reeves, L. Wang (2007): A group of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* O antigens sharing a common backbone structure. *Microbiology (Reading).* 153(7):2159-2167. doi: 10.1099/mic.0.2007/004192-0.
424. Wang, X., Y. Wang, N. Ling, Y. Shen, D. Zhang, D. Liu, D. Ou, Q. Wu, Y. Ye (2021): Effects of tolC on tolerance to bile salts and biofilm formation in *Cronobacter malonaticus*. *J. Dairy Sci.* 104(9):9521-9531. doi: 10.3168/jds.2021-20128.
425. Watanabe, I., M. Esaki (1994): Studies on an unusual case of fermentation of meat-products during the curing process. *J. Antibact. Antifung. Agents* 22:9-14.
426. Weiss, C., B. Becker, W. Holzappel (2005): Application and acceptability of three commercial systems for detection of *Enterobacter sakazakii* in ready-to-eat vegetable salads. *Archiv für Lebensmittelhygiene* 56:34-38.
427. Wesche, A.M., B.P. Marks, E.T. Ryser (2005): Thermal resistance of heat-, cold-, and starvation-injured *Salmonella* in irradiated comminuted Turkey. *J. Food Prot.* 68(5):942-8. doi: 10.4315/0362-028x-68.5.942.
428. Wieser, A., L. Schneider, J. Jung, S. Schubert (2012): MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics-identification of microorganisms and beyond (mini review). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 93(3):965-74. doi: 10.1007/s00253-011-3783-4.

429. Williams, M.M., E.B. Braun-Howland (2003): Growth of *Escherichia coli* in model distribution system biofilms exposed to hypochlorous acid or monochloramine. *Appl. Environ. Microbiol.* 69(9):5463-71. doi: 10.1128/AEM.69.9.5463-5471.2003.
430. Williams, T.L., S.R. Monday, S. Edelson-Mammel, R. Buchanan, S.M. Musser (2005): A top-down proteomics approach for differentiating thermal resistant strains of *Enterobacter sakazakii*. *Proteomics*. 5(16):4161-9. doi: 10.1002/pmic.200401263.
431. Xu, X., Y. Zhang, M Shi, W. Sheng, X. Du, M. Yuan, S. Wang (2014): Two novel analytical methods based on polyclonal and monoclonal antibodies for the rapid detection of *Cronobacter* spp.: Development and application in powdered infant formula. *LWT-Food Sci. Technol.* 56:335–340. doi:10.1016/j.lwt.2013.11.028.
432. Xu, Y.Zh., A. Métris, D.M. Stasinopoulos, S.J. Forsythe, J.P. Sutherland (2015): Effect of heat shock and recovery temperature on variability of single cell lag time of *Cronobacter turicensis*. *Food Microbiol.* 45(Pt B):195-204. doi: 10.1016/j.fm.2014.04.003.
433. Yan, Q., K.A. Power, S. Cooney, E. Fox, G.R. Gopinath, C.J. Grim, B.D. Tall, M.P. McCusker, S. Fanning (2013): Complete genome sequence and phenotype microarray analysis of *Cronobacter sakazakii* SP291: a persistent isolate cultured from a powdered infant formula production facility. *Front. Microbiol.* 4:256. doi: 10.3389/fmicb.2013.00256.
434. Yan, Q.Q., O. Condell, K. Power, F. Butler, B.D. Tall, S. Fanning (2012): *Cronobacter* species (formerly known as *Enterobacter sakazakii*) in powdered infant formula: a review of our current understanding of the biology of this bacterium. *J. Appl. Microbiol.* 113(1):1-15. doi: 10.1111/j.1365-2672.2012.05281.x.
435. Yang, H.L., X.L. Sun, W. Song, Y.S. Wang, M.Y. Cai (1999): Screening, identification and distribution of endophytic associative diazotrophs isolated from rice plants. *Acta Botan. Sin.* 41:927-931.
436. Yang, L., L. Wei, M. Gu, X. Fang, P. Yang (2009): Identification of proteins involved in infactivity and enterotoxin production in *Enterobacter sakazakii*. *J. Rapid Met. Automation in Microbiol.* 7(2):164-181. doi: 10.1111/j.1745-4581.2009.00169.x
437. Yao, K., K.F. N'guessan, N. Y. Zinzendorf, K.A. Kouassi, K. C. Kouassi, Y.G. Loukou, P.L. Kouamé (2016): Isolation and characterization of *Cronobacter* spp. from indigenous infant flours sold in public health care centres within Abidjan, Côte d'Ivoire. *Food Control* 62:224-230. doi: 10.1016/j.foodcont.2015.10.041.
438. Ye, Y., N. Ling, R. Jiao, Q. Wu, Y. Han, J. Gao (2015): Effects of culture conditions on the biofilm formation of *Cronobacter sakazakii* strains and distribution of genes involved in biofilm formation. *LWT - Food Science and Technology* 62(1):1-6. doi: 10.1016/j.lwt.2015.01.035.

439. Ye, Y, Q. Wu, X. Xu, X. Yang, X. Dong, J. Zhang (2010): The phenotypic and genotypic characterization of *Enterobacter sakazakii* strains from infant formula milk. J. Dairy Sci. 93(6):2315-20. doi: 10.3168/jds.2009-2662.
440. Polat Yemiş, G., P. Delaquis (2020): Natural Compounds With Antibacterial Activity Against *Cronobacter* spp. in Powdered Infant Formula: A Review. Front. Nutr. 7:595964. doi: 10.3389/fnut.2020.595964.
441. Yoneyama, H., R. Katsumata (2006): Antibiotic resistance in bacteria and its future for novel antibiotic development. Biosci Biotechnol Biochem. 70(5):1060-75. doi: 10.1271/bbb.70.1060.
442. Zeng, H., C. Li, N. Ling, J. Zhang, M. Chen, T. Lei, S. Wu, X. Yang, D. Luo, Y. Ding, J. Wang, S. Zhang, Q. Wu (2020): Prevalence, genetic analysis and CRISPR typing of *Cronobacter* spp. isolated from meat and meat products in China. Int. J. Food Microbiol. 321:108549. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108549.
443. Zhang, H., P. Hou, H. Lv, Y. Chen, X. Li, Y. Ren, M. Wang, H. Tan, Z. Bi (2017): Surveillance and molecular typing of *Cronobacter* spp. in commercial powdered infant formula and follow-up formula from 2011 to 2013 in Shandong Province, China. J. Sci. Food Agric. 97(7):2141-2146. doi: 10.1002/jsfa.8021.
444. Zhao, T., M.R.S. Clavero, M.P. Doyle, L.R. Beuchat (1997): Health Relevance of the Presence of Fecal Coliforms in Iced Tea and Leaf Tea. J. Food Prot. 60(3):215-218. doi: 10.4315/0362-028X-60.3.215.
445. Zhao, X., C.-W. Lin, J. Wang, D.H. Oh (2014): Advances in rapid detection methods for foodborne pathogens. J Microbiol Biotechnol 24:297-312. doi:10.4014/jmb.1310.10013.
446. Zhao, Y., Y. Yao, M. Xiao, Y. Chen, C.C. Lee, L. Zhang, K.X. Zhang, S. Yang, M. Gu (2013): Rapid detection of *Cronobacter sakazakii* in dairy food by biofunctionalized magnetic nanoparticle based on nuclear magnetic resonance. Food Control 34:436-443. doi:10.1016/j.foodcont.2013.05.004.
447. Zhou, Y., Q. Wu, X. Xu, X. Yang, Y. Ye, J. Zhang (2008): Development of an immobilization and detection method of *Enterobacter sakazakii* from powdered infant formula. Food Microbiol. 25(5):648-52. doi: 10.1016/j.fm.2008.04.001.
448. Zhu, S., S. Ratering, S. Schnell, R. Wacker (2011): Matrix-assisted laser desorption and ionization-time-of-flight mass spectrometry, 16S rRNA gene sequencing, and API 32E for identification of *Cronobacter* spp.: a comparative study. J. Food Prot. 74(12):2182-7. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-11-205.
449. Zogaj, X., W. Bokranz, M. Nimtz, U. Römling (2003): Production of cellulose and curli fimbriae by members of the family *Enterobacteriaceae* isolated from the human gastrointestinal tract. Infect. Immun 71(7):4151-8. doi:10.1128/iai.71.7.4151-4158.2003.

7 Anhang

1. Akineden, Ö., Heinrich, V., Gross, M., Usleber, E., 2017.

Reassessment of *Cronobacter* spp. originally isolated as *Enterobacter sakazakii* from infant food.

Food Microbiology, 65:44-50.

Doi: 10.1016/j.fm.2017.01.021

2. Akineden, Ö., Murata, K. J., Gross, M., Usleber, E., 2015.

Microbiological Quality of Raw Dried Pasta from the German Market, with Special Emphasis on *Cronobacter* Species.

Journal of Food Science, 80: M2860-M2867.

Doi: 10.1111/1750-3841.13117.

3. Rehagel, C., Akineden, Ö., Usleber, E., 2022.

Microbiological and mycotoxicological assessment of processed cereal-based complementary foods for infants and young children from the German market.

Journal of Food Science, 87:1810-1822.

Doi: 10.1111/1750-3841.16106.

Microbiological and mycotoxicological analyses of processed cereal-based complementary foods for infants and young children from the German market

Christina Rehagel  | Ömer Akineden  | Ewald Usleber

Dairy Sciences, Institute of Veterinary Food Science, Justus-Liebig University Giessen, Giessen, Germany

Correspondence

Christina Rehagel, Dairy Sciences, Institute of Veterinary Food Science, Justus-Liebig University Giessen, Ludwigstrasse 21, D-35390 Giessen, Germany.
Email: Christina.Rehagel@vetmed.uni-giessen.de

Abstract

This study investigated several food safety criteria in 38 different commercial products of processed cereal-based foods (PCF) from the German market. Microbiological assessment, followed by 16S RNA gene sequencing of suspect colonies, included aerobic mesophilic bacteria, moulds, *Enterobacteriaceae*, *Cronobacter* spp., and presumptive *Bacillus cereus*. Mycotoxin analyses were performed by enzyme immunoassays for deoxynivalenol (DON), zearalenone (ZEN), T-2/HT-2 toxins (T-2/HT-2; oat containing products only), ergot alkaloids (EA), and alternariol (AOH). No violative result above existing European Union regulations or international guidelines was obtained. Most samples had very low aerobic mesophilic cell counts ($<2.0 \times 10^1$ CFU/g), the maximum was 9.6×10^2 CFU/g. A few samples contained low numbers of opportunistic pathogens, most notably *Cronobacter sakazakii*, *Acinetobacter* spp., *Pantoea* spp., and enterotoxigenic *Bacillus wiedmannii*. Levels of mycotoxin contamination were very low, well below European Union maximum limits. DON was found in 10 samples, at levels of 9–35 $\mu\text{g}/\text{kg}$. T-2/HT-2 were found in all 15 oat-based products (1–8 $\mu\text{g}/\text{kg}$). All samples were negative for ZEN and EA. A high number ($n = 25$) of samples yielded weakly positive results for the nonregulated AOH (0.4–2 $\mu\text{g}/\text{kg}$), but just three samples exceeded a level of 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$. No relationship between cereal composition and analytical findings for microbiological parameters and mycotoxins could be found. As long as PCF meals are freshly prepared and consumed immediately after preparation, the risk from sporadically occurring opportunistic bacteria appears to be minimal.

KEYWORDS

enzyme immunoassay, infant food, mycotoxins, pathogenic bacteria, processed cereal-based foods

This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/) License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.

© 2022 The Authors. *Journal of Food Science* published by Wiley Periodicals LLC on behalf of Institute of Food Technologists

1 | INTRODUCTION

Complementary feeding is defined as the period when complementary foods are given together with either breast milk or formula or both. Typically beginning at an age between 4 and 6 months, complementary foods are gradually introduced into the diet of infants, and commercial cereal-based foods play a major role during this period (EFSA, 2019). Processed cereal-based foods (PCF) are defined as containing simple or mixed cereals, which are ready to eat after reconstitution with milk or water (EU, 2013). PCFs are not sterile products, and microbial contamination of cereal grains may occur at various stages of production (Los et al., 2018). With a total revenue in 2020 of, for example, 6.4 billion US\$ (United States) and 0.6 billion US\$ (Germany), “baby food” (total) constitutes just a minor ($\approx 0.5\%$) part of the total revenues of food industry in industrialized countries (Pham, 2021). No market data for PCF could be obtained from published literature. However, infant food in general is a highly sensitive market segment, which has to deal with the vulnerability of babies, and with the attitude of parents with regard to food quality and safety. Therefore, the number of companies producing and distributing such products is quite small, just a few different brands dominate the German market, and different brands may in fact have been produced in the same factory.

In contrast to commercial milk-based powdered infant formulae, pathogenic bacteria in PCFs are not specifically regulated within the European Union, except of the more general commitments arising from the “precautionary principle.” For example, notorious pathogenic/toxigenic bacteria occurring in cereals are *Cronobacter* spp. and *Bacillus cereus* (Akineden et al., 2015; Kim et al., 2011; Lou et al., 2019), both regulated in infant formulae, but not in PCF, by the European Commission (EC, 2005).

Concerning mycotoxins, a substantial reduction may be achieved during cereal processing for some compounds, but not all mycotoxins can be completely removed (Karlovsky et al., 2016). Maximum levels (ML) have been set for some mycotoxins in PCFs, including aflatoxins ($0.1 \mu\text{g}/\text{kg}$), ochratoxin A (OTA, $0.5 \mu\text{g}/\text{kg}$), deoxynivalenol (DON, $200 \mu\text{g}/\text{kg}$), zearalenone (ZEN, $20 \mu\text{g}/\text{kg}$), fumonisins ($200 \mu\text{g}/\text{kg}$), and, most recently, ergot alkaloids (EA, sum of 12 congeners, $20 \mu\text{g}/\text{kg}$) (EC, 2006b). With regard to T-2/HT-2 toxins (T-2/HT-2), an “indicative level” of $15 \mu\text{g}/\text{kg}$, from which onwards further investigations should be performed, was published for PCFs for infants and young children (EC, 2013). No specific regulations have been issued for alternariol (AOH), or other *Alternaria* toxins, in any country of the world. However, risk and exposure assessments published by the European Food Safety Authority (EFSA), underlined the need to further consider AOH as a relevant mycotoxin, and established a

preliminary “threshold of toxicological concern” (TTC) of $2.5 \text{ ng}/\text{kg}$ body weight (b.w.) and day (EFSA, 2011, 2016).

Although the importance of commercial PCF for infant nutrition certainly is high in industrialized countries, the number of published studies dealing with the microbiological and mycotoxicological quality of such products is surprisingly small, and just one study dealt with both (Assunção et al., 2021).

Surveys on PCF studying microbiological criteria with a broader scope are rare (Kim et al., 2011), but *Cronobacter* spp. (Kim et al., 2011; Ziver et al., 2020) and *B. cereus* (Assunção et al., 2021) have been detected with some frequency. The number of published mycotoxin surveys in PCF is also limited, and even fewer recent data are available (Mallmann et al., 2020). Most studies so far included DON, which was found in up to 50% of PCF samples worldwide (Assunção et al., 2018; Braun et al., 2020; Herrera et al., 2019; Juan et al., 2014; Oueslati et al., 2018; Pereira et al., 2015). The average DON contamination was at $10\text{--}100 \mu\text{g}/\text{kg}$, but in some cases exceeded $200 \mu\text{g}/\text{kg}$. Depending on the type of cereal, other mycotoxins have been reported with varying frequency over the last 20 years. T-2/HT-2 were predominantly found in oat-containing PCF (Al-Taher et al., 2017; Assunção et al., 2018; Braun et al., 2020; Gotthardt et al., 2019; Juan et al., 2014; Oueslati et al., 2018; Pereira et al., 2015). For AOH and EA, just a small number of published studies is available (Lombaert et al., 2003; Mulder et al., 2015; Reinhard et al., 2008; Scott et al., 2012). Gotthardt et al. (2019) analyzed 25 samples of PCF from the German market for AOH and five other *Alternaria* toxins, the most abundant compound was tenuazonic acid, while low levels ($0.76\text{--}7.17 \mu\text{g}/\text{kg}$) of AOH were detected in just six samples.

Considering the scarcity of analytical data, the aim of this study was to elucidate the safety of PCF from the German market with regard to microbiological criteria and mycotoxin contamination, including both known opportunistic pathogens and notorious mycotoxins, plus some less well-studied parameters (Gram-negative bacteria, presumptive *B. cereus*, EA, AOH).

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Sample materials and sampling

Between November 2019 and March 2020, 38 dairy-free samples of PCF, recommended age of consumption “after the fourth month” up to “after the sixth month,” were purchased from local retail stores, drugstores, and specialized organic retail stores in the area of Giessen, Germany. According to product labels, the samples originated from 12 companies (trade names), most were labeled as

German produce, but 10 samples were from four other countries within the European Union. The samples were collected with the aim that all dairy-free PCF brands from all producers were included in the study. The majority of PCF products is marketed countrywide, so the collection of samples can be attributed as typical for dairy-free PCFs as available from the German market. Nowadays, all brands of PCFs available in Germany are labeled as of “organic produce.” Single-grain products ($n = 25$) contained millet, spelt, oats, wheat, barley, rye, rice, or maize. Multi-grain products ($n = 13$) contained at least two, up to seven, of these cereals. All products were supplemented with thiamine (vitamin B₁) according to Commission directive 2006/125/EC (EC, 2006a). All products were available in dry form, either as powder or as granulate material, ready for consumption after the addition of 10 volumes of milk, water, or milk diluted with water (1 + 1, by volume). All samples, which contained one to two portions (150–250 g each) of PCF in sealed sachets (paper or aluminum-coated foil), encased in a cardboard package, were stored dry at room temperature until testing. Before opening, each sachet was manually shaken to enhance homogeneity of the material thoroughly homogenized by swiveling the package. The test portion for microbiological analyses was taken out of this sachet under sterile conditions. For microbiological analysis, approximately 50 g were taken from each package under antiseptic conditions, and transferred to a sterile sealable glass bottle. The remaining material was filled into sealable plastic cans and used for mycotoxin analysis.

2.2 | Mycotoxin analysis

2.2.1 | Chemicals, reagents, and buffers

Ergometrine (synonym: ergonovine), ergocristine, DON, and ZEN were purchased from Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Germany). AOH was obtained from Cayman Chemicals (Hamburg, Germany). T-2 toxin was from Biopure (Tulln, Austria). Ergotamine D-tartrate (Fluka®) and methanol (Riedel-de Haën®) were from Honeywell (Charlotte, NC, USA). Acetonitrile and ethyl acetate were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). All reagents used were at least of analytical grade. For the analysis of EA, a toxin standard mixture of ergometrine, ergocristine, and ergotamine D-tartrate in a ratio of 1:10:14 (w/w/w; Gross et al., 2018) with a total alkaloid concentration of 25 µg/ml was prepared. All mycotoxin stock solutions (except T-2/HT-2) were checked for purity and correct concentration by UV spectroscopy (Shimadzu, Duisburg, Germany), using published spectra and absorption coefficients (Cole et al., 2003). Phosphate-buffered

saline (PBS) contained 6.79 g of NaCl, 1.47 g of Na₂HPO₄, and 0.43 g of KH₂PO₄ in 1 L of a. dest. (0.01 mol/L, pH 7.3). For AOH extraction, PBS consisted of 6.79 g of NaCl, 2.94 g of Na₂HPO₄, and 0.86 g of KH₂PO₄ in 1 L of a. dest. (pH 7.2). Sodium bicarbonate buffer contained 1.59 g of Na₂CO₃ and 2.93 g of NaHCO₃ in 1 L of a. dest. (0.05 mol/L, pH 9.6). Washing solution contained 8.5 g NaCl and 0.25 ml of Tween in 1 L of a. dest. For the enzyme substrate/chromogen solution, H₂O₂-citrate buffer (8.3 g citric acid, 49 ml KOH (1 mol/L), 72 µl 30% aqueous H₂O₂, 160 ml a. dest; pH 3.9) and TMB solution (50.4 mg 3,3',5,5'-TMB, 1 ml acetone, 9 ml methanol) were used. The enzyme substrate/chromogen solution was prepared according to Ackermann et al. (2011). Shortly before use, 0.5 ml of TMB was added to 10 ml of H₂O₂-citrate buffer.

2.2.2 | Sample extract preparation

In general, sample extract preparation for all mycotoxins was performed as described by Liesener et al. (2010), except for AOH which was extracted by a modification of the procedure described by Ackermann et al. (2011). All procedures had to be adopted to meet the requirements of the highly absorptive PCF matrix. All primary extractions were done with 5 g of sample material mixed with 50 ml of solvent in a beaker and magnetic stirring at full speed (400 rpm) for 30 min. For some toxins, extraction was followed by a centrifugation step (10 min at 3000 × g for DON and ZEN; 4 min at 11,000 × g for EA). Filtration was done using paper filters.

T-2/HT-2 were extracted with 50 ml of water containing 70% methanol. A 2 ml portion of the filtered extract was mixed with 2 ml of distilled water and extracted twice by liquid–liquid partitioning with each 3 ml portions of ethyl acetate. The two ethyl acetate phases were removed after centrifugation (3000 × g, 15 min) and combined, then the solvent was evaporated at 50°C in a rotary evaporator. The residue was dissolved with 0.2 ml of methanol and 1.8 ml of PBS (pH 7.3), using ultra-sonication in a water bath for 2 min. This extract was mixed with 1 ml of n-heptane on a wrist-action shaker. The phases were separated by centrifugation (3000 × g, 15 min). The lower aqueous phase was collected and analyzed by enzyme immunoassay (EIA) either directly (sample dilution factor: 10), or after dilution with PBS (pH 7.3) containing 10% methanol.

DON was extracted essentially by the same procedure as for T-2/HT-2, except that extraction solvent was PBS containing 10% methanol, and that no extract defatting step with n-hexane was necessary. After rotary evaporation, the residue was dissolved with 1 ml of PBS (pH 7.3). This extract was analyzed either directly (sample dilution factor: 5), or after dilution with PBS (pH 7.3).

ZEN was extracted with distilled water containing 84% acetonitrile. After centrifugation and filtration, 100 μ l of the filtrate was mixed with 1.58 ml PBS (pH 7.3) to obtain a 5% acetonitrile/PBS solution for EIA analysis (sample dilution factor: 168). Further dilutions were made with 5% acetonitrile/PBS.

EAs were extracted with PBS pH 6.0 containing 60% acetonitrile and stirred for 30 min on a magnetic stirrer (400 rpm). After the solid particles had settled, 2 ml of this extract were transferred into a 2 ml Eppendorf vial and centrifuged (11,000 \times g, 4 min, 20°C). For EIA analysis, 100 μ l of this extract was mixed with 0.9 ml PBS, pH 6.0 (sample dilution factor: 100). Further dilutions were made with 5% acetonitrile/PBS pH 6.0.

AOH was extracted with PBS containing 70% methanol, the apparent pH value was adjusted to approximately 7.0 with 3 mol/L NaOH. The extract was filtrated and 2 ml was mixed with 2 ml of distilled water. The mixture was extracted twice by liquid–liquid partitioning with each 3 ml of ethyl acetate followed by centrifugation. The two organic phases were pooled, the solvent evaporated, and the residue dissolved with 1 ml of PBS for 2 min by ultrasonication in a water bath. The resulting extract was analyzed either directly (sample dilution factor: 5), or after dilution with PBS.

Recovery was tested by adding toxin standard solutions to dry sample materials before extraction. Three different toxin levels, and three different sample materials per level, were tested for each mycotoxin. The lowest concentration used for fortification of samples was 3–10 times the calculated LOD of each method. T-2/HT-2 were analyzed only in products, which were labeled as containing oats ($n = 15$). Further, the test samples, which gave the highest toxin results in the enzyme immunoassays (EIAs) for DON, T-2/HT-2, and AOH, were each spiked with the respective toxin at the same level, to double the natural amount of toxin, and then were reanalyzed.

2.2.3 | EIA analyses

All competitive EIAs were performed as microtiter plate (MaxiSorp, Nunc, Roskilde, Denmark) assays as described previously for DON, ZEN, T-2/HT-2, EA, and AOH (Gross et al., 2018). Some important EIA test characteristics are compiled in Table 1. Four replicate wells were tested for each standard concentration and for each dilution of sample extract solution. The resulting EIA absorbance values at 450 nm were measured with a model Sunrise microplate reader (Tecan, Crailsheim, Germany) and evaluated by Magellan EIA calculation software (Tecan). All values were then standardized as percent relative absorbance of the blank (B_0), by dividing the mean absorbance values of

standard or sample solutions through the absorbance of B_0 , multiplying by 100 ($B/B_0 \times 100$). The standard curve detection limits were set as cut-off values of 70%–80% as described for each EIA in the original studies. Recovery was routinely checked, before the start and during the analyses of each series, by addition of 50–100 μ l of toxin standard solution at appropriate concentrations to dry samples before extraction, and allowing for the solvent to evaporate. Each three samples with different matrix composition were tested for each test system. The calculated mean detection limit of each test system for PCF was derived from the mean standard curve detection limit, multiplied by the minimum sample dilution factor, without considering recovery. All toxin concentrations for naturally contaminated samples were reported without correction for the analytical recovery.

2.3 | Microbiological analyses

Microbiological parameters included nonspecific hygiene indicators (aerobic mesophilic plate count (APC), *Enterobacteriaceae*, moulds) and specific pathogenic (*Cronobacter* spp.) or enterotoxin-producing enterotoxigenic bacteria (presumptive *B. cereus*).

All sample materials were prepared for analysis according to ISO 6887-4:2017. For all tests, a 10 g test portion was mixed with 190 ml of 0.1% sterile peptone water (Oxoid, Wernigerode, Germany) in a sterile plastic bag and homogenized in a paddle blender (Stomacher). Two further decimal dilutions (2×10^{-2} ; 2×10^{-3}) were prepared with sterile peptone water (Oxoid). Each 100 μ l of the original homogenate and the two dilutions were spread onto two plates and 1 ml of the original homogenate onto four plates of the appropriate media. All sample homogenates were analyzed in duplicate. Taking into account the minimum dilution factor, the detection limit was 2.0×10^1 colony forming units (CFU)/g. All incubation of plates were done under aerobic conditions.

The number of aerobic mesophilic bacteria was determined on plate count agar (PC agar, Oxoid) plates according to ISO 4833-2:2014, incubation was at 30°C for 24–48 h.

The enumeration of *Enterobacteriaceae* was done on Violet Red Bile Glucose (VRBG) agar plates according to ISO 21528-2:2017, incubation was 37°C for 24–48 h.

Mould counts were determined on Sabouraud agar plates with chloramphenicol 0.5 g/L (Oxoid), with an incubation at 25°C for 3–5 days.

Presumptive *B. cereus* were isolated by surface plating on polymyxin egg yolk mannitol bromthymol blue agar, PEMBA (Oxoid) according to ISO 7932:2004, and incubation at 30°C for 24 h. Colonies showing typical

TABLE 1 Overview of enzyme immunoassays (EIAs) used in this study and test performance in relationship to benchmark values

EIA system			Test sensitivity achieved		
Name	Known relevant cross-reactions	Reference	Mean LOD, standard curve cut-off value (ng/ml)	LOD in PCF ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Benchmark value, $\mu\text{g}/\text{kg}$
DON	DON and its 8-ketotrichothecene analogues	(Usleber et al., 1991; Curtui et al., 2003)	2 ± 0.5	10	200 ^a
ZEN	ZEN and their analogues	(Usleber et al., 1992; Seidler, 2007)	0.04 ± 0.02	7	20 ^a
T-2/HT-2	T-2, HT-2	(Esgin et al., 1989)	0.05 ± 0.01	0.5	15 ^b
EA	All EAs and isomers	(Gross et al., 2018)	0.3 ± 0.05	30	20 ^a
AOH	None	(Ackermann et al., 2011)	0.4 ± 0.05	0.3	1 ^c

^aEC (2006b).^bEC (2013).^cEstimated from threshold of toxicological concern (TTC) value (2.5 ng/kg body weight (b.w.) and day; EFSA, 2011), assuming a b.w. of 10 kg and a daily consumption of 25 g dry product.

Abbreviations: DON, deoxynivalenol; ZEN, zearalenone, EA, ergot alkaloids; AOH, alternariol.

morphology, blue color, and a precipitation zone were transferred to Columbia agar supplemented with 5% of sheep blood (30°C, 24 h). Isolates identified as presumptive *B. cereus* on PEMBA were tested for toxin production (hemolysin BL [Hbl]; nonhemolytic enterotoxin [Nhe]) with the Duopath® *Cereus* Enterotoxins immunoassay (Merck).

Cronobacter spp. were qualitatively detected by method ISO 22964:2017. A 10 g portion of the sample was reconstituted with 190 ml buffered peptone water (Oxoid, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) according to ISO 6887-4:2017, and pre-enriched at 37°C for 18 h. Then, 0.1 ml was added to 10 ml of *Cronobacter* Selective Broth (CSB; Oxoid Thermo Fisher) and cultured at 41.5°C for 24 h. A 10 μl portion was streaked onto Chromogenic *Cronobacter* Isolation agar (CCI Agar; Oxoid Thermo Fisher) with a loop, and incubated at 41.5°C for 24 h. Colonies which were identified as tentative *Cronobacter* were further characterized by a commercial biochemical identification system (API32E; bio-Mérieux, Marcy l'Etoile, France), and then identified on species level by analyzing the *fusA* gene sequences as described previously by Akineden et al. (2017).

Further characterization of randomly chosen isolates was done if a noticeable colony growth was observed on PC agar, VRBG agar, PEMBA, or CCI Agar, excluding typical aerobic spore forming bacteria on PC agar, which frequently grew on PC agar in low densities. One or more typical, morphologically distinct colony was selected and purified by streaking onto Columbia blood agar. The genomic DNA was extracted from single colonies with a commercial test system (DNeasy blood and tissue kit, Qiagen). Species identification of isolates was done by amplification and

sequencing of the 16S rRNA gene (Kuhnert et al., 1996). For species identification, sequences were compared using the “Basic Local Alignment Search Tool” (BLAST) at the National Centre for Biotechnology Information (NCBI) website (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

3 | RESULTS AND DISCUSSION

3.1 | Microbiological analyses

The vast majority of samples were negative for *Enterobacteriaceae*, moulds, and for presumptive *B. cereus* (Table 2). Each sample yielded visible colony growth on VRBG (sample #6) and PEMBA (#20), respectively. Four samples had mould counts at the detection limit of (2.0–4.0 $\times 10^1$ CFU/g), and only one sample (#17) was moderately positive for moulds at 2.0 $\times 10^2$ CFU/g. On CCI agar, two samples (#6, #17) resulted in colony growth, indicative for *Cronobacter* spp.

With regard to aerobic mesophilic bacteria, the majority of samples (24 of 38) were negative, six were weakly positives (10¹–10² CFU/g). However, eight samples had colony counts of $\geq 10^2$ CFU/g, highest result was obtained for sample #6 (9.6 $\times 10^2$ CFU/g). As far as we know, no specific regulation for aerobic colony counts in PCF exist, neither in the European Union nor elsewhere. However, this parameter has been addressed as a “useful testing” criterion by the International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF), and limits/g in a range of $m = 1 \times 10^3$ – 5×10^3 to $M = 1 \times 10^4$ – 5×10^4 have been suggested (ICMSF, 2011). The ML obtained in our study were 1–2 orders of magnitude lower than that,

TABLE 2 Quantitative results for aerobic mesophilic bacteria, Enterobacteriaceae, moulds, and presumptive *Bacillus cereus* in processed cereal-based foods (PCF) ($n = 38$), number of sample per interval

CFU/g interval	Aerobic mesophilic bacteria	Enterobacteriaceae	Moulds	Presumptive <i>Bacillus cereus</i>
Negative, $< 2.0 \times 10^1$	24	37	33	37
$10^1 - < 10^2$	6	0	4	1 ^b
$10^2 - < 10^3$	8	1 ^a	1	0

^aIdentified as *Acinetobacter baumannii* (non-Enterobacteriaceae).^bIdentified as *Bacillus wiedmannii*.**TABLE 3** Identification of isolates from plate count agar (PC agar) of processed cereal-based foods (PCF) based on partial sequencing of the 16S rRNA gene

No. of sample and isolate	No. of isolate analyzed	Phylogenetic affiliation	Designation of isolate	Sequence length (bp)	Identity % (query coverage)	Closest species (NCBI accession number)
3	3	<i>Moraxella osloensis</i>	BBK 10/20	1304	99.23 (99)	<i>Moraxella osloensis</i> DSM 6998 ^T (NR_104936.1)
		<i>Moraxella osloensis</i>	BBK 14/20	1304	99.69 (100)	<i>Moraxella osloensis</i> DSM 6998 ^T (NR_104936.1)
		<i>Moraxella osloensis</i>	BBK19/20-pca2	1310	99.54 (99)	<i>Moraxella osloensis</i> DSM 6998 ^T (NR_104936.1)
2	2	<i>Acinetobacter baumannii</i>	BBK 6/20	1308	99.85 (99)	<i>Acinetobacter baumannii</i> DSM 30007 ^T (NR_117677)
		<i>Acinetobacter nosocomialis</i>	BBK12/20-cci	1312	99.62 (99)	<i>Acinetobacter nosocomialis</i> DSM 102856 ^T (NR_117931.1)
1	1	<i>Pantoea brenneri</i>	BBK17/20	1181	99.41 (100)	<i>Pantoea brenneri</i> DSM 24232 ^T (NR_116748.1)
1	1	<i>Microbacterium zeae</i>	BBK13/20	1294	99.07 (99)	<i>Microbacterium zeae</i> DSM 100750 ^T (NR_149816.1)
1	1	<i>Chryseobacterium hominis</i>	BBK18/20-pca2	1238	98.54 (100)	<i>Chryseobacterium hominis</i> DSM 30866 ^T (NR_042517.2)
1	1	<i>Janibacter melonis</i>	BBK19/20-pca1	1293	99.61 (100)	<i>Janibacter melonis</i> DSM 16063 ^T (NR_025805.1)
1	1	<i>Micrococcus aloeverae</i>	BBK18/20-pca1	1295	99.77 (99)	<i>Micrococcus aloeverae</i> DSM 27472 ^T (NR_134088.1)
4	1	<i>Bacillus subtilis</i>	BBK12/20-pca	1324	99.85 (99)	<i>Bacillus subtilis</i> DSM 10 ^T (NR_027552.1)

supporting the conclusion that for this parameter, a good overall quality of all products could be assumed. Nevertheless, each one to two characteristic isolates representing the dominant type of colony morphology per PC agar plate, from a total of 14 positive samples, were further identified, using biochemical methods and 16S rDNA sequencing, to obtain some preliminary information about the spectrum of bacterial species in PCF (Table 3). The dominant isolates from four samples were identified as *Bacillus subtilis*. For colony growth on the remaining 10 PC agar plates, non-spore forming bacteria dominated. The identified species presented a very diverse spectrum of bacteria and included Gram-negative (*Acinetobacter nosocomialis*, *Chryseobac-*

terium hominis, *Moraxella osloensis*, *Pantoea brenneri*) and Gram-positive (*Janibacter melonis*, *Microbacterium zeae*, *Micrococcus luteus* [syn. *M. aloeverae*]) species (Table 3). All these species have been isolated from various environmental habitats including plants, but also from infant formulae and from clinical specimen, some as commensal bacteria, but some have been involved in nosocomial human infectious diseases (Rajilić-Stojanović & de Vos, 2014).

Species identification after 16S RNA gene analysis of one suspect colony growth on VRBG (sample #6) revealed that this was not caused by a member of the *Enterobacteriaceae* family but by *Acinetobacter baumannii*.

Interestingly, the same species was identified from plate count agar of sample #6, indicating that *A. baumannii* was a major bacterial species in this particular sample material. Furthermore, species identification of suspect *Cronobacter* spp. from CCI of sample #6 showed that it was *C. sakazakii*, thereby confirming co-contamination with both opportunistic pathogens, which both have a history of causing foodborne infectious disease in newborns and infants <6 months of age (Amorim & Nascimento, 2017; Taylor et al., 2021).

Cronobacter spp. was isolated from the CCI plate of a second sample (#17), and this isolate also turned out to be *C. sakazakii*. Another isolate from this sample, collected from PC agar, was identified as *Pantoea brenneri*. Most *Pantoea* spp. are ubiquitous on plants and in water, but also have been frequently isolated from infant formulae (Estuningsih et al., 2006), and have been associated with very rare but severe cases of septicaemia in newborn or immunocompromised infants (Bergman et al., 2007).

Cronobacter spp., specifically *C. sakazakii*, probably have been the most notorious foodborne pathogens in commercial, milk-based powdered infant formulae in the last decades (Muytjens et al., 1988; Taylor et al., 2021). *Cronobacter* spp. have also been isolated from various cereal-based foods (Akineden et al., 2017; Friedemann, 2007; Lou et al., 2019; Silva et al., 2019), but little information about the frequency in PCF is available. In our study, colony forming units of *Cronobacter* spp. were obtained only by using 10 g test portions, and including a pre-enrichment step. Low levels of contamination, usually lower than 1 CFU/g (Al-Holy et al., 2011; Muytjens et al., 1988), seem to be typical for *Cronobacter* in dried foods. In the European Union, PCF for infants and young children are regulated under the Commission Directive 2006/125/EC (EC, 2006a), but this does not include microbiological criteria. *Cronobacter* spp., presumptive *B. cereus*, and *Enterobacteriaceae* in milk-based commercial formulae for infants <6 months of age are covered by European Union regulation No. 2073/2005 (EC, 2005), but this regulation does not apply to PCF.

Four samples yielded a weakly positive result for moulds, all near the detection limit (2.0×10^1 CFU/g) of the method. By microscopy, all were tentatively identified as *Penicillium* spp. No further attempt was made to identify and characterize these colonies at the species level.

Only one sample (#20) yielded colony growth on PEMBA (2.0×10^1 CFU/g), indicative for presumptive *B. cereus*. Further 16S rDNA sequence analysis identified this isolate as *Bacillus wiedmannii*, which is a member of the *B. cereus* group (Miller et al., 2016). This isolate also showed hemolytic activity on blood agar and was positive for Nhe and Hbl in the Duopath® *Cereus* Enterotoxins test (Merck). Toxigenic strains of the *B. cereus* group species

have previously been reported in infant foods, including cereal-based products (Kim et al., 2011; Sadek et al., 2018). Severe outbreaks of intoxication associated with enterotoxigenic *B. cereus* spp. in food consumed by children have been reported (Delbrassinne et al., 2015; Dierick et al., 2005), but these cases were also characterized by improper food handling. At such a low level of contamination, which would have been well below even the European Union requirements for infant formulae (EC, 2005), this does not appear to be a food safety issue.

Summarizing the results of the microbiological analyses, all samples had low or very low colony counts, and five out of 38 PCF products were found to be positive, at low level, for one or two bacterial species that have been associated with rare cases of newborn or preterm infant disease. Nine other samples contained moulds or commensal bacteria at low numbers. We agree with the opinion expressed by the ICMSF (2011) that findings in such a range cannot be regarded as a direct threat to the health of infants ≥ 4 months of age, as long as the product is prepared and handled according to the recommendations. Further, no clear association between a specific PCF ingredient or mixture of ingredients and the occurrence of specific bacteria could be detected, also because the majority of products contained mixed cereals. These products yielded most remarkable findings, including both *C. sakazakii* isolates, *A. baumannii*, *P. brenneri*, and *B. wiedmannii* (Table 4).

3.2 | Mycotoxin analyses

3.2.1 | Method validation

All PCF products under study were dried powdery or granular products of similar appearance, the ingredients presented a wide variety of different cereals as ingredients or ingredient mixtures. The majority of products in this study contained cereal mixtures, similar as observed from the display of products in eight local retail shops. Product labels listed up to seven different cereals, providing multiple potential sources for mycotoxin contamination. Out of the *Fusarium* mycotoxins under study, DON and ZEN were analyzed in all samples, T-2/HT-2 were analyzed in oat-containing products only, because oats appear to be by far the most relevant source in middle European cereals (EFSA, 2017). For each mycotoxin EIA, the mean limit of detection (LOD) as indicated by Liesener et al. (2010) was checked and verified, using spiked PCF sample material. The recovery experiments showed that the mean recovery rates for DON, T-2/HT-2, and AOH in spiked samples were in the range of 69%–120% (Table 5). For EA and ZEN, which were also analyzed in all samples, higher recoveries ranging from 115% to 160% were

TABLE 4 Compilation of samples which yielded highest or else remarkable results, with regard to either microbiological contamination or maximum mycotoxin levels

Parameter	Sample #						
	6	12	17	20	24	30	34
Composition	Oats, wheat, barley, spelt, rye	Wheat	Oats, einkorn wheat, barley, rye	Oats, wheat, rye, barley, spelt	Rice, maize, sorghum	Wheat, oats, rye, barley, sorghum, rice, maize	Wheat
Recommended age, months	≥6	≥4	≥6	≥6	≥4	≥6	≥4
Microbiology							
Aerobic mesophilic bacteria, CFU/g	9.6×10^2	3.6×10^2	1.2×10^2	$<2.0 \times 10^1$	$<2.0 \times 10^1$	$<2.0 \times 10^1$	$<2.0 \times 10^1$
Specific isolates	<i>C. sakazakii</i> , <i>A. baumannii</i>	<i>A. nosocomialis</i> , <i>B. subtilis</i>	<i>C. sakazakii</i> , <i>P. brenneri</i>	<i>B. wiedmannii</i>	-	-	-
Mycotoxin EIA results, µg/kg							
DON	<9	<9	15	<9	<9	11	35
T-2/HT-2	4	n.a.	5	5	n.a.	8	n.a.
AOH	1	<0.3	0.5	0.7	2	2	<0.3

Abbreviations: AOH, alternariol; DON, deoxynivalenol; EIA, enzyme immunoassay; n.a., not analyzed.

TABLE 5 Recovery of mycotoxins from artificially contaminated processed cereal-based foods (PCF) samples. Each level was spiked in triplicate

Test system for	Spiked level (µg/kg)	Toxin found	
		Mean recovery (%)	RSD (%)
DON	30	69	4
	50	78	4
	150	70	9
ZEN	20	155	9
	50	133	10
	100	127	5
T-2/HT-2	10	99	10
	20	120	19
	50	96	17
EA	100	160	29
	200	130	18
	500	115	9
AOH	3	72	18
	5	85	3
	10	75	10

Abbreviations: AOH, alternariol; DON, deoxynivalenol; EA, ergot alkaloids; RSD, relative standard deviation; ZEN, zearalenone.

determined. The high recoveries obtained for ZEN may be explained by some remaining matrix interference in the three selected materials, because the blank materials used for spiking were clearly below the LOD but yielded absorbance values of 93%–98% $B/B_0 \times 100$. Likewise, the high recovery rates for EA may also be explained by some

remaining matrix effects. Since both tests yielded toxin-negative results for all samples, no attempt was made to further improve sample extract preparation. Further studies will aim at optimizing the overall analytical strategy, including sample extraction and confirmation of positive results by, for example, an LC-MS/MS reference method.

Relative standard deviations (RSDs) of $\leq 10\%$ were found for DON and ZEN, whereas RSDs $< 20\%$ could be achieved for all other mycotoxins except for the $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ spiking level of EA (29%). Further, three samples containing each of the highest toxin level (Table 4) of DON (#34), T-2/HT-2 (#30), and AOH (#24) were spiked with the respective toxin and reanalyzed. After subtracting the measured toxin content of the nonspiked sample, recoveries of 77%–106% were obtained, which demonstrates a toxin-dependent additive effect and further indicates the suitability of the EIA methods.

While the sample extraction methods, and the overall method performance were considered to be sufficient, the relative cross-reactivities of the EIAs, specifically for T-2/HT-2 and EA may present some underestimate of the true toxin content, while the DON and AOH results could be an overestimate due to reactivity with toxin analogues. The LOD of the EIA method for EAs ($30 \mu\text{g}/\text{kg}$) did not fully meet the recently published European Union ML for this group of toxins in PCF ($20 \mu\text{g}/\text{kg}$), but still are at a very similar level.

3.2.2 | Mycotoxin frequency and levels

All samples, even rye-containing products, yielded clearly EA-negative results, which indicates that this group of mycotoxins does not play a relevant role in PCF from the German market (Table 6). EAs in cereals, even if present in the harvested lots, can easily be removed during the cleaning process, allowing selection of low-contamination batches for production of PCF. It could also be assumed that PCF producers were already aware of “soon to come” European Union regulations for EAs in 2019/2020. This could explain why the contamination situation as found in our study was better than that reported in a few previous studies. For example, breakfast cereals, biscuits, and cookies from the Dutch market 2010–2014 had mean total EAs levels of $10 \mu\text{g}/\text{kg}$, with some products exceeding $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ (Mulder et al., 2015). Apparently, dedicated PCF products were not included in this study. Similar results were reported in a 1997–1999 survey for Canadian products (Lombaert et al., 2003).

Like EAs, ZEN was also not detected in any sample. Although ZEN is a common contaminant in most cereals at the time of harvest, it is largely eliminated during the grain cleaning processes. Our results on the absence of ZEN at $< 7 \mu\text{g}/\text{kg}$ are supported by others who also found no ZEN, or just traces near $1 \mu\text{g}/\text{kg}$, in PCF from other European countries (Braun et al., 2020; Juan et al., 2014), while slightly higher concentrations were reported for such products from the United States (Al-Taher et al., 2017).

DON was found with relatively high frequency (26%) but at low levels (maximum concentration: $35 \mu\text{g}/\text{kg}$) in PCF products, regardless of cereal composition (Table 6). While most samples were negative ($< 9 \mu\text{g}/\text{kg}$), the majority of positive samples contained levels of just DON, probably the most frequent *Fusarium* toxin in cereals in Germany, and, in contrast to ZEN, removal during cereal processing is not fully efficient (Karlovsky et al., 2016), which may explain our findings. Similar findings have been reported by others (Herrera et al., 2019; Juan et al., 2014; Pereira et al., 2015).

T-2/HT-2 were found in all 15 oat-containing products, but again at very low concentrations between 1 and $8 \mu\text{g}/\text{kg}$ (Table 6). This was not unexpected, as previous surveys have shown that oat is the major, if not only, relevant cereal in Europe in aspects of T-2/HT-2 contamination (Curtui et al., 2009; Gottschalk et al., 2009; Kirinčič et al., 2015). None of the samples exceeded the guideline value of $15 \mu\text{g}/\text{kg}$. Our results are consistent with the findings of Al-Taher et al. (2017), who reported low levels of T-2/HT-2 ($< 10 \mu\text{g}/\text{kg}$) in oat-based and mixed-grain infant cereals from the U.S. market.

It was not surprising that a considerable part of the samples (66%) from each of the six product categories was positive for AOH ($0.4\text{--}2 \mu\text{g}/\text{kg}$) (Table 6), because AOH is the most frequent occurring *Alternaria* mycotoxin in food (EFSA, 2011). Similar levels of AOH ($< 10 \mu\text{g}/\text{kg}$) in single grain as well as in multi-grain baby foods had also been reported by Scott et al. (2012) and Gotthardt et al. (2019). However, the AOH levels in positive samples consistently were very low. In the absence of a full toxicological risk assessment, it is difficult to evaluate the relevance of these findings. Applying (i) the TTC recommended for AOH by EFSA ($2.5 \text{ ng}/\text{kg}$ b.w. and day; EFSA, 2011), (ii) assuming that 25 g PCF (dry product) is a reasonable daily serving size, and (iii) using a b.w. range (6–12 months) of 5–10 kg, the critical AOH concentration in PCF would be at $0.5\text{--}1 \mu\text{g}/\text{kg}$. This means that several samples would have approached or even exceeded this critical concentration, similar as estimated by EFSA in 2011 (EFSA, 2011). It has to be emphasized that the TTC approach for AOH is affected by several uncertainties, including the lack of in vivo toxicological data.

Co-occurrence of DON and AOH was observed in five samples (13%). Out of 15 oat-containing samples, which were all positive for T-2/HT-2, one additionally contained DON (oat-based product) and eight contained AOH (four oat-based products + four mixed-grain products). All three toxins were found in three oat-containing samples (mixed-grain products). This is not surprising, as the majority ($n = 7$) of these 12 co-contaminated oat-containing samples were composed of mixed cereals, providing different sources for contamination of fungal toxins, and similar

TABLE 6 Mycotoxin contamination in processed cereal-based foods (PCF) for infants and young children ($n = 38$) from the German market based on six product categories

	DON	ZEN	T-2/HT-2	EA	AOH
Spelt-based cereals ($n = 5$)					
Positive (%)	40	–	n.a.	–	60
Mean ^a ± SD	12 ± 3	<7	n.a.	<30	0.7 ± 0.2
Range ^a	11–14	<7	n.a.	<30	0.5–0.9
Wheat-based cereals ($n = 5$)					
Positive (%)	20	–	n.a.	–	40
Mean ^a ± SD	35	<7	n.a.	<30	0.7 ± 0.2
Range ^a	–	<7	n.a.	<30	0.6–0.8
Oat-based cereals ($n = 6$)					
Positive (%)	17	–	100	–	67
Mean ^a ± SD	17	<7	4 ± 1	<30	0.6 ± 0.1
Range ^a	–	<7	3–6	<30	0.4–0.7
Millet-based cereals ($n = 3$)					
Positive (%)	–	–	n.a.	–	100
Mean ^a ± SD	<9	<7	n.a.	<30	0.6 ± 0.1
Range ^a	<9	<7	n.a.	<30	0.5–0.7
Rice-based cereals ($n = 6$)					
Positive (%)	17	–	n.a.	–	33
Mean ^a ± SD	11	<7	n.a.	<30	1 ± 0.2
Range ^a	–	<7	n.a.	<30	1.1–1.5
Mixed-grain cereals ($n = 13$)					
Positive (%)	38	–	100 ^b	–	85
Mean ^a ± SD	13 ± 2	<7	4 ± 2	<30	0.9 ± 0.6
Range ^a	11–15	<7	1–8	<30	0.4–2

Note: Concentration values as mean ± standard deviation (SD) expressed in µg/kg.

Abbreviations: AOH, alternariol; DON, deoxynivalenol; EA, ergot alkaloids; n.a., not analyzed; ZEN, zearalenone.

^aPositive samples only.

^b $n = 9$.

findings have been reported for PCF products previously (Juan et al., 2014; Zhang et al., 2018).

Concluding the results of the mycotoxin analyses, contamination frequency of PCF with DON, T-2/HT-2, and AOH was within a span, which was expected from previous studies, but levels of contamination were all in the low range, well below the ML. The complete absence of detectable levels of ZEN and EAs may be explainable by careful cereal cleaning and selection and procedures.

4 | CONCLUSION

This is the first analysis of the PCFs from the German market, and the second one worldwide (Assunção et al., 2021), in which two major food safety categories have been studied, namely microbiological quality and contami-

nation with mycotoxins. Of course pathogenic, opportunistic, or spoilage bacteria have no direct relationship with fungal toxins. However, it may be argued that an overall deficit in maintaining effective measures to ensure food safety and quality in PCF production facilities may negatively impact both areas. Our study, although limited in sample number, included products of all major companies offering PCF products on the German market. All products fully complied with present European Union regulations of microbiological criteria and mycotoxin contamination. Very few samples (Table 4) yielded results which, in one or more parameters, surfaced the generally unremarkable data set of analytical findings. The risk from low levels of *Cronobacter* spp. and enterotoxigenic *Bacillus* spp., which are a major concern in infant formulae for preterm infants and neonates, can easily be avoided if PCF are prepared freshly for each meal and consumed immediately thereafter.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Christina Rehagel: Conceptualization; formal analysis; investigation; validation; visualization; writing – original draft; writing – review & editing. **Ömer Akineden:** Conceptualization; investigation; validation; visualization; writing – original draft; writing – review & editing. **Ewald Usleber:** Funding acquisition; project administration; resources; supervision; writing – review & editing.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ORCID

Christina Rehagel  <https://orcid.org/0000-0002-1816-4391>

Ömer Akineden  <https://orcid.org/0000-0002-0066-7054>

REFERENCES

- Ackermann, Y., Curtui, V., Dietrich, R., Gross, M., Latif, H., Märklbauer, E., & Usleber, E. (2011). Widespread occurrence of low levels of alternariol in apple and tomato products, as determined by comparative immunochemical assessment using monoclonal and polyclonal antibodies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 6360–6368. <https://doi.org/10.1021/jf201516f>
- Akineden, Ö., Murata, K. J., Gross, M., & Usleber, E. (2015). Microbiological quality of raw dried pasta from the German market, with special emphasis on *Cronobacter* species. *Journal of Food Science*, 80, M2860–M2867. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13117>
- Akineden, Ö., Heinrich, V., Gross, M., & Usleber, E. (2017). Reassessment of *Cronobacter* spp. originally isolated as *Enterobacter sakazakii* from infant food. *Food Microbiology*, 65, 44–50. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.01.021>
- Al-Holy, M. A., Shin, J.-H., Osaili, T. M., & Rasco, B. A. (2011). Evaluation of a new enrichment broth for detection of *Cronobacter* spp. in powdered infant formula. *Journal of Food Protection*, 74(3), 387–393. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-10-239>
- Al-Taher, F., Cappozzo, J., Zweigenbaum, J., Lee, H. J., Jackson, L., & Ryu, D. (2017). Detection and quantitation of mycotoxins in infant cereals in the U.S. market by LC-MS/MS using a stable isotope dilution assay. *Food Control*, 72, 27–35. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.07.027>
- Amorim, A. M. B., & Nascimento, J. S. (2017). *Acinetobacter*: an underrated foodborne pathogen? *The Journal of Infection in Developing Countries*, 11(2), 111–114. <https://doi.org/10.3855/jidc.8418>
- Assunção, R., Martins, C., Vasco, E., Jager, A., Oliveira, C., Cunha, S. C., Fernandes, J. O., Nunes, B., Loureiro, S., & Alvito, P. (2018). Portuguese children dietary exposure to multiple mycotoxins—An overview of risk assessment under MYCOMIX project. *Food and Chemical Toxicology*, 118, 399–408. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.05.040>
- Assunção, R., Boué, G., Alvito, P., Brazão, R., Carmona, P., Carvalho, C., Correia, D., Fernandes, P., Lopes, C., Martins, C., Membre, J.-M., Monteiro, S., Nabais, P., Thomsen, S. T., Torres, D., Pires, S. M., & Jakobsen, L. S. (2021). Risk-benefit assessment of cereal-based foods consumed by Portuguese children aged 6 to 36 months—A case study under the RiskBenefit4EU project. *Nutrients*, 13(9), 3127. <https://doi.org/10.3390/nu13093127>
- Bergman, K. A., Arends, J. P., & Schölvinck, E. H. (2007). *Pantoea agglomerans* septicemia in three newborn infants. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 26(5), 453–454. <https://doi.org/10.1097/01.inf.0000261200.83869.92>
- Braun, D., Eiser, M., Puntschner, H., Marko, D., & Warth, B. (2020). Natural contaminants in infant food: The case of regulated and emerging mycotoxins. *Food Control*, 123, 107676. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107676>
- Cole, R. J., Jarvis, B. B., & Schweikert, M. A. (2003). *Handbook of secondary fungal metabolites* (Vol. 3). Academic Press.
- Curtui, V., Seidler, C., Dietrich, R., Märklbauer, E., Schneider, E., & Usleber, E. (2003). Bestimmung von Deoxynivalenol in Brot und Bier. *Mycotoxin Research*, 19, 144–148.
- Curtui, V., Usleber, E., Trebstein, A., Lauber, U., Hocke, K., Dietrich, R., Märklbauer, E., Majerus, P., Zimmer, M., Klaffke, H., Gareis, M., Betsche, T., & Langenkämper, G. (2009). Improvement and validation of analytical methods for type A trichothecenes (T-2 toxin and HT-2 toxin) and occurrence of these mycotoxins in foods from the German market. Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE). https://service.ble.de/ptdb/index2.php?detail_id=88841&site_key=145&stichw=trichothecene&zeilenzahl_zaehler=4#newContent
- Delbrassinne, L., Botteldoorn, N., Andjelkovic, M., Dierick, K., & Denayer, S. (2015). An emetic *Bacillus cereus* outbreak in a kindergarten: detection and quantification of critical levels of cereulide toxin. *Foodborne Pathogens and Disease*, 12(1), 84–87. <https://doi.org/10.1089/fpd.2014.1788>
- Dierick, K., Van Collie, E., Swiecicka, I., Meyfroidt, G., Devlieger, H., Meulemans, A., Hoedemaekers, G., Fourie, L., Heyndrickx, M., & Mahillon, J. (2005). Fatal family outbreak of *Bacillus cereus*-associated food poisoning. *Journal of Clinical Microbiology*, 43, 4277–4279. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.8.4277-4279.2005>
- EC (European Commission). (2005). Commission regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs. *Official Journal of the European Union*, L 338, 1–26. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32005R2073&from=EN>
- EC. (2006a). Commission directive 2006/125/EC of 5 December 2006 on processed cereal-based foods and baby foods for infants and young children (Codified version). *Official Journal of the European Union*, L 339, 16–35. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32006L0125&from=EN>.
- EC. (2006b). Commission regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official Journal of the European Union*, L 364, 5–24. <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:364:0005:0024:EN:PDF>
- EC. (2013). Commission recommendation 2013/165/EU of 27 March 2013 on the presence of T-2 and HT-2 toxin in cereals and cereal products. *Official Journal of the European Union*, L 91, 12–15. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32013H0165&from=EN>
- EFSA (European Food Safety Authority). (2011). Scientific opinion on the risks for animal and public health related to the presence of *Alternaria* toxins in feed and food. *EFSA Journal*, 9(10), 2407. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2011.2407>
- EFSA. (2016). Dietary exposure assessment to *Alternaria* toxins in the European population. *EFSA Journal*, 14(12), 4654. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2016.4654>

- EFSA. (2017). Human and animal dietary exposure to T-2 and HT-2 toxin. *EFSA Journal*, 15(8), 4972. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4972>
- EFSA. (2019). Appropriate age range for introduction of complementary feeding into an infant's diet. *EFSA Journal*, 17(9), 5780. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5780>
- Esgin, S., Märtlbauer, E., & Terplan, G. (1989). Entwicklung und Anwendung eines enzymimmunologischen Verfahrens zum Nachweis von T-2 Toxin in Milch. *Archiv Für Lebensmittelhygiene*, 40, 109–112.
- Estuningsih, S., Kress, C., Hassan, A. A., Akineden, Ö., Schneider, E., & Usleber, E. (2006). *Enterobacteriaceae* in dehydrated powdered infant formula manufactured in Indonesia and Malaysia. *Journal of Food Protection*, 69(12), 3013–3017. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-69.12.3013>
- EU (European Union). (2013). Regulation (EU) No 609/2013 of the European parliament and of the council of 12 June 2013 on food intended for infants and young children, food for special medical purposes, and total diet replacement for weight control and repealing council directive 92/52/EEC, commission directives 96/8/EC, 1999/21/EC, 2006/125/EC and 2006/141/EC, directive 2009/39/EC of the European parliament and of the council and commission regulations (EC) No 41/2009 and (EC) No 953/2009. *Official Journal of the European Union*, L 181, 35–56. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32013R0609&from=EN>
- Friedemann, M. (2007). *Enterobacter sakazakii* in food and beverages (other than infant formula and milk powder). *International Journal of Food Microbiology*, 116(1), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.12.018>
- Gotthardt, M., Asam, S., Gunkel, K., Moghaddam, A. F., Baumann, E., Kietz, R., & Rychlik, M. (2019). Quantitation of six *Alternaria* toxins in infant foods applying stable isotope labeled standards. *Frontiers in Microbiology*, 10, 109. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00109>
- Gottschalk, C., Barthel, J., Engelhardt, G., Bauer, J., & Meyer, K. (2009). Simultaneous determination of type A, B and D trichothecenes and their occurrence in cereals and cereal products. *Food Additives & Contaminants*, 26, 1273–1289. <https://doi.org/10.1080/02652030903013260>
- Gross, M., Curtui, V., & Usleber, E. (2018). Detection of total ergot alkaloids in cereal flour and in bread by a generic enzyme immunoassay method. *Journal of AOAC International*, 101, 618–626. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.17-0346>
- Herrera, M., Bervis, N., Carramiñana, J. J., Juan, T., Herrera, A., Ariño, A., & Lorán, S. (2019). Occurrence and exposure assessment of aflatoxins and deoxynivalenol in cereal-based baby foods for infants. *Toxins*, 11, 150. <https://doi.org/10.3390/toxins11030150>
- ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods). (2011). *Microorganisms in foods 8: Use of data for assessing process control and product acceptance* (1st ed). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9374-8_15
- Juan, C., Raiol, A., Mañes, J., & Ritieni, A. (2014). Presence of mycotoxin in commercial infant formulas and baby foods from Italian market. *Food Control*, 39, 227–236. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.10.036>
- Karlovsky, P., Suman, M., Berthiller, F., De Meester, J., Eisenbrand, G., Perrin, I., Oswald, I. P., Speijers, G., Chiodini, A., Recker, T., & Dussort, P. (2016). Impact of food processing and detoxification treatments on mycotoxin contamination. *Mycotoxin Research*, 32, 179–205. <https://doi.org/10.1007/s12550-016-0257-7>
- Kim, S. A., Oh, S. W., Lee, Y. M., Imm, J. Y., Hwang, I. G., Kang, D. H., & Rhee, M. S. (2011). Microbial contamination of food products consumed by infants and babies in Korea. *Letters in Applied Microbiology*, 53, 532–538. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2011.03142.x>
- Kirinčič, S., Škrjanc, B., Kos, N., Kozolc, B., Pirnat, N., & Tavčar-Kalcher, G. (2015). Mycotoxins in cereals and cereal products in Slovenia-Official control of foods in the years 2008–2012. *Food Control*, 50, 157–165. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.08.034>
- Kuhnert, P., Capaul, S. E., Nicolet, J., & Frey, J. (1996). Phylogenetic positions of *Clostridium chauvoei* and *Clostridium septicum* based on 16S rRNA gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 46(4), 1174–1176. <https://doi.org/10.1099/00207713-46-4-1174>
- Liesener, K., Curtui, V., Dietrich, R., Märtlbauer, E., & Usleber, E. (2010). Mycotoxins in horse feed. *Mycotoxin Research*, 26, 23–30. <https://doi.org/10.1007/s12550-009-0037-8>
- Lombaert, G. A., Pellaers, P., Roscoe, V., Mankotia, M., Neil, R., & Scott, P. M. (2003). Mycotoxins in infant cereal foods from the Canadian retail market. *Food Additives & Contaminants*, 20(5), 494–504. <http://doi.org/10.1080/0265203031000094645>
- Los, A., Ziuzine, D., & Bourke, P. (2018). Current and future technologies for microbiological decontamination of cereal grains. *Journal of Food Science*, 83(6), 1484–149. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14181>
- Lou, X., Yu, H., Wang, X., Qi, J., Zhang, W., Wang, H., Si, G., Song, S., Huang, C., Liu, T., Zheng, W., & Fang, Z. (2019). Potential reservoirs and routes of *Cronobacter* transmission during cereal growing, processing and consumption. *Food Microbiology*, 79, 90–95. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.12.004>
- Mallmann, C. A., Tyska, D., Almeida, C. A. A., Oliveira, M. S., & Gressler, L. T. (2020). Mycotoxicological monitoring of breakfast and infant cereals marketed in Brazil. *International Journal of Food Microbiology*, 331, 108628. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108628>
- Miller, R. A., Beno, S. M., Kent, D. J., Carroll, L. M., Martin, N. H., Boor, K. J., & Kovac, J. (2016). *Bacillus wiedmannii* sp. nov., a psychrotolerant and cytotoxic *Bacillus cereus* group species isolated from dairy foods and dairy environments. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66, 4744–4753. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001421>
- Mulder, P. P. J., Pereboom-de Fauw, D. P. K. H., Hoogenboom, R. L. A. P., de Stoppelaar, J., & de Nijs, M. (2015). Tropane and ergot alkaloids in grain-based products for infants and young children in the Netherlands in 2011–2014. *Food Additives & Contaminants: Part B*, 8(4), 284–290. <https://doi.org/10.1080/19393210.2015.1089947>
- Muytjens, H. L., Roelofs-Willemsse, H., & Jaspar, G. H. J. (1988). Quality of powdered substitutes for breast milk with regard to members of the family *Enterobacteriaceae*. *Journal of Clinical Microbiology*, 26(4), 743–746. <https://doi.org/10.1128/JCM.26.4.743-746.1988>
- Oueslati, S., Berrada, H., Mañes, J., & Juan, C. (2018). Presence of mycotoxins in Tunisian infant foods samples and subsequent risk assessment. *Food Control*, 84, 362–369. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.08.021>

- Pereira, V. L., Fernandes, J. O., & Cunha, S. C. (2015). Comparative assessment of three cleanup procedures after QuEChERS extraction for determination of trichothecenes (type A and type B) in processed cereal-based baby foods by GC-MS. *Food Chemistry*, *182*, 143–149. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.01.047>
- Pham, P. (2021). Baby food report 2021. Statista consumer market outlook. <https://www.statista.com/study/48837/baby-food-report/>
- Rajilić-Stojanović, M., & de Vos, W. M. (2014). The first 1000 cultured species of the human gastrointestinal microbiota. *FEMS Microbiology Reviews*, *38*(5), 996–1047. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12075>
- Reinhard, H., Rupp, H., & Zoller, O. (2008). Ergot alkaloids: Quantitation and recognition challenges. *Mycotoxin Research*, *24*, 7–13. <https://doi.org/10.1007/bf02985264>
- Sadek, Z. I., Abdel-Rahman, M. A., Azab, M. S., Darwesh, O. M., & Hassan, M. S. (2018). Microbiological evaluation of infant foods quality and molecular detection of *Bacillus cereus* toxins relating genes. *Toxicology Reports*, *5*, 871–877. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2018.08.013>
- Scott, P. M., Zhao, W., Feng, S., & Lau, B. P. (2012). *Alternaria* toxins alternariol and alternariol monomethyl ether in grain foods in Canada. *Mycotoxin Research*, *28*, 261–6. <https://doi.org/10.1007/s12550-012-0141-z>
- Seidler, C. (2007). *Nachweis der Fusarientoxine Deoxynivalenol und Zearalenon in Lebensmitteln* (Doctoral thesis). VVB Lauferweiler Verlag, Giessen. <http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2007/4728/pdf/SeidlerCaroline-2007-04-25.pdf>
- Silva, J. N., Vasconcellos, L., Forsythe, S. J., de Filippis, I., & Brandão, M. L. L. (2019). Molecular and phenotypical characterization of *Cronobacter* species isolated with high occurrence from oats and linseeds. *FEMS Microbiology Letters*, *366*(1), fny289. <https://doi.org/10.1093/femsle/fny289>
- Taylor, M. G., Amerson-Brown, M. H., Hulten, K., Cameron, L. H., Holzmann-Pazgal, G., Edwards, M. S., & Foster, C. E. (2021). Two cases of *Cronobacter sakazakii* meningitis in infants. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, *40*(9). <https://doi.org/10.1097/inf.0000000000003184>
- Usleber, E., Märklbauer, E., Dietrich, R., & Terplan, G. (1991). Direct enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of the 8-ketotrichothecene mycotoxins deoxynivalenol, 3-acetyldeoxynivalenol, and 15-acetyldeoxynivalenol in buffer solutions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *39*, 2091–2095. <https://doi.org/10.1021/jf00011a041>
- Usleber, E., Renz, V., Märklbauer, E., & Terplan, G. (1992). Studies on the application of enzyme immunoassays of the *Fusarium* mycotoxins deoxynivalenol, 3-acetyldeoxynivalenol, and zearalenone. *Journal of Veterinary Medicine Series B*, *39*, 617–627. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.1992.tb01213.x>
- Zhang, K., Flannery, B. M., Oles, C. J., & Adeuya, A. (2018). Mycotoxins in infant/toddler foods and breakfast cereals in the U.S. retail market. *Food Additives & Contaminants: Part B*, *11*, 183–190. <https://doi.org/10.1080/19393210.2018.1451397>
- Ziver, T., Okburan, G., Akgül, Ö., Sarıbaş, S., & Kocazeybek, B. (2020). Investigation of *Cronobacter sakazakii* (*Enterobacter sakazakii*) presence in cereal infant foods. *Progress in Nutrition*, *22*, 596–602. <https://doi.org/10.23751/pn.v22i2.8907>

How to cite this article: Rehagel, C., Akineden, Ö., & Usleber, E. (2022). Microbiological and mycotoxicological analyses of processed cereal-based complementary foods for infants and young children from the German market. *Journal of Food Science*, 1–13. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.16106>

4. Estuningsih, S.; Kress, C., Hassan, A.A.; Akineden, Ö., Schneider, E., Usleber, E., 2006.

Enterobacteriaceae in dehydrated powdered infant formula manufactured in Indonesia and Malaysia.

Journal of Food Protection, 69:3013-3017.

Doi: 10.4315/0362-028X-69.12.3013.

5. Akineden, Ö., Wittwer, T., Geister, K., Plötz, M., Usleber, E., 2020.

Nucleic acid lateral flow immunoassay (NALFIA) with integrated DNA probe degradation for the rapid detection of *Cronobacter sakazakii* and *Cronobacter malonaticus* in powdered infant formula.

Food Control, 109:106952.

Doi: 10.1016/j.foodcont.2019.106952.

6. Hassan, A.A., Akineden, Ö., Kress, C., Estuningsih, S., Schneider, E., Usleber, E., 2007.

Characterization of the gene encoding the 16S rRNA of *Enterobacter sakazakii* and development of a species-specific PCR method.

International Journal of Food Microbiology, 116:214-220.

Doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2006.12.011.

Danksagung

Ich möchte allen von Herzen danken, die mich auf meinem bisherigen Weg begleitet und unterstützt haben, sei es durch fachlichen Austausch, praktische Hilfe oder aufmunternde Worte. Sie alle haben auf ihre Weise zum Gelingen dieser Habilitationsschrift beigetragen.

Mein ganz besonderer Dank gilt Prof. Dr. Dr. habil. Ewald Usleber, der mich über viele Jahre hinweg begleitet hat. Auch als mein Doktorvater hat er mir früh den Zugang zur wissenschaftlichen Arbeit im Bereich der Lebensmittelhygiene eröffnet. Mit seinem Vertrauen und seiner Unterstützung hat er nicht nur mein wissenschaftliches Interesse nachhaltig geprägt, sondern auch ein inspirierendes Arbeitsumfeld geschaffen, in dem Eigeninitiative und Kreativität möglich waren. Ohne ihn wäre diese Arbeit nicht denkbar gewesen.

Den Autorinnen und Autoren der hier zusammengestellten Originalarbeiten danke ich für die konstruktive und freundliche Zusammenarbeit.

Zudem danke ich dem gesamten Team der Professur für Milchwissenschaften für die durchgängig gute, freundliche und stets kollegiale Zusammenarbeit sowie für die wertvollen Beiträge zu unseren gemeinsamen Publikationen. In diesem Zusammenhang gilt mein besonderer Dank Frau Dr. Schneider, die mich in der Anfangsphase meiner wissenschaftlichen Tätigkeit tatkräftig unterstützt und unsere gemeinsamen Publikationen begleitet hat.

Ebenso gilt mein besonderer Dank auch meiner Lebenspartnerin und künftigen Ehefrau Dr. Christina Rehagel, die mir in allen Phasen dieser Arbeit zur Seite stand – mit ihrer fachlichen Kompetenz ebenso wie mit Geduld, Verständnis und Unterstützung im Alltag. Ebenso gilt mein Dank Herrn Dr. Hans-Jörg Rehagel, der mich mit seinem Korrekturlesen sowie mit seinem unermüdlichen Interesse und seiner Freude an meiner Schrift stets angespornt hat.