



**ENTEROBACTER SAKAZAKII - RISIKOPROFIL  
UND UNTERSUCHUNGEN ZUM NACHWEIS  
IN SÄUGLINGSNAHRUNGEN**

**SUHAD SANJAQ**

**INAUGURAL-DISSERTATION**  
zur Erlangung des Doktorgrades  
am Fachbereich Agrarwissenschaften,  
Ökotrophologie und Umweltmanagement  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

---

**édition scientifique**  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2008

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2008

© 2008 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**  
édition scientifique

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

Aus dem Institut für Angewandte Mikrobiologie  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

***Enterobacter sakazakii* - Risikoprofil und  
Untersuchungen zum Nachweis in  
Säuglingsnahrungen**

**Inaugural-Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades  
am Fachbereich Agrarwissenschaften,  
Ökotoxikologie und Umweltmanagement  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

**SUHAD SANJAQ**

Dipl. oec. troph. aus Essen

Gießen 2007

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches  
Agrarwissenschaften, Ökotrophologie und Umweltmanagement  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Erster Gutachter: Prof. Dr. Sylvia Schnell

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Walther Heeschen

Dritter Gutachter: Prof. Dr. Clemens Kunz

Tag der mündlichen Prüfung: 14. 01.2008

الى والديّ والى زوجي

*Meinen Eltern  
Meinem Ehemann*

---

	INHALTSVERZEICHNIS .....	I
	TABELLENVERZEICHNIS .....	VI
	ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....	VIII
	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	XI
<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>RISIKOPROFIL VON <i>ENTEROBACTER SAKAZAKII</i></b> <b>(LITERATURÜBERSICHT) .....</b>	<b>2</b>
<b>2.1</b>	<b>Grundsätze eines Risikoprofils .....</b>	<b>2</b>
<b>2.2</b>	<b>Gegenstand des Risikoprofils .....</b>	<b>6</b>
2.2.1	Taxonomische Einordnung von <i>Enterobacter sakazakii</i> .....	6
2.2.2	Morphologie und physiologische Eigenschaften .....	7
2.2.3	Biochemische Differenzierung .....	9
<b>2.3</b>	<b>Gefahrenanalyse .....</b>	<b>10</b>
2.3.1	Vorkommen und Bedeutung von <i>Enterobacter sakazakii</i> .....	10
2.3.2	Pathogenität, Virulenz und klinisches Krankheitsbild .....	11
2.3.3	Risikobewertung .....	14
<b>2.4</b>	<b>Risikomanagement und Qualitätskontrollmaßnahmen .....</b>	<b>19</b>
2.4.1	Mikrobiologische Anforderungen an Säuglingsnahrung mit Angaben zu nationalen Aktivitäten, EU-Recht und internationalen Normen .....	19
2.4.2	Identifizierung und Charakterisierung von <i>Enterobacter sakazakii</i> .....	21
2.4.2.1	Konventioneller mikrobiologischer Nachweis .....	21
2.4.2.2	Differenzierung auf selektiven Nährmedien .....	22
2.4.2.3	Biotypisierung .....	23
2.4.2.4	Molekularbiologische Typisierungs- und Nachweisverfahren .....	24
2.4.2.4.1	Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	25
2.4.2.4.2	Pulsfeld Gelelektrophorese (PFGE) .....	28
2.4.2.4.3	Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) .....	28
2.4.2.4.4	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung (FISH) .....	29
2.4.2.5	Biofilmbildung .....	30

<b>3</b>	<b>EIGENE UNTERSUCHUNGEN.....</b>	<b>32</b>
<b>3.1</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>32</b>
3.1.1	Bakterienstämme.....	32
3.1.2	Nährmedien.....	33
3.1.2.1	Nährbouillon/-agar.....	33
3.1.2.2	Reagenzien und Medien.....	35
3.1.3	Bakterienmorphologie und biochemische Nachweisreaktionen.....	36
3.1.3.1	Morphologie und Pigmentbildung.....	36
3.1.3.2	Bestätigungsreaktionen.....	36
3.1.3.3	Biochemische Nachweisreaktionen.....	37
3.1.3.3.1	Alpha( $\alpha$ )-Glucosidase Aktivität.....	37
3.1.3.3.2	Tween <sup>TM</sup> 80-Esterase Aktivität.....	37
3.1.3.3.3	Verwertung verschiedener Kohlenstoffquellen.....	37
3.1.3.3.4	Enzymaktivitäten.....	38
3.1.3.4	Identifizierungssysteme.....	38
3.1.4	Konventionelle Identifizierung.....	38
3.1.4.1	Klassisch mikrobiologischer Nachweis.....	39
3.1.4.2	Most Propable Number (MPN).....	40
3.1.4.3	Nachweis in 1500 g nach dem FOSTER-Stichprobenplan.....	41
3.1.4.4	Nachweis mit Zusatz von Ferrioxamin E.....	42
3.1.4.5	Nachweis mit chromogenen und fluoreszierenden Nährmedien.....	42
3.1.5	Nachweis von Antibiotikaempfindlichkeiten.....	42
3.1.6	Trockenresistenzen.....	43
3.1.7	Wachstumskinetik.....	44
3.1.8	Hitzeresistenzen.....	44
3.1.9	Resistenz gegen osmotische Beanspruchung.....	44
3.1.10	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung (FISH).....	45
3.1.11	Impedanzmessverfahren BacTrac 4100.....	46
3.1.12	Molekularbiologische Identifizierung mittels Polymerasekettenreaktion.....	46
3.1.12.1	Nachweis von <i>Enterobacter sakazakii</i> - spezifischen Genabschnitten mittels PCR.....	46
3.1.12.2	Präparation der bakteriellen DNA.....	46
3.1.12.3	Amplifizierung eines speziesspezifischen Abschnitts des 16S rRNA-Gens und des <i>macro molecular synthesis</i> Gens.....	47
3.1.13	BAX <sup>®</sup> -PCR.....	48
3.1.14	Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD).....	48

3.1.14.1	Präparation der bakteriellen DNA .....	48
3.1.14.2	Durchführung der Polymerasekettenreaktion mit Primer M13 Core/T3B.....	49
3.1.14.3	Agarosegelelektrophorese .....	50
3.1.14.4	Ethidiumbromidfärbung.....	50
3.1.15	Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) .....	51
3.1.15.1	Präparation der bakteriellen DNA .....	51
3.1.15.2	Restriktion der Gesamtzell-DNA .....	52
3.1.15.3	Durchführung der PFGE .....	52
3.1.16	<i>Realtime</i> PCR (qPCR) .....	53
3.1.17	16S rDNA – Sequenzierung .....	55
3.1.18	Nachweis zur Biofilmbildung.....	55
3.1.18.1	Aggregat und Pellikelbildung .....	55
3.1.18.2	Kongorot- und Calcoflour-Bindung .....	55
3.1.18.3	Bakterielle Adhärenz an abiotische Oberflächen.....	55
3.1.19	Kalkulation und Auswertung der Ergebnisse .....	56
<b>3.2</b>	<b>Nachweis und Identifizierung .....</b>	<b>58</b>
3.2.1	Phänotypische Eigenschaften .....	58
3.2.1.1	Morphologie und biochemisches Leistungsspektrum .....	58
3.2.2	Genotypische Charakterisierung .....	66
3.2.2.1	Amplifizierung eines speziesspezifischen Abschnitts des 16S rRNA-Gens .....	66
3.2.2.2	Nachweis <i>Enterobacter sakazakii</i> - spezifischer Genabschnitte.....	67
3.2.2.3	Typisierung von <i>Enterobacter sakazakii</i> mittels PFGE und RAPD-Ergebnisse des „DNA- Fingerprinting“ .....	73
3.2.2.4	Diskriminierungsstärke verschiedener Typisierungsmethoden .....	80
3.2.3	Methodenvergleich .....	81
3.2.3.1	Vergleich der gängigen klassischen Nachweisverfahren .....	81
3.2.3.2	Vergleich zu alternativen Verfahren.....	84
<b>3.3</b>	<b>Verhalten von <i>Enterobacter sakazakii</i> im Produktionsumfeld und praxis- bezogene Aspekte des Nachweises .....</b>	<b>90</b>
3.3.1	Wachstumskinetik.....	90
3.3.2	Thermophiles Wachstum .....	93
3.3.3	Trockenresistenz .....	94
3.3.4	Resistenz gegen osmotische Beanspruchung.....	95

3.3.5	Expression von Biofilmkomponenten bei ausgewählten <i>Enterobacter sakazakii</i> -Stämmen .....	96
3.3.6	Untersuchung gängiger Nachweismethoden auf ihre Eignung zur Detektion gestresster Bakterien.....	100
3.3.7	Untersuchung kritischer Rohstoffe.....	101
3.3.7.1	Identifizierung kritischer Rohstoffe und ihrer Kontaminationshäufigkeit .....	101
3.3.8	Bestimmung der Kontaminationsrate von <i>Enterobacteriaceae</i> im Verhältnis zu <i>Enterobacter sakazakii</i> .....	102
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>106</b>
<b>4.1</b>	<b>Phänotypische Eigenschaften.....</b>	<b>106</b>
<b>4.2</b>	<b>Genotypische Eigenschaften .....</b>	<b>110</b>
<b>4.3</b>	<b>Vergleich klassischer mikrobiologischer Methoden mit alternativen Verfahren zum Nachweis von <i>Enterobacter sakazakii</i>.....</b>	<b>115</b>
4.3.1	Nachweis von <i>Enterobacter sakazakii</i> in Poolproben nach dem Foster-Stichprobenplan .....	116
4.3.2	Ferrioxamin-abhängiger Nachweis .....	118
4.3.3	Nachweis von <i>Enterobacter sakazakii</i> mit biochemischen Identifizierungssystemen .....	119
4.3.4	Nachweis von <i>Enterobacter sakazakii</i> mittels FISH-Technologie.....	120
<b>4.4</b>	<b>Spezielle Eigenschaften.....</b>	<b>120</b>
<b>4.5</b>	<b><i>Enterobacter sakazakii</i> im Umfeld .....</b>	<b>124</b>
<b>4.6</b>	<b><i>Enterobacteriaceae</i> und <i>Enterobacter sakazakii</i> als Marker mikrobiologischer Qualität von Säuglingsnahrung .....</b>	<b>126</b>
<b>4.7</b>	<b>Risikoanalyse von <i>Enterobacter sakazakii</i> in Säuglingsnahrung.....</b>	<b>127</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>136</b>
<b>6</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>139</b>

---

<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>142</b>
<b>8</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>165</b>

## Tabellenverzeichnis

<b>Tab. 1:</b>	Elemente eines Risikoprofils bezogen auf <i>Enterobacter sakazakii</i> .....	3
<b>Tab. 2:</b>	Biochemische Differenzierung von <i>Enterobacter sakazakii</i> und verwandten Arten (FARMER <i>et al.</i> , 1980 , HOLT <i>et al.</i> , 1994) .....	10
<b>Tab. 3:</b>	<i>E. sakazakii</i> - Infektionen und Ausbrüche bei Säuglingen assoziiert mit Säuglingsnahrung.....	13
<b>Tab. 4:</b>	Richtlinien zur Präparation und zum Umgang mit Säuglingsnahrung.....	16
<b>Tab. 5:</b>	Mikrobiologische Spezifikation für Säuglingsmilchpulvernahrung (CODEX, 2005).....	21
<b>Tab. 6:</b>	Einteilung der Biotypen nach biochemischen Eigenschaften (FARMER <i>et al.</i> ,1980) .....	24
<b>Tab. 7:</b>	Übersicht über Oligonukleotidprimerpaare zur Amplifikation der 16S rRNA von <i>E. sakazakii</i> .....	26
<b>Tab. 8:</b>	Übersicht über Oligonukleotidprimerpaare zur Amplifikation des MMS-Gen- Abschnitts <i>dnaG</i> -Gen von <i>E. sakazakii</i> .....	27
<b>Tab. 9:</b>	Übersicht über die Referenzstämme aus verschiedenen Stammsammlungen ...	32
<b>Tab. 10:</b>	Kennzeichen von <i>E. sakazakii</i> auf verschiedenen Nährmedien .....	37
<b>Tab. 11:</b>	Übersicht über Oligonukleotidprimerpaare zur Amplifikation der 16S rRNA- bzw. MMS-Gen-Abschnitte von <i>E. sakazakii</i> .....	47
<b>Tab. 12:</b>	Primer und Taqman Probe für die Amplifikation des MMS-Gen-Abschnittes <i>dnaG</i> -Gen von <i>E. sakazakii</i> .....	54
<b>Tab. 13:</b>	Ausprägung der Gelbpigmentierung verschiedener <i>E. sakazakii</i> -Stämme bei 30°C.....	58
<b>Tab. 14:</b>	Anzahl der gelb pigmentierten Isolate, die durch verschiedene mikrobiologische Methoden tatsächlich als <i>E.sakazakii</i> identifiziert wurden .....	59
<b>Tab. 15:</b>	Sensitivität und Spezifität der chromogenen und fluoreszierenden Nährmedien .....	60
<b>Tab. 16:</b>	Biochemische Eigenschaften von 188 <i>E. sakazakii</i> -Isolaten und dem Referenzstamm .....	62
<b>Tab. 17:</b>	Biochemische Differenzen der 37 Biotypen, ermittelt durch die 188 untersuchten <i>E. sakazakii</i> -Isolate mit dem API32E .....	63
<b>Tab. 18:</b>	Enzymaktivität ausgewählter <i>Enterobacter sakazakii</i> - Isolate im Vergleich mit <i>Enterobacter cloacae</i> und <i>Pantoea agglomerans</i> .....	64
<b>Tab. 19:</b>	Nachweis der Antibiotikaempfindlichkeit von <i>Enterobacter sakazakii</i> – Isolaten (n= 67).....	65

<b>Tab. 20:</b>	Übersicht zur Spezifität und Sensitivität verschiedener PCR-Systeme im Vergleich.....	70
<b>Tab. 21:</b>	Vergleich verschiedener PCR-Methoden zum Nachweis von <i>Enterobacter sakazakii</i> .....	71
<b>Tab. 22:</b>	Übersicht der untersuchte Bakterienstämme in der <i>Realtime</i> PCR.....	72
<b>Tab. 23:</b>	Ergebnisübersicht des RAPD-Fingerprinting und der PFGE. Übereinstimmende Clusterbildung im Vergleich der Primer M13 Core und T3B mit der PFGE .....	75
<b>Tab. 24:</b>	Verteilung der PFGE-Restriktionsmuster von <i>E. sakazakii</i> -Isolate nach Verdau mit dem Restriktionsenzym <i>Xba</i> I und RAPD-Bandenmuster unter Verwendung der Primer M13 Core und T3b im Vergleich zum Biotyp .....	76
<b>Tab. 25:</b>	Diskriminierungsindex phänotypischer und genotypischer Methoden.....	80
<b>Tab. 26:</b>	Ergebnisübersicht für den Nachweis des Stammes 135 mit verschiedenen Identifizierungssystemen und Bestätigungsreaktionen.....	85
<b>Tab. 27:</b>	Identifizierung von <i>E. sakazakii</i> (n=19) mittels biochemischer Identifizierungssysteme .....	89
<b>Tab. 28:</b>	Wachstum ausgewählter <i>E. sakazakii</i> -Stämme bei Temperaturen von 30-55°C	93
<b>Tab. 29:</b>	Biochemisches Spektrum der untersuchten Stämme nach Trockenstress.....	95
<b>Tab. 30:</b>	Phänotyp verschiedener <i>E. sakazakii</i> -Isolate unterschiedlicher Herkunft .....	98
<b>Tab. 31:</b>	Umfeldmonitoring - Übersicht zu den <i>E. sakazakii</i> positiven im Produktionsumfeld .....	100
<b>Tab. 32:</b>	Übersicht der kontaminierten Rohstoffe .....	101
<b>Tab. 33:</b>	Kontaminationen von Säuglingsanfangsnahrung mit <i>Enterobacteriaceae</i> und <i>E. sakazakii</i> in Betrieb 1 und Betrieb 2 .....	102
<b>Tab. 34:</b>	Verhältnis von <i>Enterobacteriaceae</i> zu <i>E. sakazakii</i> .....	103
<b>Tab. 35:</b>	Untersuchungsergebnisse für <i>Enterobacteriaceae</i> und <i>E. sakazakii</i> in Säuglingsanfangsnahrung von Betrieb 1 .....	103
<b>Tab. 36:</b>	Untersuchungsergebnisse für <i>Enterobacteriaceae</i> und <i>E. sakazakii</i> in Säuglingsanfangsnahrung von Betrieb 2.....	103
<b>Tab. 37:</b>	Vergleich der Identifizierungsergebnisse mittels API 32E im Vergleich zu der isolierenden klassisch mikrobiologischen <i>Enterobacteriaceae</i> - und der <i>E. sakazakii</i> -Methode .....	105
<b>Tab. 38:</b>	Kriterien zur Beurteilung von PFGE-Bandenmuster nach TENOVER <i>et al.</i> 1995.....	113
<b>Tab. 39:</b>	MPN-Tabelle für Verdünnungsreihen mit dreifachem Ansatz.....	165
<b>Tab. 40:</b>	Ergebnisübersicht zu den untersuchten Isolaten.....	166

**Abbildungsverzeichnis**

<b>Abb. 1:</b>	<i>Enterobacter sakazakii</i> – Gramnegative Stäbchen.....	6
<b>Abb. 2:</b>	Risikofaktoren in rekonstituierter Säuglingsnahrung durch <i>E. sakazakii</i> .....	17
<b>Abb. 3:</b>	Schematische Darstellung der ribosomalen RNA mit ungefährender Position der Gene, welche die 16S, 23S, und 5S rRNA codieren (oben), sowie eine beispielhafte Darstellung eines bakteriellen Genoms mit 6 verteilten ribosomalen RNA-Operons (unten) (nach JORDAN, 1998).....	25
<b>Abb. 4:</b>	Schematische Darstellung des <i>rpsU-dnaG-rpoD</i> MMS Operon (nach VERSALOVIC <i>et al.</i> , 1993).....	27
<b>Abb. 5:</b>	Klassisch mikrobiologische Methoden zum Nachweis von <i>Enterobacter sakazakii</i> in Säuglingsnahrung .....	39
<b>Abb. 6:</b>	Schematisches Diagramm für den Nachweis von <i>E. sakazakii</i> und Enterobakterien mit dem MPN- Verfahren.....	40
<b>Abb. 7:</b>	Schematisches Diagramm für den Nachweis von <i>E. sakazakii</i> in 1500g nach dem FOSTER-Stichproben-Plan.....	41
<b>Abb. 8:</b>	Fließschema der <i>in situ</i> Hybridisierung mit fluoreszenzmarkierter gegen rRNA gerichteter Oligonukleotid-Sonde.....	45
<b>Abb. 9:</b>	Typisches Wachstum von <i>Enterobacter sakazakii</i> (links, gelbes Pigment) und <i>Enterobacter cloacae</i> (rechts, weißes Pigment) auf Trypton Soya Agar (TSA) .....	59
<b>Abb. 10:</b>	Verwertung von Kohlenstoffquellen und Enzymaktivitäten der untersuchten <i>E. sakazakii</i> -Isolate.....	60
<b>Abb. 11:</b>	Morphologische Differenzierung von <i>E. sakazakii</i> auf chromogenen und fluoreszierenden Nährmedien.....	61
<b>Abb. 12:</b>	Nukleotidsequenz des 16S rRNA-Gens von <i>Enterobacter sakazakii</i> mit 1449 bp DNA .....	66
<b>Abb. 13:</b>	Amplikon eines speziesspezifischen Abschnitts der 16S rRNA von <i>Enterobacter sakazakii</i> mit einer Größe von 1449 Bp unter Verwendung der spezifischen Primer 660V-1 und 630R.....	67
<b>Abb. 14:</b>	Amplikon eines speziesspezifischen Abschnitts der 16S rRNA von <i>Enterobacter sakazakii</i> mit einer Größe von 929 Bp unter Verwendung der spezifischen Primer Esakf und Esakr.....	68
<b>Abb. 15:</b>	Amplikon eines speziesspezifischen Abschnitts der 16S rRNA von <i>Enterobacter sakazakii</i> mit einer Größe von 952 Bp unter Verwendung der spezifischen Primer Saka-1 and Saka-2b nach HASSAN <i>et al.</i> (2005) .....	68

<b>Abb. 16:</b>	Amplikon eines speziespezifischen Abschnitts des MMS-Gens von <i>Enterobacter sakazakii</i> (Spur 2-8) mit einer Größe von 78 Bp unter Verwendung der spezifischen Primer MM1 und MM2 nach SEO und BRACKETT (2005).....	69
<b>Abb. 17:</b>	Amplifizierung eines <i>E. sakazakii</i> -spezifischen Abschnitts der 16S rRNA-Gens unter Verwendung der BAX <sup>®</sup> -PCR mit einer Größe von 100 Bp.....	69
<b>Abb. 18:</b>	Nachweis von <i>Enterobacter sakazakii</i> mit der <i>Realtime</i> PCR .....	72
<b>Abb. 19:</b>	Beispiel verschiedener Restriktionsmuster nach Verdau der genomischen DNA <i>Xba</i> I .....	73
<b>Abb. 20:</b>	RAPD von <i>Enterobacter sakazakii</i> unter Verwendung des universellen Primers M13Core .....	74
<b>Abb. 21:</b>	RAPD von <i>Enterobacter sakazakii</i> unter Verwendung des universellen Primers T3b.....	74
<b>Abb. 22:</b>	Identische Muster von 5 Isolaten (NCC 94, 95, 96, 98, 99) im selben Gel.....	77
<b>Abb. 23:</b>	Identische Muster von Isolaten in unterschiedlichen Gelen.....	78
<b>Abb. 24:</b>	Dendogrammanalyse ausgewählter <i>E. sakazakii</i> -Isolate mit der Pulse Field Gel Electrophoresis (PFGE) .....	79
<b>Abb. 25:</b>	Beispiel verschiedener Restriktionsmuster nach Verdau der genomischen DNA mit <i>Xba</i> I .....	80
<b>Abb. 26:</b>	Übersicht zur Verteilung der <i>E. sakazakii</i> positiven Ergebnisse auf die angewandten Methoden der Studie.....	81
<b>Abb. 27:</b>	Nachweis von <i>E. sakazakii</i> in einer gespikten Poolprobe vom Umfang von 1500 g (60x25g) nach dem Foster-Stichprobenplan .....	82
<b>Abb. 28:</b>	Nachweis von <i>E. sakazakii</i> in natürlich und künstlich kontaminierter Säuglingsmilchnahrung durch Zusatz von Ferrioxamin E in gepuffertem Peptonwasser bei 37°C nach 24h.....	83
<b>Abb. 29:</b>	Spezifität des API 32E im Vergleich zum BAX-PCR-System .....	84
<b>Abb. 30:</b>	Vergleichende Sequenzanalyse des Stammes 135_CLF .....	86
<b>Abb. 31:</b>	Spezifität des VIT- <i>E. sakazakii</i> in % .....	87
<b>Abb. 32:</b>	Phasenkontrastaufnahme von <i>E. sakazakii</i> nach der Analyse mit VIT- <i>Enterobacter sakazakii</i> .....	88
<b>Abb. 33:</b>	Wachstum verschiedener <i>E. sakazakii</i> -Stämme und <i>E. cloacae</i> in Trypton Soya Broth bei 4°C in einem Zeitraum von 96 Stunden .....	90
<b>Abb. 34:</b>	Wachstum verschiedener <i>E. sakazakii</i> -Stämme und <i>E. cloacae</i> in Trypton Soya Broth bei 10°C in einem Zeitraum von 96 Stunden .....	91
<b>Abb. 35:</b>	Wachstum des Referenzstammes <i>E. sakazakii</i> ATCC in Trypton Soya Broth bei 30°C in einem Zeitraum von 72 Stunden .....	91

---

<b>Abb. 36:</b>	Wachstum verschiedener <i>E. sakazakii</i> – Stämme und <i>E. cloacae</i> in Trypton Soya Broth bei 44°C in einem Zeitraum von 96 Stunden .....	92
<b>Abb. 37:</b>	Absterbekinetik von <i>E. sakazakii</i> und <i>Citrobacter</i> in künstlich kontaminiertem Milchpulver ( $\gamma$ -Sterilisiert) nach Trocknung und Lagerung .....	94
<b>Abb. 38:</b>	Keimzahlen der Versuchsstämme bei 37°C nach 24h in Abhängigkeit vom Salzgehalt in Lauryl Sulfat Tryptose Bouillon .....	96
<b>Abb. 39:</b>	Erscheinungsformen des Biofilmphänotyps von <i>E. sakazakii</i> .....	97
<b>Abb. 40:</b>	Charakteristisches Erscheinungsbild von <i>E. sakazakii</i> auf Congored-Agarplatten .....	99
<b>Abb. 41:</b>	Kontaminationsrate ausgewählter kritischer Rohstoffe (in %) .....	102
<b>Abb. 42:</b>	Anteil der mit dem biochemischen Identifizierungssystem API 32E identifizierten Enterobacteriaceaspezies in Betrieb 1 und Betrieb 2.....	104
<b>Abb. 43:</b>	Zusammenhang der Komponenten einer Risikoanalyse (FAO/WHO, 1995).....	128

**Abkürzungsverzeichnis**

% (v/v)	Volumenprozent pro Volumen
% (w/v)	Gewichtsprozent pro Volumen
$\alpha$	alpha
C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
acc.	According
ATTC	American Type Culture Collection
$a_w$	Activity of water
BHI	Brain Heart Infusion
Bp	Basenpaar(e)
BPW	Buffered Peptone Water
C	Calcofluor
c	Anzahl der Probeneinheiten, deren Werte über m oder zwischen m und M liegen
CB	Columbia Blutagar
CH	Schweiz
CR	Congored
D	Deutschland
D	Diskriminierungsindex
dest.	Destilliertem
DFI	Druggan-Forsythe-Iversen-Agar
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>deoxyribonucleic acid</i> )
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
<i>E.</i>	<i>Enterobacter</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat, Dinatriumsalz-Dihydrat
EEB	Enterobacteriaceen-Anreicherungsbouillon nach <i>MOSSEL</i>
ESIA	<i>Enterobacter sakazakii</i> Isolation Agar
ESPM	<i>Enterobacter sakazakii</i> Plating Medium
<i>et al.</i>	et alii (und Mitarbeiter)
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
F	Frankreich
FAM	5,6-Carboxyfluoreszein

---

FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
<i>g</i>	Erdbeschleunigung oder Gramm
<i>h</i>	hora (Stunde)
ISO	International Standard Organization
kb	kilo base
KbE	Kolonie bildende Einheiten
l	Liter
LB	Luria-Bertani Agar
LMG	Laboratorium für Mikrobiologie, Universität Gent
LST	Lauryl Sulfate Tryptose Broth
<i>m</i>	Schwellenwert, Grenzwert für zufriedenstellende Qualität
min	Minute(n)
mLST	modified Lauryl Sulfate Tryptose Broth
MMS	<i>Macro Molecular Synthesis</i> (-Operon)
MRM	Mikrobiologisches Risiko Management
MW	Mittelwert
<i>n</i>	Anzahl der untersuchten Proben /Isolate
NCC	Numico Culture Collection
OD	optische Dichte
PCA	Plate Count Agar
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
PFGE	Pulse Field Gel Electrophoresis
PSS	Peptone Salt Solution
qPCR	<i>real-time</i> -PCR
RT	Raumtemperatur
<i>s</i>	Sekunde(n)
<i>s. o.</i>	siehe oben
SC	Simmons Citrat Agar
SD	Standardabweichung(en) ( <i>standard deviation(s)</i> )
<i>sp.</i>	Species (Singular)
<i>spp.</i>	Species (Plural)
TAMRA	Tetramethyl-6-carboxyrhodamin
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tris-HCl	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid
TSA	Trypton Soya Agar
TSB	Trypton Soya Bouillon

---

U	Aktivitätseinheit für Enzyme ( <i>unit(s)</i> )
UK	England
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
UV	Ultraviolett
v	Volumen
V	Volt
VIT	Vermicon Identification Technology
VRBG	Violet Red Bile Glucose Agar
VRBL	Violet Red Bile Lactose Agar
x g	multipliziert mit der Erdbeschleunigung (9,81 m/s <sup>2</sup> )
α-MUG	4-methylumbelliferyl-alpha-D-gluconid
λ	Wellenlänge

## 1 EINLEITUNG

Lebensmittelinfektionen, die durch pathogene Bakterien der Familie *Enterobacteriaceae* hervorgerufen werden, sind durch oft schwer verlaufende Krankheitsprozesse charakterisiert. *Enterobacter (E.) sakazakii* wird häufig als opportunistischer Krankheitserreger angesprochen. Als Verursacher nosokomialer Infektionen sind speziell im Zusammenhang mit diesem Erreger nekrotisierende Enteritis, Meningitis und Septikämien bei Frühgeborenen und immungeschwächten Säuglingen in Erscheinung getreten. Die Zahl der berichteten Ausbrüche von *E. sakazakii* Infektionen ist gering, aber die Verläufe sind oft dramatisch. Die beobachtete Mortalität liegt bei 40-80%. Besonderen Anlass zur Sorge gibt die Tatsache, dass bei einer Rückverfolgung neben anderen Infektionsquellen in der Umwelt mehrmals Säuglingsnahrung auf Milchpulverbasis als Ursprung identifiziert werden konnte. Das Vorkommen von *E. sakazakii* in Säuglingsmilchpulver ist daher unter dem Gesichtspunkt des vorbeugenden Verbraucherschutzes und der Qualitätssicherung zu betrachten.

Vor diesem Hintergrund sollte im Auftrag, der Central Laboratories Friedrichsdorf GmbH, ein Risikoprofil für die Matrix/Erreger-Kombination von *E. sakazakii* in Säuglingsnahrung auf der Grundlage von Literaturdaten erstellt und vorhandene Datenlücken durch eigene Untersuchungen geschlossen werden. Dabei lag der Fokus der Arbeit auf Elementen des Risikoprofils, die eine Eliminierung oder Minimierung der Gefährdung bereits im Produktionsprozess zum Ziel haben.

Die Untersuchungen umfassten eine Überprüfung der Sensitivität und Spezifität vorhandener klassischer und alternativer Nachweisverfahren zum Nachweis von *E. sakazakii* in Säuglingsnahrungen. Daran schloss sich eine weitergehende phäno- und genotypische Charakterisierung des Erregers an. Dies sollte Aufschluss über mutmaßliche epidemiologische Beziehungen und die mögliche Verbreitung einzelner *E. sakazakii*-Stämme geben. Die im Rahmen dieser Untersuchungen ermittelten Daten und die Erstellung des Risikoprofils für die Kombination „*E. sakazakii*/Milchpulver“ wurden ferner zu einer Risikoeinschätzung von Säuglingsnahrung auf Milchpulverbasis herangezogen.

## 2 RISIKOPROFIL VON *ENTEROBACTER SAKAZAKII* (LITERATURÜBERSICHT)

### 2.1 Grundsätze eines Risikoprofils

Weltweit treten nahrungsmittelbedingte Erkrankungen durch pathogene Mikroorganismen auf. Demzufolge besteht der Bedarf nach einer einheitlichen und wissenschaftlich fundierten Praxis zur Beurteilung der Lebensmittelsicherheit. Voraussetzung dafür ist die Möglichkeit, Risiken messen und vergleichen zu können. Die CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION (2007) definiert das Risiko als „die Wahrscheinlichkeit einer gesundheitlichen Schädigung und daraus resultierende Konsequenzen, die sich aus dem Vorliegen einer Gefahr („Hazard“) im Lebensmittel ergeben“. Das System der Risikoanalyse mit den Komponenten Risikoabschätzung (Risk Assessment), dem Risikomanagement (Risk Management) und der Risikovermittlung (Risk Communication) (Kap. 4.7) wird als das hierzu geeignete Instrument anerkannt und gefordert. Die Risikoabschätzung beschäftigt sich mit dem Messen von Risiko und der Identifizierung von Faktoren, die das Risiko beeinflussen, das Risikomanagement mit der Entwicklung und Anwendung von Strategien, die das betreffende Risiko kontrollieren und die Risikokommunikation mit dem Informationsaustausch über das betreffende Risiko zwischen den interessierten Parteien (MÜHLEMANN *et al.*, 2003).

Ein Risikoprofil ist die Grundlage für die eigentliche Risikoabschätzung. Das Risikoprofil beschreibt das Problem und den Zusammenhang einer Matrix/Erreger-Kombination in der Lebensmittelhygiene. Das Ziel eines Risikoprofils liegt in der Bereitstellung von Hintergrundinformationen, basierend auf dem aktuellen Wissensstand der Literatur. Dieser befähigt die Risikomanager, im Rahmen eines Mikrobiologischen Risikomanagements (MRM) dazu, eine Entscheidung zu treffen und entsprechende Maßnahmen einleiten zu können.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Risikoprofil für die Matrix/Erreger-Kombination *E. sakazakii* in Milchpulver (Säuglingsnahrung) erstellt. Infektionen mit *E. sakazakii* werden häufig durch die Kontamination von Säuglingsmilchpulver verursacht und führen zu Septikämien, nekrotisierenden Enterocolitiden und vor allem zu Meningitis. Hierbei sind stets Neu- und insbesondere Frühgeborene und immungeschwächte Säuglinge betroffen. Für eine vollständige Risikoabschätzung ist die Erstellung eines Risikoprofils erforderlich. Hierbei wurden die von der CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION (2007) vorgegebenen Elemente eines Risikoprofils soweit wie möglich abgehandelt (Tab. 1).

**Tabelle 1:** Elemente eines Risikoprofils bezogen auf *Enterobacter sakazakii*

Elemente des Risikoprofils*	Bezogen auf <i>E. sakazakii</i>	Eigene Untersuchungen
<b>1. Matrix / Erreger-Kombination</b>  a) Gegenstand der Gefährdung  b) Vorkommen in der Lebensmittelkette	Milchpulver / <i>E. sakazakii</i>  <i>E. sakazakii</i>  Untersuchungen zu Endprodukten, Rohstoffen und zum Produktionsumfeld	Literaturübersicht zu Infektionen und Ausbrüchen durch <i>E. sakazakii</i> bei Säuglingen assoziiert mit Säuglingsnahrung (Tab. 3) Kap. 2.3.2  Literaturübersicht zu den Eigenschaften von <i>E. sakazakii</i> Kap. 2.2 Eigene Untersuchungen - Nachweis und Identifizierung Kap. 3.2  Literaturübersicht Kap. 2.3.2 Eigene Untersuchungen - Endprodukte, Rohstoffe, Umfeld Kap. 3.3
<b>2. Beschreibung der Exposition</b>  a) Schlüsseleigenschaften  b) Eigenschaften der Krankheit <ul style="list-style-type: none"> <li>o Bevölkerungsguppe</li> <li>o Prävalenz</li> <li>o Ergebnisse der Exposition</li> </ul>	Virulenzfaktoren, Trockenresistenz etc.  Säuglinge < 28 Tage Seltene Infektionen; Unterschiede zwischen Frühgeborenen und vollausgetragenen Säuglingen Viele Säuglinge exponiert, aber nicht erkrankt; Erkrankungen oft dramatisch; Prädisposition unbekannt	Literaturübersicht - Virulenzeigenschaften Kap. 2.3.2 Eigene Untersuchungen - Trockenresistenz Kap. 3.3.3 Eigene Untersuchungen - Biofilmbildung Kap. 3.3.5  Literaturübersicht – Pathogenität, Virulenz und klinisches Erkrankungsbild Kap. 2.3.2

Elemente des Risikoprofils* (Forts. Tab. 1)	Bezogen auf <i>E. sakazakii</i>	Eigene Untersuchungen
<ul style="list-style-type: none"> <li>o Schwere der klinischen Manifestation</li> <li>o Prozentualer Anteil jährlicher Infektionsfälle durch Lebensmittel</li> </ul>	<p>Meningitis Spätschäden; Mortalität 40-80%</p> <p>Sehr geringe Infektionsfälle durch Säuglingsnahrung</p>	<p>Literaturübersicht - Pathogenität, Virulenz und klinisches Krankungsbild</p> <p>Kap. 2.3.2</p>
<p>c) Epidemiologie</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>o Ätiologie</li> <li>o Eigenschaften des Lebensmittels</li> <li>o Verwendung und Umgang mit dem Lebensmittel</li> <li>o Anzahl und Eigenschaften der sporadischen Infektionsfälle</li> <li>o Epidemiologische Daten</li> </ul>	<p><i>E. sakazakii</i> in Säuglingsnahrung; Bei Neugeborenen</p> <p>Säuglingsmilchpulvernahrung; Mikrobiologische Anforderungen an Säuglingsnahrung</p> <p>Zubereitung, Lagerung, inadäquate Handhabung, Infektionsdosis</p> <p><i>E. sakazakii</i> in Säuglingsnahrung; Hauptsächlich in Krankenhäusern bei Säuglingen &lt; 28 Tage, Prädisposition unbekannt</p>	<p>Literaturübersicht</p> <p>Kap. 2.2</p> <p>Literaturübersicht; Definition Säuglingsnahrung</p> <p>Morphologie und physiologische Eigenschaften</p> <p>Literaturübersicht - Zubereitung und Umgang</p> <p>Wachstumskinetik</p> <p>Biofilmbildung</p> <p>Literaturübersicht</p> <p>Kap. 2.3.1</p> <p>Kap. 2.3.3</p> <p>Kap. 3.3.1</p> <p>Kap. 3.3.5</p> <p>Kap. 2.3.2</p>
<p>d) Regionale und ethnische Unterschiede</p> <p>e) Ökonomischer Einfluss</p>	<p>Unbekannt</p> <p>Intensiv medizinische Betreuung; Lebenslange Folgeschäden durch Meningitis</p>	<p>Keine Untersuchungen</p> <p>Nicht Gegenstand dieser Untersuchungen</p>
<p><b>3. Lebensmittelproduktion, Vertrieb und Konsumierung</b></p> <p>a) Herstellungsprozess</p>	<p>Milchpulverherstellung; Kontamination im Produktionsumfeld; Umgang und Zubereitung</p>	<p>Literaturübersicht - Kontamination im Umfeld</p> <p>Eigene Untersuchungen</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Produktionsumfeld</li> <li>• Rohstoffe</li> <li>• Trockenresistenz</li> <li>• Wachstumskinetik</li> <li>• Biofilm</li> </ul> <p>Literaturübersicht - Umgang und Zubereitung</p> <p>Kap. 2.3.3</p> <p>Kap. 3.3.6</p> <p>Kap. 3.3.7</p> <p>Kap. 3.3.3</p> <p>Kap. 3.3.1</p> <p>Kap. 3.3.5</p> <p>Kap. 2.3.3</p>

Elemente des Risikoprofils* (Forts. Tab. 1)	Bezogen auf <i>E. sakazakii</i>	Eigene Untersuchungen
<p>b) Zusammenfassung der aktuellen Maßnahmen</p> <p>c) Strategien zur Gefahrenkontrolle</p>	<p>Testsysteme und Methoden;</p> <p>Produkt-Testergebnisse; Umfeldproben; Rohstoffe; Informationen für medizinisches Personal</p> <p>Minderung der Kontamination von Säuglingsnahrung; Vermeidung inadäquaten Umgangs</p>	<p>Literaturübersicht- Qualitätskontrollmaßnahmen Eigene Untersuchungen – Nachweis und Identifizierung Kap. 2.4 Kap. 3.2</p> <p>Literaturübersicht – Produkttest/Umfeld/Rohstoffe Eigenen Untersuchungen - Produkttest Umfeld Rohstoffe Kap. 2.3.2 Kap. 3.3.8 Kap. 3.3.6 Kap. 3.3.7</p> <p>Literaturübersicht – Richtlinien zur Präparation und zum Umgang mit Säuglingsnahrung (Tab. 3) Kap. 2.3.3</p> <p>Diskussion der eigenen Ergebnisse Kap. 4</p>
<p><b>4. Weitere Elemente</b></p> <p>a) Umfang des Handels</p> <p>b) Internationales Handelsabkommen</p> <p>c) Öffentliche Wahrnehmung von Problemen und des Risikos</p> <p>d) Reaktionen der Gesundheitsbehörden</p>	<p>} Nicht Gegenstand dieser Arbeit</p> <p>Vermeidung inadäquater Handhabung; Milchpulvernahrung ist nicht steril; Alternative für empfindliche Neu- und Frühgeborene ! sterile Flüssignahrung</p> <p>→ Nicht Gegenstand dieser Arbeit</p>	<p>Diskussion der eigenen Ergebnisse Kap. 4</p>
<p><b>5. Notwendige Elemente der Risikoabschätzung</b></p>	<p>Risikokommunikation, um inadäquaten Umgang zu vermeiden;</p> <p>Güteeziele (Performance Objectives)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Rohstoffqualität</li> <li>• Umfeldtest</li> </ul>	<p>Diskussion der eigenen Ergebnisse Kap. 4</p> <p>Eigene Untersuchungen Diskussion der eigenen Ergebnisse Kap. 3.3 Kap. 4</p>
<p><b>6. Bekannte Datenlücken</b></p>	<p>Minimale Infektionsdosis, Virulenzfaktoren, Prädisposition</p>	<p>Diskussion der eigenen Ergebnisse Kap. 4</p>

\*CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION (2007) (AInorm 07/30/13)

## 2.2 Gegenstand des Risikoprofils

### 2.2.1 Taxonomische Einordnung von *Enterobacter sakazakii*

**En.te.ro.bac`ter.** Griech. Enteron: Eingeweide; M.L. masc. n. bacter äquivalent zu Bakterium, kleines Stäbchen; M.L. masc. n. *Enterobacter* Eingeweide kleines Stäbchen

**sa.ka.zá ki.** (vier- Silben Aussprache) M.L. gen. N. *sakazakii* von Sakazaki; benannt nach dem Bakteriologen Riichi Sakazaki

#### GENUS

Das Genus *Enterobacter* gehört zu der Familie der *Enterobacteriaceae*. Enterobakterien sind 1,2-3  $\mu\text{m}$  lange und 0,6-1,0  $\mu\text{m}$  breite, gramnegative, gewöhnlich fakultativ anaerobe, kleine unbewegliche oder peritrich begeißelte, gerade, stäbchenförmige Bakterien, die Glukose und weitere Kohlenhydrate unter Säurebildung vergären. Die Spezies *Enterobacter (E.) sakazakii* ist ein 3  $\mu\text{m}$  langes und 1,0  $\mu\text{m}$  breites, nicht sporenbildendes und bewegliches, gramnegatives Stäbchen mit fakultativ anaerobem Stoffwechsel (Abb. 1). Ursprünglich als „gelbpigmentierter *Enterobacter cloacae*“ bezeichnet wurde erstmals von FARMER *et al.* (1977) und BRENNER *et al.* (1977) die Bezeichnung *E. sakazakii* zu Ehren des japanischen Bakteriologen Riichi Sakazaki eingeführt.

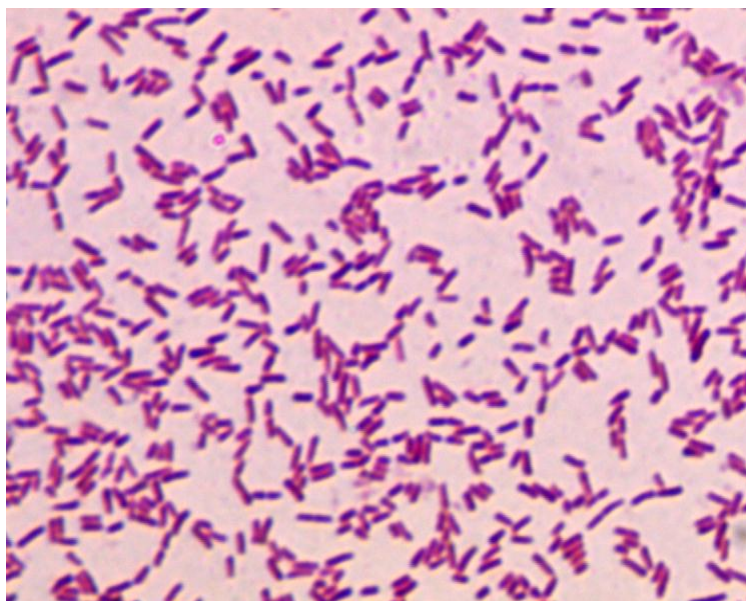


Abbildung 1: *E. sakazakii* – Gramnegative Stäbchen

Die Klassifizierung von *E. sakazakii* als neue Spezies basierte auf DNA-DNA-Hybridisierungen, auf Unterschieden in der Pigmentbildung und biochemischen Reaktionen (FARMER *et al.* 1980, NAZAROWEC-WHITE und FARMER, 1997a). Basierend auf DNA-DNA-Hybridisierungen wiesen gelb pigmentierte Stämme nur einen bis zu 50%igen Verwandtschaftsgrad zu den nicht-pigmentierten Stämmen auf. BRENNER (1974) ordnete den „gelb pigmentierten *Enterobacter cloacae*“ als neue Spezies ein. Dies konnte in späteren Studien bestätigt werden (FARMER *et al.*, 1980, IZARD *et al.*, 1983, STEIGERWALT *et al.*, 1976).

In Untersuchungen zum phylogenetischen Verwandtschaftsverhältnis konnte festgestellt werden, dass sich *E. sakazakii* Stämme aufgrund der Sequenz des 16S rRNA- und hsp60-Gens auf vier taxonomisch heterogene Cluster verteilen. Die 16S rRNA-Sequenz des Referenzstammes zeigte 97,8%ige Ähnlichkeit mit *Citrobacter koseri* und eine 97,0%ige Ähnlichkeit mit *Enterobacter cloacae* auf (IVERSEN *et al.*, 2004d). Weitere Studien von LOC-CORILLO *et al.* (2004) zeigen die Polyphylie des Genus *Enterobacter* auf. Die als *E. sakazakii* identifizierten Stämme konnten eindeutig zwei verschiedenen Gruppen zugeordnet werden, welche auf Grundlage der hsp60-Sequenz weiterhin unterteilt werden können. Beide Genotypen zeigten keine Übereinstimmung im biochemischen Profil auf.

## 2.2.2 Morphologie und physiologische Eigenschaften

Die Bildung von gelb pigmentierten Kolonien auf Trypton Soya Agar (TSA) gilt als ein spezifisches Merkmal von *E. sakazakii*. Nach NAZAROWEC-WHITE und FARBER (1997a) ist die Gelbpigmentierung der Kolonien bei 25°C stärker ausgeprägt als bei 37°C. In vielen klassischen mikrobiologischen Methoden dient die Gelbfärbung in erster Linie als Selektionsmerkmal zur weiteren Isolierung. Frisch isolierte *E. sakazakii* können zwei verschiedene Morphologien zeigen (FARMER *et al.*, 1980). Ein Kolonientyp wird als konvex geformt mit schleimig visköser oder trockener Oberfläche beschrieben. Aufgrund einer zähen Konsistenz schnappt die Kolonie bei dem Versuch, mit der Impföse Material abzunehmen, wieder zurück auf den Agar. Diese Eigenschaften lassen sich auf eine Produktion von Heteropolysacchariden zurückführen (HARRIS und ORIEL, 1989). Ein weiterer Kolonientyp formt glänzende Kolonien mit glattem Rand, welche sich zusammenhängend wie ein Gewebe von einer Agarplatte abziehen lassen. Bei einer Kultivierung von *E. sakazakii* in einer Nährbouillon tendiert dieser dazu, Bakterienaggregate und Sedimente zu bilden (FARMER *et al.*, 1980; NAZAROWEC-WHITE und FARBER, 1997c).

*E. sakazakii* besitzt physiologisch gesehen für das Wachstum eine große Temperaturspannweite von 5,5°C bis 47°C. Die minimale Wachstumstemperatur beträgt 5,5-

8°C, bei 4°C ist kein Wachstum mehr zu verzeichnen. Ein optimales Wachstum erfolgt zwischen 30°C und 37°C. Untersuchungen von FARMER *et al.* (1980) ergaben, dass bei 57 untersuchten *E. sakazakii*-Stämmen ein Wachstum bei 25°C, 36°C und 45°C zu verzeichnen war. Weiterhin vermehrten sich 50 dieser getesteten Stämme auch bei 47°C, jedoch nicht bei 50°C. Die Generationszeiten liegen bei 22°C im Bereich von 37-44 min und bei 10°C im Bereich von 4,2 bis 5,5 h (NAZAROWEC-WHITE und FARBER, 1997b). IVERSEN *et al.* (2004b) berichten von Generationszeiten für *E. sakazakii* in rekonstituierter Milchnahrung bei 6°C im Bereich von 13,7 h, bei 21°C im Bereich von 1,7 h und bei 37 °C im Bereich von 21 min. Demzufolge ist es ersichtlich, dass ein schnelles Wachstum von *E. sakazakii* bei der Lagerung von kontaminierter rekonstituierter Milchnahrung bei hohen Temperaturen gefördert wird.

Der Hauptfaktor für die Vermehrung von Mikroorganismen in rekonstituierter Milchnahrung ist die Temperatur. HARRIS (1989) und RHODEHAMEL (1992) berichten, dass 20% aller Haushaltskühlschränke in einem Temperaturbereich von 5-10°C liegen. VAN GARDE und WOODBURN (1987) hingegen stellten bei 21% der untersuchten Kühlschränke Temperaturen von über 10°C fest. Solche Temperaturen könnten für das Wachstum von *E. sakazakii* bei einer möglichen Kontamination von rekonstituierter Milchnahrung förderlich sein.

Die Aussagen zur Hitzetoleranz von *E. sakazakii* sind nicht einheitlich. Eine Reihe von Autoren bewerten *E. sakazakii* als nicht besonders hitzetolerant, dieser kann sich aber an osmotische Bedingungen und Trockenstress adaptieren (BREEUWER *et al.*, 2003). Die Hitzetoleranz ist stammabhängig, wobei die empfindlicheren Stämme bei einem  $D_{58^{\circ}\text{C}}$  Wert von bis zu 600 sec liegen (BUCHANAN, 2003; EDELSON-MAMMEL und BUCHANAN, 2004). NAZAROWEC-WHITE und FARBER (1997a) hingegen berichten von einer *E. sakazakii* - Hitzeresistenz von 1,3 sec bei  $D_{72^{\circ}\text{C}}$ . Der D-Wert für *Salmonella typhimurium* liegt bei vergleichbaren Bedingungen bei 0,12-0,22 sec (BRADSHAW *et al.*, 1987). In Untersuchungen von BREEUWER *et al.* (2003) liegt der  $D_{58^{\circ}\text{C}}$ -Wert für *E. sakazakii* in einem Bereich von 23,4 bis 36 sec, welcher mit dem anderer *Enterobacteriaceae* vergleichbar ist aber wesentlich niedriger liegt als von NAZAROWEC-WHITE und FARBER (1997a) beschrieben.

Während eine Pasteurisation durchaus ausreichend ist, um pathogene Keime abzutöten, liegen Berichte vor, dass *E. sakazakii* resistenter gegenüber Hitzestress ist als andere *Enterobacteriaceae* (BREEUWER *et al.*, 2003; NAZAROWEC-WHITE und FARBER, 1997a). Das Anrühren von Milchnahrung mit heißem, nicht kochendem Wasser mit einer Temperatur von 70°C führt zu einer dezimalen Reduktion von *E. sakazakii* um mehr als 3,9 Log-Stufen innerhalb von 15 sec (EDELSON-MAMMEL und BUCHANAN, 2004), bringt allerdings ernährungsphysiologische Nachteile mit sich. NAZAROWEC-WHITE *et al.* (1999b) berichten

von einer 5-log-Reduktion des *E. sakazakii* nach einer Behandlung bei 68°C für 16 sec. Eine Erhitzung der zubereiteten Milch durch Mikrowellen auf Temperaturen um 80-90°C führt ebenfalls zur weitgehenden Abtötung pathogener Mikroorganismen (KINDLE *et al.*, 1996), allerdings besteht insbesondere bei ungleichmäßiger Erwärmung durch Unterschätzung der Milchtemperatur das Risiko schwerer Verbrennungen an Gaumen und Speiseröhre (DIXON *et al.*, 1997, SANDO *et al.*, 1984).

### 2.2.3 Biochemische Differenzierung

In den Untersuchungen von MUYSIENS *et al.* (1984) zur Enzymaktivität von *E. sakazakii* und verwandten Arten konnte für alle 129 (100%) untersuchten *E. sakazakii* Stämme im Gegensatz zu anderen *Enterobacteriaceae*-Spezies, *E. cloacae* (60 Stämme), *P. agglomerans* (18 Stämme) und *E. aerogenes* (19 Stämme) eine alpha ( $\alpha$ )-Glucosidase - Aktivität und eine Abwesenheit des Enzyms Phosphoamidase nachgewiesen werden. Spätere Studien von FARMER *et al.* (1980) konnten ebenfalls für 53 von 57 *E. sakazakii* Stämme eine positive  $\alpha$ -Glucosidase Aktivität bestätigen. Weitere Unterscheidungsmerkmale von *E. sakazakii* zu anderen *Enterobacteriaceen* sind der positive Nachweis von Tween<sup>TM</sup> 80-Esterase (ALDOVÁ *et al.*, 1983) sowie die Bildung eines gelben Pigments auf dem Nährmedium TSA (STEIGERWALT *et al.*, 1976; FARMER *et al.*, 1980). Neben der Gelbpigmentierung unterscheidet sich *E. sakazakii* von *E. cloacae* durch die Unfähigkeit, D-Sorbitol zu fermentieren und die Fähigkeit, extrazelluläre DNase zu produzieren (FARMER *et al.*, 1980). HEUVELINK *et al.* (2001) hingegen berichten von *E. sakazakii* Stämmen, die in der Lage sind, D-Sorbitol zu fermentieren. Die biochemischen und physiologischen Eigenschaften erlauben eine weitere Differenzierung innerhalb der Gattung (Tab. 2).

**Tabelle 2:** Biochemische Differenzierung von *Enterobacter sakazakii* und verwandten Arten (FARMER *et al.*, 1980 , HOLT *et al.*, 1994)

Test	Reaktion			
	<i>E.sakazakii</i>	<i>E.cloacae</i>	<i>E. agglomerans</i>	<i>E. aerogenes</i>
D-Sorbitol	-	+	(+)	+
Citrat	+	+	(+)	+
Glucose	+	+	+	+
Lactose	+	+	(+)	+
Indol	-	-	(+)	-
Lysindecaboxylase	-	-	-	+
Arginindihydrolase	+	+	-	-
Ornithindecaboxylase	+	+	-	+
NO <sub>3</sub> → NO <sub>2</sub>	+	+	+	+
Gelbes Pigment	+	-	(+)	-
Tween <sup>TM</sup> -80 Esterase	+	-	-	-
Phosphoamidase	-	+	+	+
α-Glucosidase	+	-	-	-
Wachstum in KCN	+	+	(+)	+
Oxidase	-	-	-	-
Katalase	+	+	+	+
Beweglichkeit	+	+	+	+

+ positiv nach 24-48 h; (+) meistens positiv (ca. 89 % der getesteten Stämme); - negativ nach 24 h

## 2.3 Gefahrenanalyse

### 2.3.1 Vorkommen und Bedeutung von *Enterobacter sakazakii*

Das natürliche Habitat von *E. sakazakii* ist gegenwärtig nicht bekannt. *E. sakazakii* konnte mehrmals aus dem Umfeld und aus Lebensmitteln isoliert werden, wobei Wasser, Boden und Gemüse die wahrscheinlichen Quellen sind.

Die physiologischen Eigenschaften dieses Bakteriums deuten darauf hin, dass es möglicherweise über eine Nische im Produktionsumfeld von pulverförmigen Nahrungsmitteln verfügt (IVERSEN und FORSYTHE, 2003). In vorangegangenen Untersuchungen wurde versucht, *E. sakazakii* aus verschiedenen Umfeld- und Naturbereichen, eingeschlossen Wasser, Böden, Schlamm, verrottetes Holz, Getreide, Vogelkot, Haustiere und Kuhmilch, zu isolieren (MUYTJENS UND KOLLEE, 1990). Der Organismus konnte in keiner dieser Umfeldproben detektiert werden. KANDHAI *et al.* (2004a) untersuchten Proben sowohl aus der Lebensmittelindustrie als auch aus Haushalten auf *E. sakazakii*. In acht von neun Betrieben war mindestens eine Probe positiv, in fünf von 16 Haushalten konnte *E. sakazakii* aus Staubsaugerproben isoliert werden. Der Nachweis von *E. sakazakii* bestätigt das ubiquitäre Vorkommen dieses opportunistischen Krankheitserregers. *E. sakazakii* konnte aus

Milchprodukten wie Milchpulver, Käseprodukten und Säuglingsnahrung (IVERSEN und FORSYTHE, 2003) und ebenfalls aus Hackfleisch und Gemüse isoliert werden (LECLERCQ *et al.*, 2002). Berichten zufolge konnte *E. sakazakii* auch aus Proben tierischen Ursprungs isoliert werden. Isoliert wurde *E. sakazakii* aus Ratten in Kenia (GAKUYA *et al.*, 2001) und aus mexikanischen Fruchtfliegen in Kalifornien (KUZINA *et al.*, 2001). Aufgrund der Vielfältigkeit der kontaminierten Lebensmittel und anderer Quellen ist die genaue Kontaminationshäufigkeit nicht bekannt.

MUYTJENS *et al.* (1988) haben in 53% von 141 untersuchten Säuglingsnahrungen aus 35 verschiedenen Ländern *Enterobacteriaceae* und in 14% *E. sakazakii* nachgewiesen, wobei alle Proben hinsichtlich der mikrobiologischen Kriterien den Wert von 1 KbE/g nicht überschritten haben. NAZAROWEC-WHITE und FARBER (1997c) konnten in acht von 120 Proben von fünf verschiedenen kanadischen Herstellern *E. sakazakii* in einer Keimzahl bis zu 0,36 KbE/100g nachweisen. Zur minimalen infektiösen Dosis gibt es bisher keine gesicherten epidemiologischen Studien (LEHNER und STEPHAN, 2004). Die Dosis-Wirkungs-Beziehung kann wie im Falle anderer Mikroorganismen je nach Merkmalen und physiologischen Zustand des Keims, des Wirts sowie der Lebensmittelmatrix schwanken. Das ubiquitäre Vorkommen von *E. sakazakii* führt zu der Annahme, dass eine Aufnahme geringer Keimzahlen in Säuglingsnahrung durch gesunde Säuglinge und Kinder nicht zur Erkrankung führt.

### 2.3.2 Pathogenität, Virulenz und klinisches Erkrankungsbild

*E. sakazakii* wird häufig als opportunistischer Krankheitserreger beschrieben. Als Kontaminante von Säuglingsnahrung wird dieser Keim ursächlich in Verbindung mit sporadischen Ausbrüchen bakterieller Infektionen bei Früh- und Neugeborenen in den ersten Lebenstagen gebracht. Maßgeblich befinden sich Säuglinge, die mit einem geringeren Gestationsalter als 36 Wochen geboren werden, bis zur sechsten Woche *post-partum* in einem Risikostadium; ein immungeschwächter Gesundheitsstatus wird ebenfalls als Risikofaktor für eine *E. sakazakii* - Infektion eingestuft (FDA/CFSAN, 2003). Die Zahl der berichteten Fälle ist zwar gering, aber die Krankheitsverläufe sind oft dramatisch mit nekrotisierender Enterokolitis (NEC), Meningitis und Sepsis (LAI, 2001, NAZAROWEC-WHITE und FARBER, 1997c). Die beobachtete Letalität liegt bei 40-80%. LUCAS und COLE (1990) berichten von einer um das zehnfach höheren Erkrankungshäufigkeit an NEC bei Säuglingen, die mit Milchfertignahrung gefüttert werden als bei gestillten Säuglingen.

Die jährliche Rate an Infektionen mit *E. sakazakii* liegt nach Berichten der FAO/WHO (2006) insgesamt für Säuglinge, die jünger als 12 Monate sind, bei 1:100 000, wohingegen sich die

Rate bei den Säuglingen mit niedrigem Geburtsgewicht (<2500g) auf 8,7:100 000 beläuft. Ähnlich wird die jährliche Infektionsrate durch *E. sakazakii* bei Säuglingen mit sehr geringem Geburtsgewicht (<1500g) auf 9,4:100 000 geschätzt. Obwohl das Vorkommen einer Erkrankung, verursacht durch *E. sakazakii*, bei älteren pädiatrischen Patienten und auch Erwachsenen nicht bekannt ist, wird dennoch in drei Infektionsfällen von Erkrankungen des Zentralnervensystems und einer Sepsis bei Kindern älter als 12 Monaten (ARSENI *et al.*, 1987; LAI, 2001), in acht Fällen bei Erwachsenen und in sechs Fällen bei Personen, die älter als 70 Jahre sind, berichtet (LAI, 2001). Das geschätzte Vorkommen von Erkrankungen des Zentralnervensystems und einer Sepsis durch *E. sakazakii* in unterschiedlichem Alter liegt in England, Wales und Nordirland zwischen 0,09 und 0,12 pro 100 000 Einwohner. Folglich wird angenommen, dass Kinder, die älter als 12 Monate sind, und Erwachsene einem geringeren Risiko ausgesetzt sind, an einer *E. sakazakii* - Infektion zu erkranken als Säuglinge mit niedrigem Geburtsgewicht. Im Resistenzverhalten können einige *E. sakazakii* Stämme eine Empfindlichkeit gegenüber den Antibiotika Ampicillin, Cefoxitin, Cephalotin aufzeigen. Die Tatsache, dass diese Spezies ebenfalls eine Empfindlichkeit gegenüber einigen Aminoglycosiden aufweist, führt zu der Annahme, dass der Keim üblicherweise Ursache einer nosokomialen Infektion unbekanntem Ursprungs und mit größter Wahrscheinlichkeit nicht Teil einer stabilen Krankenhausflora ist (SANDERS und SANDERS, 1997; MUJTJENS und VAN DER ROS-VAN DE REPE, 1986).

Erstmals berichteten URMENYI und FRANKLIN (1961) im Jahre 1958 von einer neonatalen Meningitis zweier Säuglinge in England mit tödlichem Ausgang, verursacht durch den „gelb-pigmentierten *Enterobacter cloacae*“. Seither konnten weltweit bis zu 40 Erkrankungsausbrüche mit 60 bis 80 betroffenen Säuglingen registriert werden (Tab. 3). Obwohl die Infektionsquelle in vielen Fällen nicht eindeutig ist, konnte neben anderen Infektionsquellen in der Umwelt mehrmals Säuglingsnahrung als Ursprung identifiziert werden, was entsprechende Risikomanagementstrategien erfordert (NAZAROWEC-WHITE und FARBER, 1997c).

**Tabelle 3:** *E. sakazakii* - Infektionen und Ausbrüche bei Säuglingen assoziiert mit Säuglingsnahrung

Jahr des Ausbruchs	Ort	Anzahl der Infizierten	Alter der Infizierten	Gestationsalter	Ausgang/Anzahl der Todesfälle	Symptome	Ursache	Quelle
1958	St. Albans, UK	2	5 u. 10 Tage	unbekannt	2	Meningitis	Brutkasten*	URMENYI und FRANKLIN (1961)
1965	Dänemark	1	4 Tage	unbekannt	überlebt	Meningitis	unbekannt	JÓKER <i>et al.</i> (1965)
1979	Georgia, USA	1	7 Tage	unbekannt	überlebt	Bakteriämie	unbekannt	MONROE und TIFT (1979)
1981	Oklahoma, USA	1	unbekannt	unbekannt	1	Meningitis, Sepsis	unbekannt	ADAMSON und ROGERS (1981)
1981	Indianapolis, USA	1	5 Wochen	ausgetragen	überlebt	Meningitis	unbekannt	KLEIMAN <i>et al.</i> (1981)
1977-1983	Niederlande	8	3-9 Tage	32-39 Wochen	6	Meningitis	IMF, Geburtskanal	MUYTIENS <i>et al.</i> (1983)
1984	Griechenland	1	2 Tage-2 Monate	Frühgeburt	überlebt	Kolonisation	unbekannt	ARSENI <i>et al.</i> (1987)
1984	Missouri	1	21 Tage	unbekannt	überlebt	Meningitis	unbekannt	NAQVI <i>et al.</i> (1985)
1987	Boston, (MA), New Orleans (LA), USA	2	8 Tage u. 4 Wochen	unbekannt	1	Meningitis	unbekannt	WILLIS und ROBINSON (1988)
1986-1987	Reykjavik	3	5 Tage	Frühgeburt	1 letal, 2 Hirnschaden	Meningitis	IMF	BIERING <i>et al.</i> (1989), CLARK <i>et al.</i> (1990)
1988	Memphis (TN), USA	4	2-5/3 Tage	28-35 Wochen	Überlebt	Sepsis, Diarrhoe	IMF, Mixer*	SIMMONS <i>et al.</i> (1989), CLARK <i>et al.</i> (1990)
1990	Baltimore (MD), USA	1	6 Monate	unbekannt	überlebt	Bakteriämie	IMF	NORIEGA <i>et al.</i> (1990)
1990	Cincinnati, (OH), USA	1	2 Tage	unbekannt	überlebt	Meningitis	unbekannt	GALLAGHER und BALL (1991)
1998	Israel	1	6 Tage	unbekannt	überlebt	Meningitis	unbekannt	BLOCK <i>et al.</i> (2002)
1998	Belgien	12	4 Tage-2 Monate	Intensivpatient	2 letal	NEC	IMF	VAN ACKER <i>et al.</i> (2001)
1995/1996	Boston (MA), USA	1	3 Jahre	unbekannt	überlebt	Bakteriämie	unbekannt	LAI (2001)
2000	Winston Salem (NC), USA	1	6 Tage	35 Wochen	überlebt	Gehirnabszess	unbekannt	BURDETTE und SANTOS (2000)
2001	Knoxville (TN), USA	11	11 Tage	unbekannt	1	Meningitis, NEC	IMF	HIMELRIGHT <i>et al.</i> (2002), WEIR (2002)
2001	Jerusalem, Israel	2	3 und 4 Tage	27-36 Wochen	überlebt	Septikämie, Meningitis	IMF, Mixer*	Bar-Oz <i>et al.</i> (2001)
2002	Tennessee	1	11 Tage	33,5 Wochen	1	Meningitis	unbekannt	CDC (2002)
2002	Belgien	1	1 Woche	voll ausgetragen	1	unbekannt	IMF	FDA (2002)
2004	New Zealand	5	unbekannt	unbekannt	1	Meningitis	IMF	FSAI (2005)
2004	Frankreich	9	unbekannt	25-37 Wochen	2	Meningitis	IMF	COIGNARD und VAILLANT (2006)

IMF- Infant Milk Formula; NEC - Necrotizing Enterocolitis, \*kontaminiert mit *E. sakazakii*

Die Pathogenität der Enterobacteriaceae-Spezies wird durch verschiedene Virulenzfaktoren bestimmt, die mit bestimmten pathologischen Zuständen assoziiert sind (PODSCHUN und ULLMANN, 1998; MARCUS et al., 2000). Dazu zählt die Freisetzung von Endotoxinen und Exotoxinen (Proteine, z. B. Zyto-, Neurotoxine), die Kapselbildung, die Ausbildung von Adhäsinen, die eine Kolonisation an Darmepithelzellen erlauben, Serumresistenz, Siderophore sowie verschiedene Plasmide.

Die Hauptvirulenzfaktoren für beispielsweise *E. coli* sind unter anderem das Shiga-Toxin, die Adhäsine `Bundle forming pili` und das Intimin (EISENSTEIN und JONES, 1988; NATARO und KAPER, 1998; KUHNERT et al., 2000).

Als Virulenzfaktoren wurden bei *Klebsiella pneumoniae* vor allem Fimbrien als Adhäsionsfaktor und Enterotoxine mit hypersekretorischer Wirkung beobachtet. Für die meisten *E. cloacae* Stämme werden häufig die Serumresistenz, die Produktion des Siderophore Aerobactin und die Hämagglutinationsaktivität als Virulenzfaktoren genannt (KELLER et al., 1998).

Über die Pathogenität und die Virulenz-Faktoren von *E. sakazakii* ist bisher nur wenig bekannt. Eine Stammabhängigkeit wird vermutet (FARBER, 2004). In einer Studie zur Pathogenität führten zwei von 18 untersuchten *E. sakazakii* Stämmen nach einer oralen Verabreichung bei Mäusen zum Tode. Die Autoren vermuten als Ursache die Enterotoxinbildung. Für einige der untersuchten Stämme konnte in Zellkulturexperimenten ein zytotoxischer Effekt gezeigt werden. Der Organismus ist in der Lage, sich an intestinale Zellen anzuheften und innerhalb von Makrophagen zu überleben (PAGOTTO et al. 2003). Dagegen zeigten Untersuchungen von IVERSEN et al. (2004c) die Fähigkeit von *E. sakazakii* Stämmen, an CaCo2-Zellen zu adhären.

### 2.3.3 Risikobewertung

Die `International Commission on Microbiological Specifications for Food` (ICMSF) (2002) stuft den Erreger *E. sakazakii* als `höchst gefährdend für eine bestimmte Bevölkerungsgruppe, für lebensbedrohlich erkrankte oder beträchtlich chronisch erkrankte Menschen` ein. Folglich hat es denselben Rang wie die durch Lebensmittel oder Wasser übertragenen Krankheitserreger *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum* A und B und *Cryptosporidium parvum* eingenommen (FORSYTHE, 2005). Die Mikroorganismen oder mikrobiellen Toxine, deren Anwesenheit in Säuglingsnahrung auf Trockenmilchbasis nachweislich mit einer Erkrankung von Säuglingen assoziiert wurde, sind von der FAO/WHO (2004) und FAO/WHO (2006) wie folgt kategorisiert:

**Kategorie A: Kausaler Zusammenhang erwiesen**

*E. sakazakii* und *Salmonella*

**Kategorie B: Ursache plausibel, bisher jedoch nicht bewiesen**

*E. vulneris*, *Citrobacter koseri*, *C. freundii*, *E. cloacae*, *Hafnia alvei*, *Pantoea agglomerans*, *Klebsiella pneumoniae*, *K. oxytoca*, *E. coli*, *Serratia* spp. und *Acinetobacter* spp.

**Kategorie C: Als Ursache weniger plausibel oder bisher nicht bewiesen**

*Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*, *C. difficile*, *C. perfringens*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* und Koagulasenegative *Staphylokokken*

Eine Kontamination von Säuglingsnahrung auf Basis von Trockenmilchpulver mit *E. sakazakii* ist nicht auszuschließen, denn im Gegensatz zu Flüssignahrung sind Milchpulverpräparate nicht steril. Aufgrund des niedrigen  $a_w$ -Wertes (Wasseraktivität) ist es dem Erreger nicht möglich, sich in der Trockenmilch zu vermehren, in der rekonstituierten Milch findet jedoch bei fehlender Kühlung und falscher Handhabung eine Vermehrung statt (CVUA, 2004).

Unter dem Aspekt einer möglichst geringen Nährstoffreduzierung wird für die Herstellung von Säuglingsnahrungsmitteln vorzugsweise kurzzeiterhitzte Milch (Low-heat Pulver) verwendet. Durch Sprüh- und Walzentrocknung wird flüssigen Ausgangsprodukten das Wasser entzogen und somit Milchpulvererzeugnisse haltbar gemacht. Ein verbleibender Restwassergehalt von 2,5-5 % ist für die Vermehrung von Mikroorganismen nicht ausreichend. In der Sprühtrocknungsanlage wird Luft im Temperaturbereich von 150-250°C eingesetzt. Da der größte Teil der Energie zur Verdampfung des Wassers benötigt wird, wird die Milch selbst nur auf 70-80°C erwärmt. Demzufolge ist eine vollkommene Keimabtötung nicht gewährleistet (RIEMELT *et al.*, 2003).

Im Produktionsumfeld ist *E. sakazakii* mit einem Vorkommen von 1-12% präsent, die Kontamination liegt zwischen 0,36 und 66 KbE/100g Trockenmilchpulver (NAZAROWEC-WHITE und FARBER, 1997c; MUYTJENS und VAN DER ROS-VAN DE REPE, 1986; MUYTJENS *et al.*, 1984).

Präventive Maßnahmen bezüglich *E. sakazakii* im Herstellungsprozess schließen eine mikrobiologische Qualität der Zutaten, die Verringerung der Konzentration an *Enterobacteriaceae* in der Produktionsumgebung sowie die Vermeidung der Rekontamination des Endproduktes ein. Die Anwesenheit von *E. sakazakii* in der Verarbeitungsumgebung kann durch strenge Hygienemaßnahmen einschließlich der Zutrittskontrolle des Personals, der Trennung von Nass- und Trockenverfahren sowie der Vermeidung der Kondensation und des Eindringens von Wasser in Trockenbereiche auf ein

Mindestmaß verringert werden (EFSA, 2004). Aufgrund einer wahrscheinlich niedrigen Infektionsdosis ist eine permanente Überprüfung von Milchpulver und Säuglingsanfangsnahrung unabdingbar.

Obgleich die Art der Übertragung nicht immer eindeutig ist, konnte bei einer Rückverfolgung neben anderen Infektionsquellen in der Umwelt mehrmals Säuglingsnahrung als Ursprung ausgemacht werden, wobei dies ein erhebliches Infektionsrisiko insbesondere für Neugeborene in den ersten zwei Lebensmonaten, für Frühgeborene sowie für abwehrgeschwächte Kinder darstellt (BIERING *et al.*, 1989; VAN ACKER *et al.*, 2001; HIMELRIGHT *et al.*, 2002). Bei der Zubereitung derartiger Produkte sollten daher insbesondere bei diesen Risikogruppen wichtige hygienische Hinweise beachtet werden (Tab.4).

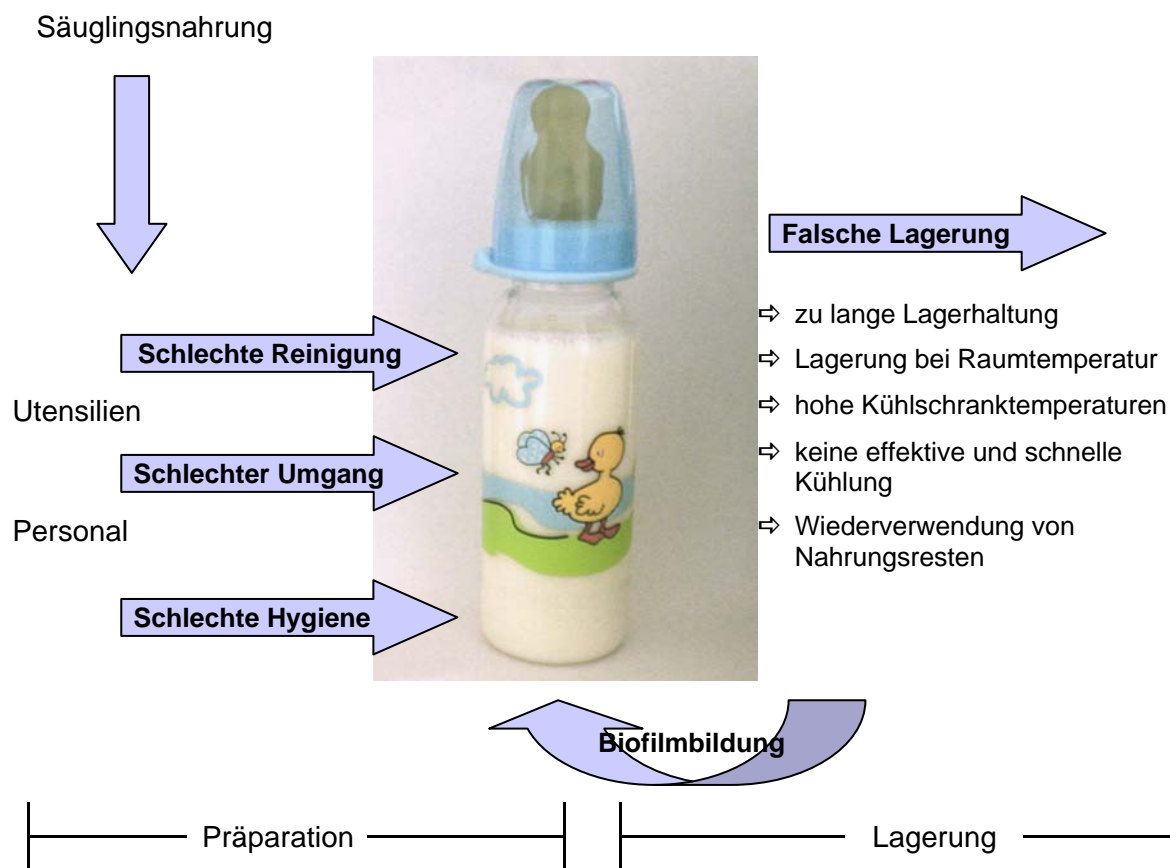
**Tabelle 4:** Richtlinien zur Präparation und zum Umgang mit Säuglingsnahrung\*

- Gute Hygienemaßnahmen zur Vermeidung von Kontaminationen (z. B. Händewaschen, Sauberkeit in der Küche und von Geräten)
- Verwendung von sterilisierten Fläschchen zum Ansetzen von rekonstituierter Milch
- Zur Herstellung rekonstituierter Milch, heißes (>70°C) bzw. abgekochtes und anschließend abgekühltes Wasser verwenden, sofort auf Trinktemperatur abkühlen und sofort verfüttern
- Nur die für jede Mahlzeit erforderliche Trinkmenge frisch herstellen, keinen Vorrat für den ganzen Tag zubereiten
- Lagerung und Heißhaltezeiten beispielsweise in Flaschenwärmern vermeiden
- Nahrungsreste nicht aufbewahren, sondern verwerfen
- In Kliniken bei der Versorgung auf den Frühgeborenen-Stationen: bei Sonden-Ernährung sorgfältige Handhabung der Nahrung, Vermeidung von zu langen Lagerzeiten der verzehrfertigen Milchnahrung in den Sonden
- Für in Kliniken betreute Neu- und Frühgeborene ist die bevorzugte Verwendung von sterilen, trinkfertig portionierten Flüssignahrungen zu erwägen

\*FDA (April 2002), EFSA (2004)

Ferner konnten in einigen Fällen kontaminierte Utensilien, welche zum Ansetzen von Milchnahrung genutzt wurden, wie Mixer und Löffel sowie lange Warmhaltung von rekonstituierter Säuglingsnahrung in Flaschenwärmern als Quelle für *E. sakazakii*-Infektionen bei Säuglingen ausgemacht werden (BLOCK *et al.*, 2002; BAR-OZ *et al.*, 2001; NORIEGA *et al.*, 1990; JASPER *et al.*, 1990).

Bei der Rekonstituierung der Milch sollten Verbraucherhinweise des Herstellers als auch die Hygiene-Empfehlungen strikt befolgt werden. Die Risikofaktoren einer Kontamination, Rekontamination und Vermehrung von *E. sakazakii* bei der Rekonstituierung der Säuglingsmilch sind in Abbildung 2 zusammenfassend dargestellt.



**Abbildung 2:** Risikofaktoren in rekonstituierter Säuglingsnahrung durch *E. sakazakii*

Als Quelle für die Kontamination von Säuglingsnahrung mit *E. sakazakii* kommen verschiedene Kontaminationswege in Betracht. Die in Leitungssystemen, Tanks und Abfüllsystemen befindlichen Mikroorganismen, zu denen neben den psychrotrophen Vertretern der *Pseudomonas*-, *Aeromonas*- und *Streptococcus*-Spezies auch *Enterobacteriaceen* gehören, sind unter anderem ursächlich für eine Rekontamination verantwortlich. Kontaminierte Verpackungen und somit ein kontaminiertes Umfeld beeinflussen das Rekontaminationsniveau. Neben der permanenten Präsenz des Bakteriums im Produktionsumfeld könnte auch ein Eintrag über den Zusatz von hitzesensitiven Inhaltsstoffen nach der Hitzebehandlung stattfinden (KANDHAI *et al.*, 2004a).

Die Anwesenheit pathogener Keime ist in gut kontrollierten Herstellungs- und Vertriebsprozessen eine Seltenheit. Deren Nachweis ist vor allem dann sinnvoll, wenn das Produkt in einem direkten Zusammenhang mit einem Infektionsfall stehen könnte.

Einige Vertreter dienen als Markerorganismen, um einen besonderen mikrobiologischen Zustand in Lebensmitteln aufzuzeigen und zu beurteilen. In Abhängigkeit vom bestehenden Zustand wird unterschieden zwischen den Indexorganismen, deren Anwesenheit Ausdruck möglicher Präsenz pathogener Erreger ökologisch gleicher oder ähnlicher Herkunft sind und den Indikatororganismen, die einen unzureichenden hygienischen Zustand bzw. einen technologischen Fehler in der Bearbeitung anzeigen.

Das geringe Kontaminationsniveau mit potenziellen pathogenen Keimen in Milchpulver macht eine Detektion im Rahmen eines praktikablen Stichprobenplans schwierig. Schon zur Kontrolle von Salmonellen-Kontaminationen wurde die Nutzung von Enterobakterien als Markerorganismen diskutiert. Da aber der Zusammenhang zwischen Salmonellen und Enterobakterien nicht stringent ist, kann ein Enterobakterien-positives Batch nicht grundsätzlich als potenziell Salmonellen-positiv betrachtet werden. Umgekehrt gibt eine negativer Enterobakterienbefund keine Sicherheit, dass das untersuchte Batch auch Salmonellen-negativ ist. MOSSEL und STRUIJK (1995) versuchten mit dem Epsilonfaktor eine ökologische Determinante einzuführen, die das Risikoverhältnis zwischen Enterobakterien und Salmonellen nachvollziehbar kalkuliert. Der Epsilonfaktor steht für das Verhältnis von koloniebildenden Einheiten (KbE) des Markerorganismus (z. B. *Enterobacteriaceae*) zu den KbE's des pathogenen Erregers (z. B. *Salmonella* spp.) (DRION und MOSSEL, 1972; DRION und MOSSEL, 1977; MUYTJENS *et al.*, 1988; MOSSEL und STRUIJK, 1995). Dieser Ansatz konnte sich aufgrund mangelnder Praktikabilität in der Praxis nicht durchsetzen. Da bei *E. sakazakii* die gleichen Probleme des niedrigen Kontaminationsniveaus vorliegen, wird auch hier diskutiert, das *E. sakazakii*-Risiko über die Enterobakterien-Ergebnisse abzuschätzen. In der vorliegenden Arbeit wurde das Verhältnis zwischen diesen Markerorganismen (Enterobakterien) und dem assoziierten Pathogenen (*E. sakazakii*) untersucht.

Bei Lebensmitteln ist unter anderem *E. coli* ein Markerorganismus für eine potenzielle Gesundheitsgefährdung. Der Pathogenität, welche ebenfalls von *E. coli* selbst ausgehen kann (z.B. EHEC), ist jedoch bei einer Einschätzung des Gesundheitsrisikos Rechnung zu tragen. Auch wenn *E. coli* nicht nachgewiesen wird, kann die Anwesenheit von pathogenen Keimen aus der Familie der *Enterobacteriaceae* nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden (BAUMGART, 1993)

Gegenwärtig wird Säuglingsnahrung auf Trockenmilchbasis auf Coliforme oder *Enterobacteriaceae* als Hygieneindikatoren getestet. Aufgrund des ubiquitären Vorkommens von *E. sakazakii* ist der Keim in der Verarbeitungsumgebung schwieriger zu bekämpfen als

*Salmonella*. Salmonellen kommen im Intestinaltrakt von Menschen und Tieren vor. Die wichtigsten Infektionsquellen sind kontaminierte Nahrungsmittel und Abwasser. Bei mangelhaften hygienischen Bedingungen bieten insbesondere eiweißreiche Lebensmittel wie Fleisch, Milch und Eier den Salmonellen ausgezeichnete Vermehrungsbedingungen. Effektive Kontrollmaßnahmen für Salmonellen im Produktionsumfeld von Säuglingsmilchpulver herstellenden Betrieben sind bereits etabliert. Die zusätzlichen Untersuchungen auf Coliforme oder *Enterobacteriaceae* in Rohstoffen, Umfeldproben und Endprodukten dienen als wichtige Hygieneindikatoren. IVERSEN und FORSYTHE (2004e) konnten in ihren Untersuchungen *E. sakazakii* aus Proben isolieren, die zuvor in der Testung auf Coliforme für *E. sakazakii* unauffällig waren. Demzufolge ist eine spezifische *E. sakazakii* Nachweismethode notwendig.

## 2.4 Risikomanagement und Qualitätskontrollmaßnahmen

### 2.4.1 Mikrobiologische Anforderungen an Säuglingsnahrung mit Angaben zu nationalen Aktivitäten, EU-Recht und internationalen Normen

Säuglinge, die nicht oder nicht voll gestillt werden, können mit industriell hergestellter Säuglingsnahrung als Alternative zur Muttermilch, ernährt werden (DGKJ, 2006). Die Richtlinie der europäischen Gemeinschaft (91/321/EG vom 4.7.1991) beinhaltet die Einteilung der Milchnahrung, welche altersbezogen und ernährungsphysiologisch in Säuglingsanfangsnahrungen und Folgenahrungen unterschieden wird. Die Europäische Kommission (2006) definiert in ihren Richtlinien Säuglingsanfangsnahrungen als Lebensmittel, die für die besondere Ernährung von Säuglingen während der ersten Lebensmonate (0-6 Monate) bestimmt sind und für sich allein den Ernährungserfordernissen dieser Säuglinge bis zur Einführung angemessener Beikost entsprechen. Folgenahrungen sind Lebensmittel, die für die besondere Ernährung von Säuglingen (nach dem 4. Monat) ab Einführung einer angemessenen Beikost bestimmt sind und den größten flüssigen Anteil einer nach und nach abwechslungsreicheren Kost für diese Säuglinge darstellen.

Da die Trockenmilch für die Herstellung von Säuglingsnahrung nicht steril ist, werden an die Herstellung strenge mikrobiologische Anforderungen gestellt. Hierfür gilt in Deutschland die Diät-Verordnung (2005, § 14, Absatz 2). Demnach dürfen in 0,1 ml rekonstituierter Säuglingsnahrung bzw. 0,01 g der Trockenmilch keine coliformen Keime (zu denen *E. sakazakii* gehört) nachweisbar sein. Die Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM, 2006) gibt in den „Mikrobiologischen Richt- und Warnwerten zur

Beurteilung von Lebensmitteln“ bei der Beurteilung von Säuglingsnahrung auf Trockenmilchbasis für *Enterobacteriaceae* den Richtwert von <10 KbE/g und den Warnwert von 100 KbE/g an. Letzterer entspricht dem Grenzwert für coliforme Keime der Diät-Verordnung. Da es in Deutschland für *E. sakazakii* keine einheitliche Regelung bezüglich der mikrobiologischen Kriterien für Säuglingsnahrung gibt, haben die Richtlinien der Europäischen Kommission unmittelbare Geltung (MAYER, 1998).

Nach der neuesten Gesetzgebung der Europäischen Kommission (2005) in der Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 vom 15. November 2005 über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel darf *E. sakazakii* in getrockneter Säuglingsanfangsnahrung und getrockneten diätetischen Lebensmitteln für besondere medizinische Zwecke, die für Säuglinge unter 6 Monaten bestimmt sind, in 300 g ( $n=30$ ,  $c=0$ ,  $m=$  negativ/10g) nicht nachweisbar sein. Bei der Festlegung der mikrobiologischen Kriterien für den pathogenen Erreger *E. sakazakii* kommt ein Zwei-Klassen-Stichprobenplan, auch als Anwesenheits-/Abwesenheitsprüfung (qualitativ) bezeichnet, zur Anwendung. Bei diesen Untersuchungen wird eine definierte Probenanzahl ( $n$ ) auf das Vorkommen von *E. sakazakii* in einer festgelegten Probenmenge getestet. Von diesen Proben darf nur eine begrenzte Anzahl ( $c$ ) den für *E. sakazakii* zulässigen Grenzwert überschreiten. Bei einem Drei-Klassen-Stichprobenplan hingegen, welcher für die aerobe mesophile Keimzahl zur Anwendung kommt, wird hier noch zusätzlich ein begrenzt akzeptabler Bereich angegeben. Dieser liegt zwischen einem Schwellenwert (Richtwert) und dem Höchstwert ( $M$ ) (RIEMELT *et al.*, 2003). Eine Testung auf *E. sakazakii* ist vor allem dann unerlässlich, wenn der positive Nachweis von *Enterobacteriaceae* in 100 g ( $n=10$ ,  $c=0$ ,  $m=$  neg./10 g) derselben Probeneinheit positiv ist. Zusätzlich wird eine Verbesserung in der Herstellungshygiene zur Minimierung der Kontamination verlangt.

Auf internationaler Ebene wurden bisher für Lebensmittel für Säuglinge und Kleinkinder noch keine Leitlinien für mikrobiologische Kriterien ausgearbeitet. Harmonisierte mikrobiologische Anforderungen für Lebensmittel für Säuglinge und Kleinkinder sollten zur Verfügung gestellt werden, um die nationalen Kriterien zu ersetzen. Die Europäische Kommission hat jedoch die Codex-Spezifikationen für Lebensmittel für Säuglinge und Kinder (Tab. 5), basierend auf den Grundsätzen der Lebensmittelhygiene CAC/RCP 1-1969, Rev. 4-2003 (CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION, 2006), berücksichtigt. Diese Spezifikationen sind vom Codex noch in Revision und werden international diskutiert. Eine Verabschiedung dieser Spezifikationen steht noch aus.

**Tabelle 5:** Mikrobiologische Spezifikation für Säuglingsmilchpulverernährung (CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION, 2006)

Mikroorganismus	n	c	m	M	Klassenplan
Aerobe mesophile Keimzahl	5	2	500/g	500/g	3
<i>Enterobacteriaceae</i>	10	0	0/10 g	NA	2
<i>E. sakazakii</i>	30	0	0/10 g	NA	2
<i>Salmonella</i>	60	0	0/25 g	NA	2

n = Anzahl der Proben

m = Schwellenwert; das Ergebnis gilt als ausreichend, wenn die einzelnen Proben diesen Wert nicht überschreiten

M = Höchstwert; das Ergebnis gilt als nicht ausreichend, wenn die Werte einer oder mehrerer Proben dieser Werte überschreiten.

c = Anzahl der Proben mit Wert zwischen m und M; das Ergebnis gilt als akzeptabel, wenn die Werte der übrigen Proben höchstens den Wert m erreichen.

NA = Nicht Anwendbar

## 2.4.2 Identifizierung und Charakterisierung von *Enterobacter sakazakii*

### 2.4.2.1 Konventioneller mikrobiologischer Nachweis

Der Nachweis von *E. sakazakii* in Trockenmilchprodukten erfolgte bislang indirekt über den Nachweis coliformer Keime oder *Enterobacteriaceae* als Hygieneindikatoren. Dazu kamen hauptsächlich Violet Red Bile Lactose - Agar (VRBL) nach §64 des LFGB (Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch, 2006), Violet Red Bile Glucose - Agar (VRBG) (Europäischen Arzneibuch, 1997) in Verbindung mit Anreicherungsmedien wie Mossel-Medium (*Enterobacteriaceae* Enrichment Broth) zum Einsatz. LEQLERQ *et al.* (2002) überprüften das Wachstum von *E. sakazakii* auf dem Faecal Coliform Agar (FCA), welches von HSING-CHEN und WU (1992) entwickelt wurde, und konnten dafür eine höhere Wiederfindungsrate als beim VRBL feststellen.

Grundsätzlich sollten alle technologisch verarbeiteten Lebensmittel kurzzeitig zur Regeneration subletal geschädigter Zellen vor der Überführung in Selektivmedien in nicht selektiven Medien vorinkubiert werden. Vor allem beim Nachweis von Salmonellen und anderen *Enterobacteriaceae* in Trockenprodukten erwies sich eine Supplementierung der Voranreicherung mit Ferrioxamin E als vorteilhaft. Bei dem Ferrioxamin E handelt es sich um ein Trihydroxamat-Siderophor, welches Eisen bindet. Die Salmonellen sind nicht in der Lage, das Ferrioxamin E zu bilden, besitzen dennoch ein hochwirksames Aufnahme- und Verwertungssystem für das Siderophor. Demzufolge werden sie mit dem zum Wachstum

benötigten Eisen als essenziellem Mikronährstoff versorgt. Dies hat eine Verkürzung der lag-Phase in den Nährmedien und somit eine Wachstumsbeschleunigung zur Folge (REISSBRODT, 1994; PLESS und REISSBRODT, 1995). Inzwischen wird das Ferrioxamin E als Supplement zur verbesserten Isolierung für Salmonellen und *E. sakazakii* kommerziell vertrieben.

Als quantitative Nachweismethode für *E. sakazakii* ist bisher nur die Most Probable Number-Methode (MPN) der Food and Drug Administration (FDA, 2002) bekannt, die auf klassischen Anreicherungs- und Selektionsschritten für *Enterobacteriaceae* beruht. Das Prinzip liegt in einer Voranreicherung von 3x1g, 3x10g und 3x100g Proben in destilliertem Wasser, gefolgt von einer Anreicherung in Mossel-Medium und anschließender Isolierung VRBG-Agar. Aufgrund der minimalen Differenzierungsmerkmale des Keimes innerhalb der Bakterienfamilie der *Enterobacteriaceae* wird speziell auf die Pigmentbildung hin untersucht. Wesentliche Nachteile dieser Methodik sind der fehlende Selektionsschritt für den gesuchten Keim *E. sakazakii* innerhalb der *Enterobacteriaceae*-Spezies und der enorme Zeit- und Materialaufwand. Diese Methode wurde bereits in den Arbeiten von MUYTJENS *et al.* (1988) sowie NAZAROWEC-WHITE und FARBER (1997b) vorgestellt. Mit dem Unterschied zur FDA-Methode wurde zur Rehydrierung der Milchmahlzeit in gepuffertem Peptonwasser angereichert und 1 ml der angereicherten Probe mit VRBG-Agar ausplattiert. Eine Subkultivierung erfolgte auf TSA, Blutagar und Eosin Methylene Blue Agar (acc. Levine).

In der Methode zur Isolierung und Identifizierung von *E. sakazakii* aus Umfeldproben (GUILLAUME-GENTIL *et al.*, 2005) werden die wenigen physiologischen Besonderheiten dieser Spezies wie die signifikante  $\alpha$ -Glucosidase-Reaktion und die Vermehrung bei einer spezifischen Temperatur von 45°C zu Nutzen gemacht. Auf diese Methode stützt sich auch die erst kürzlich verabschiedete ISO/TS 22964 (2006) zur Isolierung von *E. sakazakii* aus Trockenmilchprodukten. Ein wesentlicher Unterschied liegt in der herabgesetzten Inkubationstemperatur der Selektivanreicherung von 45°C auf 44°C und dem Zusatz von chromogenen Nährmedien auf Grundlage der  $\alpha$ -Glucosidase-Aktivität zur Isolierung und Bestätigung.

#### **2.4.2.2 Differenzierung auf selektiven chromogenen Nährmedien**

Neu entwickelte, kommerziell erhältliche chromogene Nachweismedien, die auf einer  $\alpha$ -Glucosidase-Reaktion beruhen, kommen vermehrt als primäres Selektionsmerkmal zum Einsatz. Ein kürzlich entwickelter chromogener Agar von Druggan-Forsythe-Iversen (DFI) nutzt die Indolylverbindung 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\alpha$ -D-glucopyranosid (X- $\alpha$ Glc) als

Indikator. Die oben genannte Verbindung X- $\alpha$ Glc wird durch das Enzym  $\alpha$ -Glucosidase hydrolysiert und setzt 5-Bromo-4-chloro-Indolol frei. Dieses bildet in Anwesenheit von Sauerstoff den Farbstoff Bromochloroindigo, was eine Blaugrünfärbung der Kolonien zur Folge hat und somit den Nachweis von *E. sakazakii* erbringt. Neben diesem Substrat ist zusätzlich ein Hydrogensulfid-Indikator (NaCl-Thiosulfat und Ammonium-Eisen-Citrat) im Nährmedium enthalten, um Organismen mit schwacher  $\alpha$ -Glucosidase-aktivität und H<sub>2</sub>S positive Organismen wie *Proteus vulgaris* von *E. sakazakii* differenzieren zu können. Natrium-Deoxycholat dient als Hemmfaktor für das Wachstum gram-positiver Bakterien (IVERSEN *et al.* 2004a). Auf demselben Prinzip beruhend entwickelte zuvor die Firma AES (2005) den *E. sakazakii* Isolation Agar (ESIA).

Das *E. sakazakii* chromogene Medium (ESPM), entwickelt von RESTAINO (2005), enthält die chromogenen Substrate X- $\alpha$ -D-Glycopyranosid und X- $\beta$ -D-Cellobiosid, die *E. sakazakii* - Kolonien blau-schwarz exprimieren, und nutzt D-Arabitol, Sorbitol und Adonitol als Kohlenstoffquellen.

SONG *et al.* (2005) entwickelten ein selektives Medium zum gezielten Nachweis von *E. sakazakii*, welches die  $\alpha$ -Glucosidase und zusätzlich das Ferrioxamin E als wachstumsfördernde Substanzen enthält. OH und KANG (2004) entwickelten ein selektives Nachweismedium (OK) auf Basis des fluoreszierenden Substrates 4-Methyl-umbelliferyl- $\alpha$ -D-glucopyranosid (4- $\alpha$ -MUG). Auf Basis des gleichen Fluorogen beruht auch der Nachweis von *E. sakazakii* mit dem nicht-selektiven Differenzierungsmedium (LB) von LEUSCHNER und BEW (2004).

### 2.4.2.3 Biotypisierung

Die Untersuchung von biochemischen Stoffwechsellleistungen dient primär der Charakterisierung der Bakterienstämme auf Genus- und Speziesebene. Die Unterteilung in so genannte Biotypen aufgrund des biochemischen Profils ist nur bedingt möglich (WICHELHAUS *et al.*, 2000). Der Vorteil dieser Methode ist, dass für die biochemische Identifizierung und Differenzierung der einzelnen Stämme mit kommerziellen Identifikationssystemen wie dem API-20E bzw. API-32E System von bioMérieux ein biochemisches Profil bereits bei der Routineidentifizierung automatisch erzeugt werden kann (FARMER *et al.*, 1980; NAZAROWEC-WHITE und FARBER, 1999a; KANDHAI *et al.*, 2004b).

FARMER *et al.* (1980) unterteilten erstmals 57 *E. sakazakii* - Kulturen in 15 verschiedene Biotypen, von denen bis zu 24 % der untersuchten Kulturen dem Biotyp 1 des Referenzstammes *E. sakazakii* ATCC 29544 entsprachen (Tab. 6). In weiteren

Untersuchungen von NAZAROWEC-WHITE und FARBER (1999a) konnten 18 *E. sakazakii*-Kulturen in drei Gruppen unterteilt werden, wobei 33 % der Kulturen Inositol negative (Biotyp 2) und 16% Voges-Proskauer positive (Biotyp 3) Reaktionen aufzeigten.

**Tabelle 6:** Einteilung der Biotypen nach biochemischen Eigenschaften (Farmer *et al.*, 1980)

Biotyp	Inositol <sup>a</sup>	Beweglichkeit	Ornithin decarboxylase	Malonat	Indol	Gas <sup>a</sup>	Nitrit	Dulcitol	Methylrot <sup>a</sup>	VP <sup>b</sup>	$\alpha$ -MG <sup>c</sup>
1	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+
2	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+
3	+	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+
4	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+
5	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+
6	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+
7	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+
8	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+
9	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+
10	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+
11	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+
12	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
13	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+
14	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+
15	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-

<sup>a</sup> Gasproduktion von D-Glucose, Inositol, Methylrot-Test nach 48 h

<sup>b</sup> VP Voges-Proskauer

<sup>c</sup>  $\alpha$ -Methylglucoside

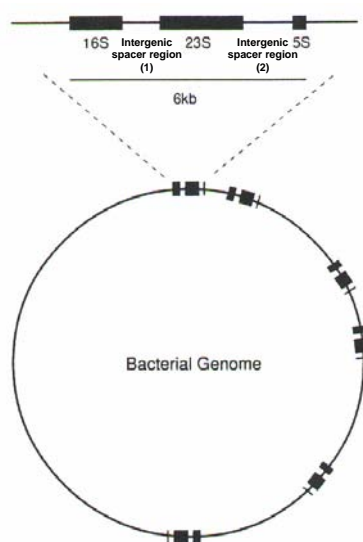
#### 2.4.2.4 Molekularbiologische Typisierungs- und Nachweisverfahren

Die Grundlage für eine effektive Behandlung von Patienten ist die schnelle Diagnose der Erkrankung und ihrer Ursachen. Eine Rückverfolgung von Infektionsursachen und Kontaminationsquellen bietet die Typisierung der Bakterien. Phänotypische Methoden beruhen auf der Ausbildung bestimmter phänotypischer Eigenschaften der Bakterien. Der Nachteil der phänotypischen Methoden liegt in der häufig variablen Ausbildung dieser Eigenschaften. Durch Modifikationen der bakteriellen Wachstumsbedingungen wie Temperatur, Medienzusätze oder pH-Wert können Änderungen in der Genexpression und somit im Phänotyp auftreten (WICHELHAUS *et al.*, 2000). Im Gegensatz dazu bieten die gängigsten molekulardiagnostischen Typisierungsmethoden in der Lebensmittelmikrobiologie basierend auf der DNA wie die Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE), das Ribotyping und auf der PCR basierende Methoden wie Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) (FARBER, 1996) erhebliche Vorzüge gegenüber den klassischen Analysen. Die Vorteile liegen vor allem in der Unabhängigkeit von Wachstumsbedingungen.

NAZAROWEC-WHITE und FARBER (1999a) ordneten anhand des Diskriminierungsindex PFGE und RAPD als beste Typisierungsverfahren für *E. sakazakii* ein, gefolgt von Ribotyping und den phänotypischen Typisierungsverfahren Biotyping und Antibiogramm. Demgemäß erlauben genotypische Methoden eine Analyse der genomischen Struktur und zeigen ein hohes Diskriminierungspotenzial bezüglich der Differenzierung von *E. sakazakii* auf. Neueste Untersuchungen zeigen, dass *E. sakazakii* genotypisch sehr heterogen und folglich unzureichend definiert ist (IVERSEN *et al.*, 2004d, LEHNER *et al.*, 2004).

#### 2.4.2.4.1 Polymerasenkettenreaktion (PCR)

Bisherige quantitative Nachweisverfahren für *E. sakazakii* basieren auf morphologischer und biochemischer Charakterisierung (FDA, 2002; KANDHAI *et al.*, 2004; GUILLAUME-GENTIL *et al.*, 2005). Die Polymerasenkettenreaktion (PCR) hingegen basiert auf einem enzymabhängigen Verfahren zur Vervielfältigung bestimmter Gen-Sequenzen innerhalb einer vorliegenden DNA-Kette (MULLIS *et al.*, 1987). Das Operon für die ribosomale RNA, bestehend aus der 16S RNA und einer *intergenic spacer*-Region (1) sowie aus der 23S RNA und der *intergenic spacer*-Region (2) und der 5S RNA (Abb. 3), kann zur Identifizierung oder Typisierung von Bakterien genutzt werden. Die Länge und Größe dieser Gene sowie deren Sequenzen sind bei den Bakterien hoch konserviert (LIAO, 2000). In phylogenetischen Studien fand die Sequenzierung des 16S rRNA-Gens bisher häufigeren Einsatz als das 23S- und 5S-Gen und ist somit als Standardmethode zur Identifizierung von Bakterien etabliert.



**Abbildung 3:** Schematische Darstellung der ribosomalen RNA mit ungefährender Position der Gene, welche die 16S, 23S, und 5S rRNA kodieren (oben), sowie eine beispielhafte Darstellung eines bakteriellen Genoms mit 6 verteilten ribosomalen RNA-Operons (unten) (nach JORDAN, 1998).

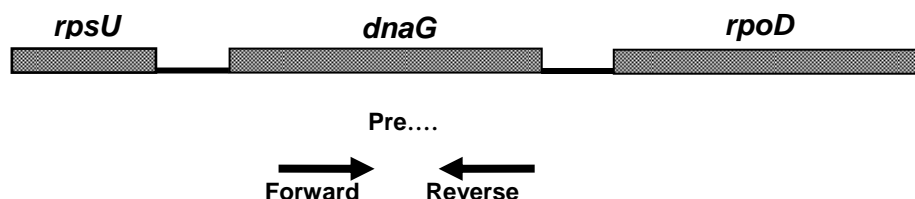
Die PCR-Methode wird als alternative bzw. ergänzende Methode zum Nachweis von *E. sakazakii* und verwandten Spezies genutzt (SEO und BRACKETT, 2005). Verschiedene PCR-Systeme auf Basis des 16S rRNA-Gens ermöglichen einen spezifischen Nachweis von *E. sakazakii*-Isolaten (Tab. 7).

Das BAX<sup>®</sup> Detection System ist ein weiteres Nachweisverfahren für *E. sakazakii*. Diese automatisierte PCR BAX<sup>®</sup>-Methode (Du Pont Qualicon / Oxoid, Deutschland) mit integrierter Detektionseinheit soll die bisherigen Analysewege zeitlich wesentlich verkürzen und dabei gleichwertig in der Nachweisqualität sein. Laut Hersteller ermöglicht die Sensitivität nach der Anreicherungskultur den Nachweis von 1-5 Kolonie bildende Einheit(en) (KbE) aus 25 g Untersuchungsmaterial.

**Tabelle 7:** Übersicht über Oligonukleotidprimerpaare zur Amplifikation der 16S rRNA von *E. sakazakii*

Gen/ PCR	Oligonukleotidprimer: Sequenz (5' - 3') <sup>1</sup>	PCR-Programm	Größe Amplifikat (Bp)	Referenz
16S rRNA	Esak3: CTAATACCGCATAACGTCTACG	35x: 95°C-35s, 61°C-60s, 72°C-60s	900	KEYSER <i>et al.</i> (2003)
	Esak2: CCCGCATCTCTGCAGGATTCTC			
16S rRNA	Esakf: CTYTGCTGACGAGTGGCGG	30x: 94°C-30s , 64°C-64s, 72°C-90s	929	LEHNER <i>et al.</i> (2004)
	Esakr: TCTCTGCAGGATTCTCTGG			

Die *realtime* PCR (qPCR) auf Basis eines von HOLLAND *et al.* (1991) entwickelten 5'-Nuclease PCR-Assays unter Ausnutzung der 5'-Exonukleaseaktivität der Taq DNA-Polymerase und Einbeziehung von fluorogenen Sonden zur Detektion der Amplifikation (LEE *et al.*, 1993) bietet einen schnellen, quantitativen Nachweis von Pathogenen in Lebensmitteln an (SEO *et al.*, 2004). Für den Nachweis von *E. sakazakii* sind qPCR-Methoden auf Basis des "makromolekular synthesis operon" (MMS)-Gens entwickelt worden, die hier nur in einer Übersicht erwähnt sein sollen (Tab.8). Das MMS-Operon besteht aus drei essenziellen Genen (*rpsU*, *dnaG*, *rpoD*), deren Produkte (S21, primase, sigma-70) notwendig für den Ablauf der Protein-, DNA- und RNA-Synthese sind. Mit einer PCR Amplifikation durch komplementäre Primer zu der konservierten Region innerhalb dieser drei Gene und einer anschließenden Sequenzierung des Produktes des *rpsU-dnaG*-Gens konnten alle drei Gene in 11 gramnegativen Spezies fortlaufend nachgewiesen werden (VERSALOVIC *et al.*, 1993).



**Abbildung 4:** Schematische Darstellung des *rpsU-dnaG-rpoD* MMS Operon (nach VERSALOVIC *et al.*, 1993)

Die qPCR Methoden erwiesen sich als hochsensitiv für den Nachweis und die Quantifizierung geringer Mengen an *E. sakazakii* in Säuglingsnahrung auf Trockenmilchbasis mit Nachweisgrenzen von 100 cfu/ml bis zu 1,1 cfu/100g Säuglingsnahrung (LIU *et al.*, 2005; SEO und BRACKETT, 2005).

**Tabelle 8:** Übersicht über Oligonukleotidprimerpaare zur Amplifikation des MMS-Gen-Abschnittes *dnaG*-Gen von *E. sakazakii*

Gen/Probe	Oligonukleotidprimer: Sequenz (5' - 3') <sup>1</sup>	<i>DnaG</i> Location	Referenz
MMS Forward	5'GGG ATA TTG TCC CCT GAA ACA G-3'	201-222	SEO und BRACKETT (2005)
MMS Reverse	5'CGA GAA TAA GCC GCG CAT T-3'	278-260	
MMS Taqman Probe	6FAM-AGA GTA GTA GTT GTA GAG GCC GTG CTT CCG AAG-TAMRA	225-258	
MMS Forward	5'CCA AAG CTT CCG CAG TGA A-3'	119-137	HEUVELINK <i>et al.</i> (2004)
MMS Reverse	5'CAA TAT CCC CTG AGG AAT TAG TAC AGA-3'	209-183	
MMS Taqman Probe	6FAM- CGT CAC GCG AAG AAA CTG GCT CG-TAMRA	139-161	
MMS Forward	5'CCG GGA ACA AGC TGA AAA TTG A-3'	k .A.	LIU <i>et al.</i> (2005)
MMS Reverse	5'TCT TCG GCT GCG AGT TTG-3'	k. A.	
MMS Taqman Probe	6FAM-ACT CTG ACA CAC CGC GCA TTC CTG- TAMRA	k. A.	
MMS Forward	5'CAA GTC GAA CGG TAA CAG GG-3'	26-45	MALORNY und WAGNER (2005)
MMS Reverse	5'GTC CCC CAC TTT GGT CCG-3'	157-174	
MMS Taqman Probe	6FAM-TGC TGC TCT GCT GAC GAG TGG C-DarkQuencher	53-74	

<sup>1</sup>FAM, 6-carboxyfluorescein (reporter dye); TMR, TAMRA, 6-carboxytetramethylrhodamine (quencher dye)  
k. A. keine Angaben

#### 2.4.2.4.2 Pulsfeld Gelelektrophorese (PFGE)

Die Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) wird zur spezifischen Differenzierung bei epidemiologischen Fragestellungen eingesetzt (SCHWARTZ und CANTOR, 1984; McCLELLAND *et al.*, 1987; LAI *et al.*, 1989; GOEHRING und DUENSING, 1990; GROTHUES und TÜMMLER, 1991; GOUBY *et al.*, 1992; TOMAYKO und MURRAY, 1995). Die PFGE beruht auf der Spaltung der chromosomalen DNA durch selten schneidende Restriktionsendonukleasen und der Auftrennung der entstandenen Fragmente im elektrischen Wechselfeld (SCHWARTZ *et al.*, 1982). Dabei ergeben sich definierte, stammspezifische Bandenmuster („Fingerprints“). Der Vergleich von diesen Fragmentlängenmustern verschiedener Isolate ermöglicht die Identifizierung verwandter Stämme und die Bestimmung des klonalen Ursprungs einer Spezies (MURRAY *et al.*, 1990; EISENACH, 1992; RÖMLING *et al.*, 1995). Dadurch lassen sich beispielsweise Infektionsketten im Krankenhaus oder auch Lebensmittelinfektionen nachweisen.

Die PFGE ist ein geeignetes Typisierungsverfahren zur Differenzierung von *E. sakazakii* und zeichnet sich durch ihr hohes diskriminatorisches Potenzial und gute Reproduzierbarkeit aus (NAZAROWEC-WHITE und FARBER, 1999a). In Untersuchungen von NAZAROWEC-WHITE und FARBER (1999a) zeigten alle 18 *E. sakazakii* - Isolate bei der Anwendung der Restriktionsendonuclease *Xba*I ein unterschiedliches Restriktionsmuster.

#### 2.4.2.4.3 Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

Eine von WILLIAMS *et al.* (1990) und WELSH und McCLELLAND (1990) entwickelte auf PCR basierende Fingerprinttechnik zur Typisierung einer Vielzahl an Bakterien ist die Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Analyse. Diese Methode basiert auf der „zufälligen“ Amplifikation von DNA (RAPD) durch den Einsatz eines willkürlich gewählten kurzen Oligonukleotidprimers, dessen Sequenz nicht spezifisch gegen ein bekanntes Target-Gen gerichtet ist und somit „zufällig“ an verschiedene Bereiche im Genom hybridisieren kann. Die erzeugten Bandenmuster oder DNA-Fingerprints unterscheiden sich entsprechend dem Grad der Verwandtschaft der untersuchten Stämme (SCHMITZ *et al.*, 1998; TYLER *et al.*, 1997). Diese Fingerprint-Methode kam weitestgehend in phylogenetischen Analysen (KURATA, *et al.*, 1994), epidemiologischen Studien (CHEN und CHEN, 1995) und in der molekularen Typisierung verschiedener Mikroorganismen (DEBAST *et al.*, 1995; MONNA *et al.*, 1995; YAMAMOTO *et al.*, 1995) zur Anwendung. Obwohl in einigen Studien die Reproduzierbarkeit dieser Methode als schlecht eingestuft wird, ist diese bei optimierten PCR-Konditionen zuverlässig (BENTER *et al.*, 1995) und kann möglicherweise als Screening

für genetische Ähnlichkeiten bzw. Differenzen im ganzen Genom eingesetzt werden (LEELAYUWAT *et al.*, 2000).

#### **2.4.2.4.4 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH)**

Aufgrund der Entwicklung molekularbiologischer Methoden zur Spezies-spezifischen Identifizierung von bakteriellem Genmaterial werden die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und die *in-situ*-Hybridisierung unterschieden. Diese letztere Methode liefert ein besseres Verständnis zur bakteriellen Diversität (FRANKE-WHITTLE *et al.*, 2005; BARRA CARACCILO *et al.*, 2005). *In-situ*-Hybridisierung wurde ursprünglich für die Untersuchung von Gewebe entwickelt (PARDUE und GALL, 1969; JOHN *et al.*, 1969). Zu einem späteren Zeitpunkt wurde diese Methode auf Untersuchungen von Bakterien übertragen (GIOVANNONI *et al.*, 1988) und wurde durch den Zusatz von Fluoreszenzfarbstoffen ergänzt (AMMAN *et al.*, 1990). Die Fluoreszenz *in-situ*-Hybridisierung (FISH) hat sich als schnelle und zuverlässige Methode zum Nachweis von Bakterien und Hefen bewährt (KEMPF *et al.*, 2005). FISH basiert auf der Basenpaarung von markierten einzelsträngigen DNA-Sonden mit ihren komplementären rRNA-Zielsequenzen in den Ribosomen von Mikroorganismen oder Gewebezellen (DELONG *et al.*, 1989; AMANN, 1995).

Diese Methode stellt, in Kombination mit konventionellen anreicherungsabhängigen Methoden die Möglichkeit einer schnellen Identifizierung bereit (SCHWEICKERT *et al.*, 2004) und ist insbesondere für klinische Laboratorien und für den Nachweis von pathogenen Keimen von Wichtigkeit (RÜSSMANN *et al.*, 2001; WAAR *et al.*, 2005; VISCIDI und YOLKEN, 1987). In Untersuchungen von Lebensmitteln kam diese Methode ebenfalls zur Anwendung (FANG, 2002). KITAGUCHI *et al.* (2005) konnten mit Anwendung von FISH *Enterobacteriaceae* und *Pseudomonas* spp. innerhalb von 3 h quantifizieren. Ähnliche Methoden wurden zur Bestimmung von *Enterobacteriaceae* in Wasserproben (BAUDART *et al.*, 2005), von Umfeldkeimen (PERNTHALER und PERNTHALER, 2005) und zum Nachweis von Bifidobakterien in Säuglingsstuhlproben (VLKOVA *et al.*, 2005) angewandt. LEHNER *et al.* (2006) bestätigten mit dem kommerziell erhältlichen Testsystem Vermicon Identification Technology (VIT) auf Basis der FISH-Technologie 75 verdächtige *E. sakazakii*-Isolate und 23 *Enterobacteriaceae* - Isolate ohne falsch-positive Ergebnisse.

### 2.4.2.5 Biofilmbildung

Ein Biofilm besteht aus an einer Grenzfläche adhätierenden und von extrazellulären Polysacchariden (EPS) zusammengehaltenen Lebensgemeinschaft von einer oder mehreren Bakterien-Spezies (CHARACKLIS und MARSHALL, 1990; EHRLICH *et al.*, 2005). Bei vielen Bakterienspezies, einschließlich *Enterobacteriaceae*, ist nachweislich Nährstoffmangel der Hauptauslöser für die Biofilmbildung. So konnte beispielsweise für *Pseudomonas aeruginosa* gezeigt werden, dass bei einem zu geringen Angebot an Eisen eine effektive Bildung von Mikrokolonien gelingt (SINGH *et al.*, 2002; GERSTEL und RÖMLING 2001; JAMES *et al.*, 1995).

Im medizinischen Bereich stellen Biofilme von Enterobakterien auf Medizinprodukten wie Kathetern (ELLIOTT *et al.*, 1997), Kontaktlinsen (McLAUGHLIN-BORLACE *et al.*, 1998) und Zahnimplantaten (DARVEAU *et al.*, 1997) eine potenzielle Infektionsgefahr dar, aber auch von der Bildung von Biofilmen auf Gallensteinen durch *Salmonella* sp. wurde berichtet (PROUTY *et al.*, 2002). Ein wesentliches Problem stellen diese bakteriellen Biofilme ebenfalls in Lebensmittelverarbeitungs- bzw. Trinkwasseraufbereitungsanlagen dar. Bei einer Manifestierung in Leitungssystemen, Verpackungen und Transportcontainern sind diese selbst gegen Desinfektionsmittel oder Antibiotika widerstandsfähig (BLUM *et al.*, 1998; LE MAGREX-DEBAR *et al.*, 2000; PARK *et al.* 2001; RAMESH *et al.*, 2002)

*E. sakazakii* kann sich an die Oberflächen von Plastikgegenständen und Silikon anheften und sich zu einem Biofilm entwickeln. Enterale Sonden und Flaschensauger können den Erreger in einer großen Anzahl aufnehmen (ZOGAJ *et al.*, 2003). Die Biofilmbildung kann ebenso mit einer einhergehenden verringerten Empfindlichkeit gegenüber Antibiotika assoziiert werden (LEHNER *et al.*, 2005; IVERSEN *et al.*, 2004b).

IVERSEN *et al.* (2004b) konnten unter Anwendung der Impedanz-Technik und der Elektronenmikroskopie die Fähigkeit von *E. sakazakii*, einen Biofilm zu bilden sowie an verschiedenen Oberflächen wie Silikon, Latex, Polycarbonat-Fläschchen und Edelstahl zu adhätieren, nachweisen. Über die Zusammensetzung und Organisation von *E. sakazakii* Biofilmen ist wenig bekannt. Dennoch ist eine Biofilmbildung durch die Bildung von zähflüssigem verkapseltem Material an Gebrauchsgegenständen und Kontaktflächen ein erster Anhaltspunkt für eine mögliche Infektion mit *E. sakazakii* (SCHEEPE-LEBERKÜHNE und WAGNER, 1986).

Verschiedene Komponenten wie Flagella, Fimbrien, Membranproteine, Curli und Extrazelluläre Polysaccharide sind an der Biofilmbildung beteiligt (PRATT und KOLTER, 1998).

Dünne aggregative Fimbrien (auch Curli-Fimbrien genannt) sind proteinöse Filamente, welche sich auf der Bakterienoberfläche befinden und in der äußeren Bakterienzellwand verankert sind (COLLINSON *et al.*, 1999). Demzufolge besteht die Funktion dieser Fimbrien in der Erzeugung von Zell-Zell- bzw. Zell-Oberflächen-Kontakten (COSTERTON *et al.*, 1987). Darüber hinaus binden dünne aggregative Fimbrien auch an anorganische und organische Oberflächen wie Glas und Polystyrol und tragen somit zur Biofilmbildung bei (RÖMLING *et al.*, 1998b).

Zellulose wurde mehrmals als eine der extrazellulären polymeren Substanzen in von *Enterobacteriaceae* gebildeten Biofilmen identifiziert (SOLANO *et al.*, 2002; ZOGAJ *et al.*, 2003). Die Bildung von Biofilmen und eine längere Haftung auf Gebrauchsgegenständen und Maschinenteilen, insbesondere unter osmotischen Stressbedingungen, lässt sich aufgrund der Fähigkeit des *E. sakazakii*, bei der Vermehrung Zellulose zu bilden, und durch den Besitz von Fimbrien leicht erklären.

Durch die Anwendung unterschiedlicher Methoden, wie z.B. Absorption von Farbstoffen (z.B. Kongorot (CR) und/oder Calcoflour (CF)), Anheftung an abiotische Grenzflächen kann die Fähigkeit der Bakterien zur Biofilmbildung getestet werden (ZOGAJ *et al.*, 2003; LEHNER *et al.*, 2005). Der Farbstoff Kongorot (CR) kann ein Hinweis auf eine Produktion der extrazellulären Matrix-Komponente Curli-Fimbrien sein (RÖMLING *et al.* 1998a).

### 3 EIGENE UNTERSUCHUNGEN

#### 3.1 MATERIAL UND METHODEN

##### 3.1.1 Bakterienstämme

In der vorliegenden Arbeit wurden 316 *Enterobacter sakazakii* und 73 *Enterobacteriaceae* Isolate, aus Trockenmilchprodukten und dem Produktionsumfeld isoliert, untersucht (Übersicht siehe Anhang). Die Isolierung der Stämme erfolgte zwischen 2003 und 2006. Alle Isolate stammen aus der Numico Culture Collection (NCC). Es wurden weiterhin Referenzstämme mit Unterschieden in der Herkunft eingesetzt (Tab. 9):

**Tabellle 9:** Übersicht über die Referenzstämme aus verschiedenen Stammsammlungen

Spezies		Referenzstammsammlung
<i>E. sakazakii</i>	ATCC 29544	American Type Culture Collection, LGC Promochem, Wesel, (D)
<i>E. sakazakii</i>	ATCC 12868	American Type Culture Collection, LGC Promochem, Wesel, (D)
<i>E. sakazakii</i>	ATCC 15329	American Type Culture Collection, LGC Promochem, Wesel, (D)
<i>E. sakazakii</i>	ATCC 29004	American Type Culture Collection, LGC Promochem, Wesel, (D)
<i>E. sakazakii</i>	LMG 2759	Laboratorium für Mikrobiologie, Universität Gent, (B)
<i>E. sakazakii</i>	LMG 2758	Laboratorium für Mikrobiologie, Universität Gent, (B)
<i>E. sakazakii</i>	LMG 2760	Laboratorium für Mikrobiologie, Universität Gent, (B)
<i>E. sakazakii</i>	LMG 2762	Laboratorium für Mikrobiologie, Universität Gent, (B)
<i>E. sakazakii</i>	LMG 2766	Laboratorium für Mikrobiologie, Universität Gent, (B)
<i>E. sakazakii</i>	NCTC 8155	National Collection of Type Cultures, Salisbury, (UK)
<i>E. asburiae</i>	ATCC 35953	American Type Culture Collection, LGC Promochem, Wesel, (D)
<i>E. cancerogenes</i>	ATCC 33241	American Type Culture Collection, LGC Promochem, Wesel, (D)
<i>E. amnigenus</i>	ATCC 33072	American Type Culture Collection, LGC Promochem, Wesel, (D)
<i>E. nimipessuralis</i>	ATCC 9912	American Type Culture Collection, LGC Promochem, Wesel, (D)
<i>S. thyphimurium</i>	ATCC 19585	American Type Culture Collection, LGC Promochem, Wesel, (D)
<i>E. kobei</i>	ATCC BAA-260	American Type Culture Collection, LGC Promochem, Wesel, (D)
<i>E. gerogoviae</i>	ATCC 33028	American Type Culture Collection, LGC Promochem, Wesel, (D)
<i>E. intermedius</i>	ATCC 33110	American Type Culture Collection, LGC Promochem, Wesel, (D)
<i>E. hormachi</i>	ATCC 49162	American Type Culture Collection, LGC Promochem, Wesel, (D)
<i>E. pyrinus</i>	ATCC 49851	American Type Culture Collection, LGC Promochem, Wesel, (D)
<i>E. dissolvens</i>	ATCC 23373	American Type Culture Collection, LGC Promochem, Wesel, (D)
<i>Pantoea agglomerans</i>	DSM 3493	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, (D)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	DSM 5176	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, (D)
<i>E. aerogenes</i>	DSM 30053	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, (D)
<i>Citrobacter diversus</i>	CCFRA 7119	Campden and Chorleywood Food Research Association Group, Gloucestershire, (UK)
<i>Citrobacter freundii</i>	ATCC 8090	American Type Culture Collection, LGC Promochem, Wesel, (D)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	ATCC 43086	American Type Culture Collection, LGC Promochem, Wesel, (D)
<i>K. pneumoniae</i>	ATCC 13883	American Type Culture Collection, LGC Promochem, Wesel, (D)
<i>E. aerogenes</i>	NCTC 10006	National Collection of Type Cultures, Salisbury, (UK)

D-Deutschland; B-Belgien; UK- Großbritannien

Alle in dieser Arbeit verwendeten *E. sakazakii*- und Enterobakterien-Stämme sind in Kryoröhrchen (Technical Service Consultants Limited, UK) bei -80°C gelagert worden. Bei sämtlichen Fragestellungen wurde darauf zurückgegriffen.

### 3.1.2 Nährmedien

#### 3.1.2.1 Nährbouillon/-agar

Medium/Zusammensetzung	Hersteller	Artikelnummer
Peptonwasser gepuffert (BPW)	Merck, Darmstadt, (D)	1.07228.5000
Brain Heart Infusion (BHI)	Oxoid, Wesel, (D)	CM225
Trypton Soya Broth (TSB)	Merck, Darmstadt, (D)	1.05459.0500
Enterobacteriaceen-Anreicherungs- bouillon nach MOSSEL (EEB)	Merck, Darmstadt, (D)	1.05394.0500
Lauryl Sulfate Tryptose Broth (LST)	Merck, Darmstadt, (D)	1.10266.0500
Modifizierte Laurylsulfat Tryptose Broth (mLST)		
zusätzlich 29,0 g NaCl/l	Merck, Darmstadt, (D)	1.06404.1000
und 10 µg Vancomycin/ml	Sigma, Osterode am Harz, (D)	94747
Trypton Soya Agar (TSA)	Merck, Darmstadt, (D)	1.05458.0500
Plate Count Agar (PCA)	Merck, Darmstadt, (D)	1.05463.0500
Columbia Blutagar (CB)	BioRad, (D)	63954
Müller-Hinton Agar	Oxoid, Wesel, (D)	CM337
Violet Red Bile Glucose Agar (VRBG)	Merck, Darmstadt, (D)	1.10275.0500
Simmons Citrat Agar (SC)	Merck, Darmstadt, (D)	1.02501.0500
Mac Conkey Agar Nr.3	Oxoid, Wesel, (D)	CM115
Sorbit- Mac Conkey Agar	Oxoid, Wesel, (D)	CM813

Medium/Zusammensetzung	Hersteller	Artikelnummer
<i>Enterobacter sakazakii</i> Isolation Agar (ESIA)	AES Laboratories, (F)	AEB520010
Chromogenic <i>Enterobacter sakazakii</i> Agar (DFI)	Oxoid, Wesel, (D)	CM1055
TSA + $\alpha$ -MUG (in Anlehnung an LEUSCHNER <i>et al.</i> , 2004, OH & KANG, 2005)		
Zusatz von: 2,5 ml $\alpha$ -MUG Lösung (20mg/ml, gelöst in Aqua dest.)	Sigma, Osterode am Harz, (D)	M9766
<i>Enterobacter sakazakii</i> Chromogenic Plating Medium (ESPM)	R&F Laboratories, Illinois, (USA)	C-0562
Supplemente für ESPM:		
Sodium Cefsulodin Hydrate (1,0 %w/v)	Sigma, Osterode am Harz, (D)	C8145
Vancomycin Hydrochlorid (0,8 % w/v)	Sigma, Osterode am Harz, (D)	V2002
Tween <sup>TM</sup> 80 Nährboden: nach ALDOVA und POSTUVA (1983)		
Blood Agar Base No.2	40 g Oxoid, Wesel, (D)	CM271
CaCl <sub>2</sub> (10%ig)	10 ml Merck, Darmstadt, (D)	102382
Tween <sup>TM</sup> 80	5 ml Merck, Darmstadt, (D)	8.22187.2500
Aqua dest.	1000 ml	
pH 7,3 $\pm$ 0,2		
Luria-Bertani Agar o. Salz (LB)		
Trypton	10 g Oxoid, Wesel, (D)	L42
Hefeextrakt	5 g Merck, Darmstadt, (D)	1.03753.0500
Blood Agar Base 2.0	15 g Oxoid, Wesel, (D)	CM271
Aqua dest.	1000 ml	
LB-Medium ohne Salz		
Trypton	10 g Oxoid, Wesel, (D)	L42
Hefeextrakt	5 g Merck, Darmstadt, (D)	1.03753.0500
Aqua dest.	1000 ml	
Kongorot-Lösung		
Kongorot (CR)	2 mg/ml Sigma, Osterode am Harz, (D)	C6767
Brilliant-Blue-G	1 mg/ml Sigma, Osterode am Harz, (D)	B1131
beides zusammen gelöst in 70 % Ethanol		

Medium/Zusammensetzung	Hersteller	Artikelnummer
Kongorot (CR)- Agarplatten		
LB-Agar ohne Salz	500 ml siehe oben (s.o.)	s.o.
Kongorot-Lösung	10 ml s.o.	s.o.
Calcofluor (CF)- Agarplatten		
LB-Agar ohne Salz	500 ml s.o.	s.o.
50 mM Calcofluor	0,5 ml s.o.	s.o.

### 3.1.2.2 Reagenzien und Medien

Medium/Zusammensetzung	Hersteller	Artikelnummer
<b>0,85% Peptone Salt Solution (PSS)</b>		
NaCl	8,5g Merck, Darmstadt, (D)	1.06404.1000
Pepton	2g Oxoid, Wesel, (D)	LP0037
Aqua dest.	1000 ml	
<b>TE-Puffer</b>		
Tris-HCl (10 mmol/l) 1,21 g		
EDTA (1 mmol/L) 372,5 mg		
Aqua dest. 1000 ml		
pH 7,6		
<b>Ferrioxamin E-Lösung (Dolder® FOX)</b>	Dolder AG, Basel, (CH)	
<u>Stammlösung:</u>		
20 mg Ferrioxamin E in 20 ml sterilem aqua dest. gelöst		
<u>Gebrauchslösung:</u>		
1 ml der Stammlösung in 9 ml sterilem aqua dest. verdünnt (1:10 Verdünnung)		
Die Gebrauchslösung enthält in 1ml 100 µg Ferrioxamin E, welche für 1 l Anreicherungsmedium ausreicht (entspricht 100 ng Ferrioxamin E/ml).		
<u>Haltbarkeit:</u>		
Ferrioxamin E ist als Substanz trocken im Kühlschrank (2-8 °C) aufzubewahren. Sowohl Stamm- als auch Gebrauchslösung sind steril im Kühlschrank (2-8 °C) für mindestens 3 Monate haltbar.		

### 3.1.3 Bakterienmorphologie und biochemische Nachweisreaktionen

#### 3.1.3.1 Morphologie und Pigmentbildung

Die Anzucht der Bakterienkulturen erfolgte nach 3.2 (Nährmedien) in 50 ml Trypton Soya Broth (TSB) bei 30°C für 24 h. Daraufhin wurde eine Vereinzelnung der Bakterien auf Trypton Soya Agar (TSA) bei 30°C für 72 h durchgeführt. Das Ablesen der Intensität der Gelbfärbung (weiß, hellgelb, gelb) der Kolonien erfolgt jeweils nach 24 h, 48 h und 72 h; die Auswertung erfolgte visuell. Dies ermöglichte eine Aussage über die Bakterienmorphologie und im Weiteren über die Gelbpigmentierung der Kolonien.

#### 3.1.3.2 Bestätigungsreaktionen

##### Gramfärbung

(mit BD Gram Stain Kit, Becton & Dickinson GmbH, Heidelberg, D)

Ein hitzefixierter Ausstrich des zu prüfenden Bakterienstammes wurde eine Minute mit Kristallviolett-Lösung gefärbt, danach ein Minute mit Lugol'scher Lösung gebeizt und anschließend mit 96%igen Alkohol entfärbt. Daraufhin eine Minute mit Safranin gegen gefärbt, mit Leitungswasser abgespült und an der Luft getrocknet. Die Beurteilung und Auswertung der Färbung erfolgte unter einem Mikroskop (Leica DMLS, Wetzlar GmbH, Bensheim, D) bei 1000-facher Vergrößerung mit einem Immersionsöl-Objektiv. Gram-negative Bakterien färbten sich rot und grampositive Bakterien dunkelblau-violett. Die Farbbeurteilung erfolgte im Vergleich mit gramnegativen (*Escherichia coli* ATCC 25922) und grampositiven (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923) Referenzstämmen.

##### Oxidase - Test

Für den Oxidase-Nachweis wurden mit einer Öse eine bis zwei Kolonie(n) einer Frischkultur entnommen, auf einem Filterpapier verrieben und mit ein bis zwei Tropfen der Oxidase-Reagenz (bioMérieux® Deutschland GmbH, Nürtingen, D) benetzt. Eine Blaufärbung des Filterpapiers zeigte die Aktivität von Oxidase an. Fand kein Farbumschlag statt, wurde dies als negatives Ergebnis gewertet.

##### Katalase-Test

Ein Tropfen einer 3% igen  $H_2O_2$  - Lösung wurde auf ein Deckglas gegeben und Kulturmaterial mit einer Öse verrieben. Eine deutliche Gasbildung konnte als positiv gewertet werden.

### 3.1.3.3 Biochemische Nachweisreaktionen

#### 3.1.3.3.1 Alpha( $\alpha$ )-Glucosidase Aktivität

Die Aktivität der  $\alpha$ -Glucosidase ist ein geeignetes Unterscheidungsmerkmal zwischen *E. sakazakii* und anderen Enterobakterien. Der Nachweis der  $\alpha$ -Glucosidase erfolgte durch folgenden Test: 0,5 g des Substrates 4-Nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranosid (Sigma-Aldrich, Steinheim, D) wurden in 100 ml Pufferlösung (pH 7,0; Merck, Darmstadt, D) gelöst. Anschließend wurden 0,5 ml dieser Lösung und 0,5 ml NaCl (0,85%) in eine Küvette gegeben. Eine Einzelkolonie des zu prüfenden Bakterien-Isolates wurde in die Testlösung suspendiert und die Küvette mit Parafilm verschlossen. Nach einer Inkubationszeit von vier Stunden bei 37°C wurde der Farbumschlag notiert. Die Aktivität der  $\alpha$ -Glucosidase konnte durch einen gelben Farbumschlag Lösung nachgewiesen werden.

#### 3.1.3.3.2 Tween<sup>TM</sup> 80 – Esterase Aktivität

Zum Nachweis der Tween<sup>TM</sup> 80 - Esterase wurden die zu untersuchenden Bakterien nach 3.2 in 40 ml BHI für 24 h bei 37°C unter aeroben Bedingungen angezüchtet und auf dem Tween<sup>TM</sup> 80–Esterase Agar vereinzelt ausgestrichen. Während der Inkubation (48h bei 30°C und 24 h 37°C) kam es zur Hydrolyse des Tween<sup>TM</sup> 80 durch die Tween<sup>TM</sup> 80-Esterase, wobei eine positive Reaktion durch eine Trübung (Präzipitationshof) unter der Bakterienkultur im Nährboden zu bewerten war.

#### 3.1.3.3.3 Verwertung verschiedener Kohlenstoffquellen

Die zu untersuchende Kultur wurde auf dem Medium ausgestrichen und bei 30°C für 24 h inkubiert. Die verschiedenen Nährböden enthielten jeweils unterschiedliche Nährstoffquellen für die Bakterien. So stellte Mac Conkey No.3 Lactose, Mac Conkey Sorbitol und Simmons Citrat als Kohlenstoffquelle zur Verfügung. Die Nutzung der genannten Kohlenstoffquellen war durch einen Farbumschlag erkennbar mit den folgenden typischen Kennzeichen für *E. sakazakii* auf den entsprechenden Nährböden (Tab. 10):

**Tabelle 10:** Kennzeichen von *E. sakazakii* auf verschiedenen Nährmedien

Nährmedium	Kohlenstoffquelle	Kennzeichen
Mac Conkey No. 3	Lactose-Fermentierung	pink-violette Verfärbung der Kolonien
Sorbitol Mac Conkey	Sorbitol -Verwertung	keine Farbveränderung, normales Wachstum der gelben Kolonien
Simmons Citrate	Citrat -Verwertung	Farbumschlag des ursprünglich grünen Agars in dunkelblau

#### 3.1.3.3.4 Enzymaktivitäten

API ZYM (bioMérieux® Deutschland GmbH, Nürtingen, (D)) ist eine Mikromethode zum halbquantitativen Nachweis von Enzymaktivitäten. Es ermöglicht den schnellen und systematischen Nachweis von 19 Enzymen in sehr geringen Probenmengen. Es dient der Ermittlung des vorhandenen Spektrums an Enzymaktivität. Die Anzucht der Bakterienkulturen erfolgte nach 3.2 (Nährmedien) auf TSA bei 37°C für 24 h. Mit der Bakterienkultur wurden die Teststreifen nach Herstellerangaben beimpft, nach 4 h die Reagenzien Zym A und Zym B zugegeben und visuell abgelesen.

#### 3.1.3.4 Identifizierungssysteme

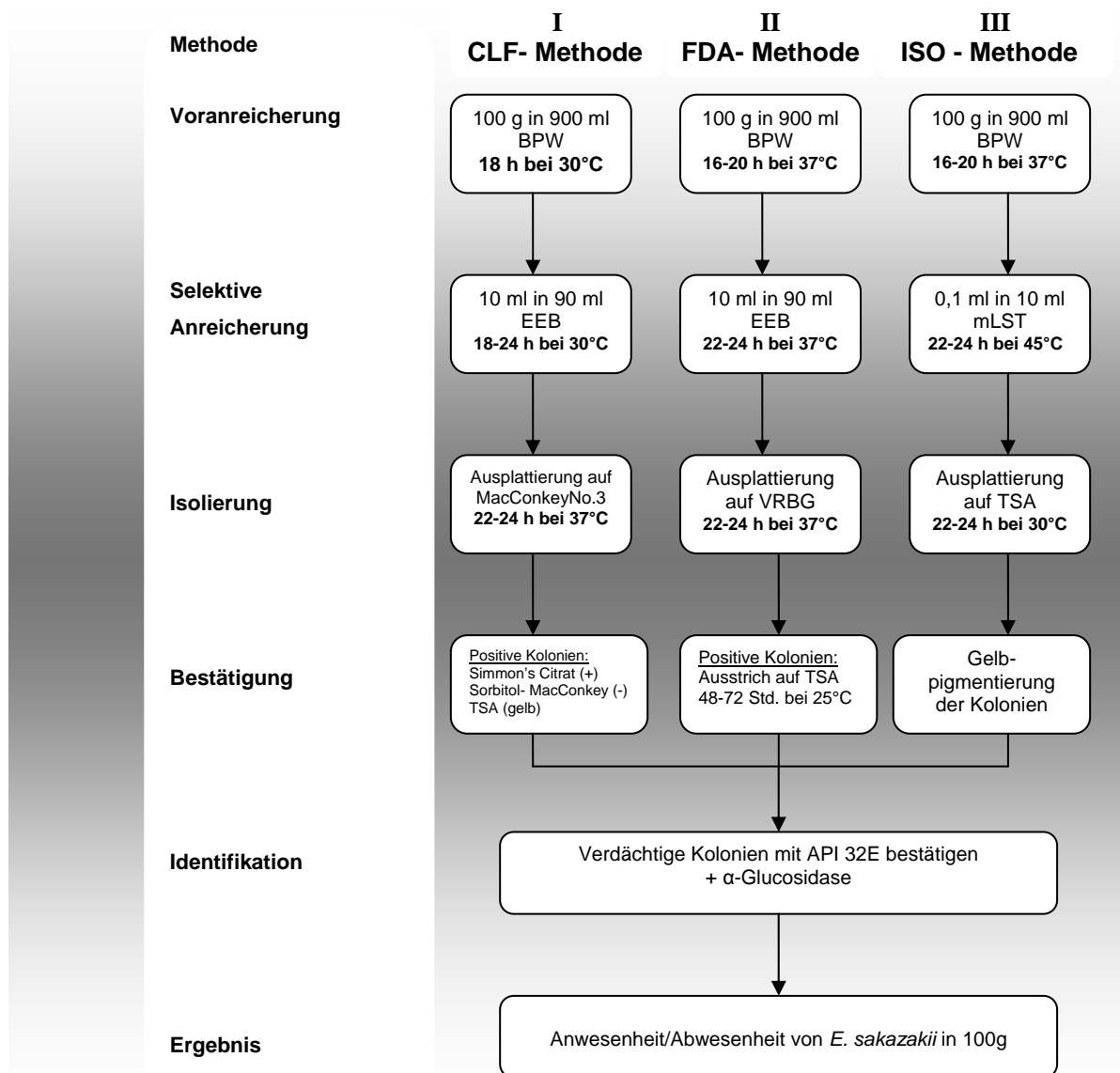
Eine Erstidentifizierung der Isolate erfolgte mit dem API ID 32E- bzw. ID 20E -System, einem standardisierten biochemischen Test der Firma bioMérieux® Deutschland GmbH (Nürtingen, (D)) zum Nachweis von Bakterien der Familie der *Enterobacteriaceae*. Der Teststreifen enthält 32 bzw. 20 biochemische Farb-Reaktionen, die dem Erstellen eines "biochemischen" Profils der untersuchten Mikroorganismen dienen. Die 32 bzw. 20 Substrate des ID 32 E/ID 20E erbringen Enzym- und Reaktionsnachweise. Die Anzucht der Bakterienkulturen erfolgte nach 3.2 (Nährmedien) auf TSA bei 37°C für 24 h. Mit der Bakterienkultur wurden nach Herstellerangaben die Teststreifen beimpft, nach 24 h visuell abgelesen und mit einer speziellen API-Software (V.2.0) ausgewertet. Eine Identifizierung mit dem BBLCrystal (Difco, Becton & Dickinson GmbH, Heidelberg, D)) erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die Auswertung der Farbreaktionen erfolgte visuell unter Zuhilfenahme eines Leuchtkastens.

#### 3.1.4 Konventionelle Identifizierung

Die konventionelle Identifizierung von Bakterienisolaten aus Milchpulver und Umfeldproben erfolgte im Wesentlichen nach den gängigen Methoden der CLF (Central Laboratories Friedrichsdorf), FDA (Food and Drug Administration) und ISO/TS 22964 (International Standard). Zur Beurteilung wurden in der vorliegenden Untersuchung morphologische und biochemische Eigenschaften herangezogen.

### 3.1.4.1 Klassisch Mikrobiologischer Nachweis

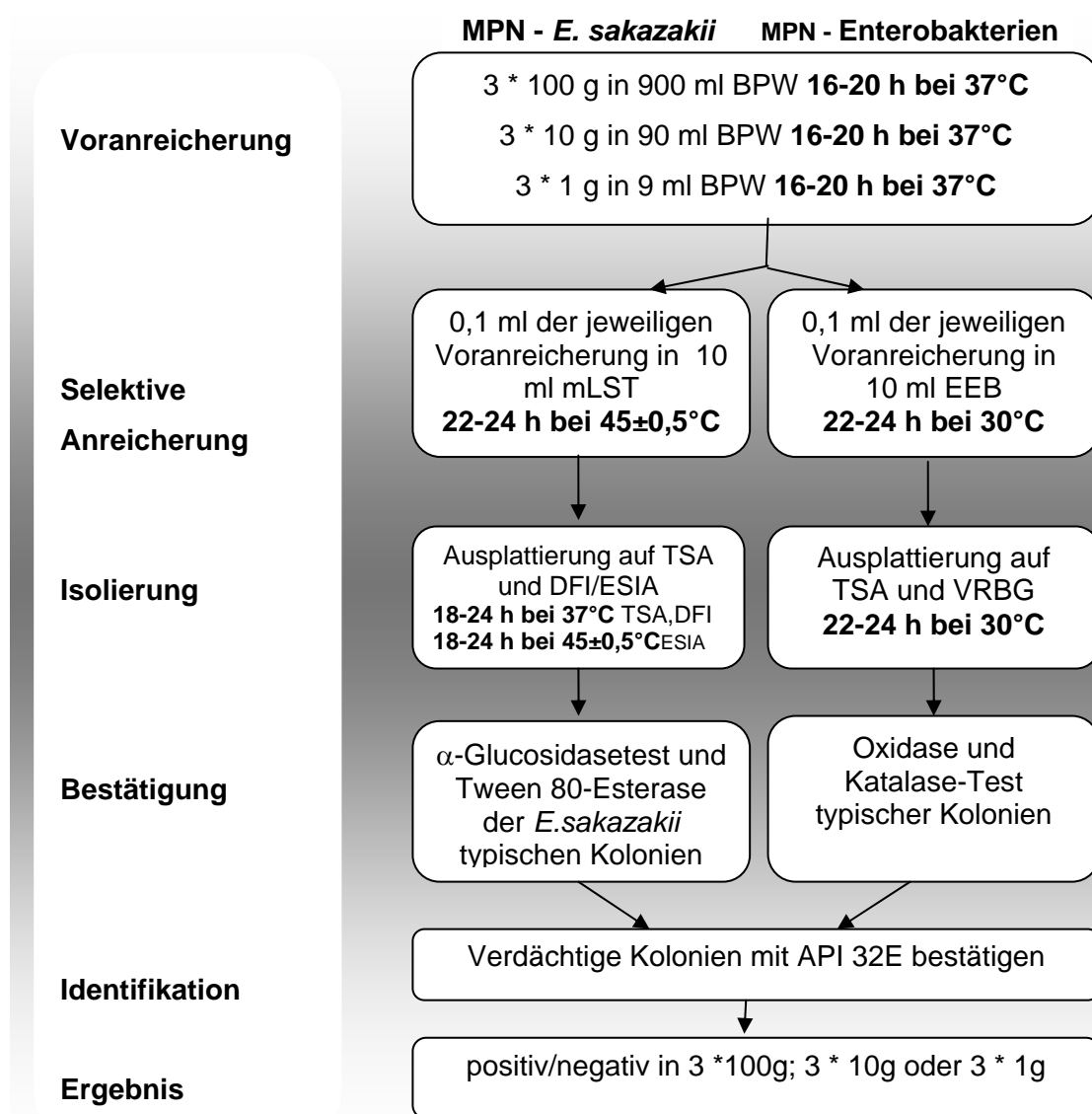
Die Isolierung aus Umfeldproben erfolgte durch die Entnahme mit in gepuffertem Peptonwasser getränkten Wattetupfern bzw. mit der Sodibox (Baumwolltuch zur Probenentnahme von einer 1 m<sup>2</sup> großen Fläche) (Artikel-Nr. 4107E, Nevez, Frankreich). Die Inkubation erfolgte in gepuffertem Peptonwasser (BPW) bei 37°C für 18-24 h. Ein Aliquot von 0,1 ml wurde in mLST überführt und für 22-24 h bei 45°C inkubiert und anschließend auf TSA isoliert und nach 3.3.2 bestätigt. Für die Isolierung aus Milchpulver wurden 100 g Milchpulver 1:10 in BPW angereichert. Die selektive Anreicherung und Isolierung erfolgten in der CLF-, FDA- und ISO/TS 22964 -Methode auf verschiedenen Selektivmedien wie in Abb. 5 angegeben. Das Ergebnis wird ausgedrückt als An- bzw. Abwesenheit von *E. sakazakii*/100 g.



**Abbildung 5:** Klassische mikrobiologische Methoden zum Nachweis von *Enterobacter sakazakii* in Säuglingsnahrung

### 3.1.4.2 Most Probable Number (MPN)

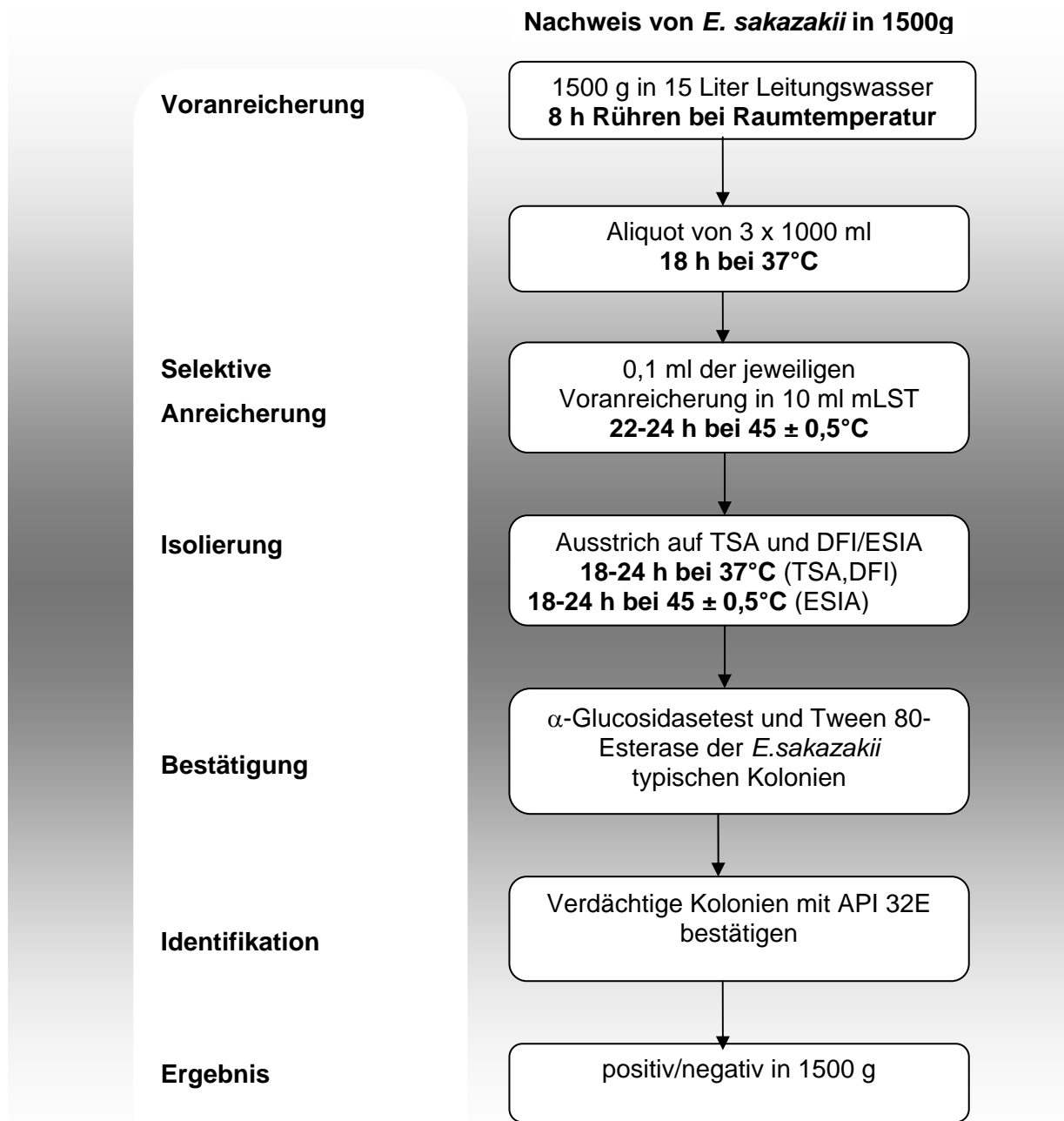
Zur Quantifizierung von Mikroorganismen wurde die Most Probable Number (MPN) Methode angewendet (§64 des Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuchs, 2006). Diese liefert durch mehrfachen Ansatz der Einwaagen (3 x 100 g, 3 x 10 g, 3 x 1 g) auf statistischem Wege einen Schätzwert der Keimkonzentration in der Probe. Auf Grundlage der Anzahl positiver Reaktionen von drei aufeinander folgenden Verdünnungen ergibt sich eine Indexziffer, für die aus der MPN-Tabelle (Tab. 37, Anhang) die wahrscheinlichste Keimzahl im vorliegenden Verdünnungsniveau abgelesen wird. Der quantitative Nachweis in 333 g für *Enterobacter sakazakii* erfolgte in Anlehnung an ISO/TS 22964 und der Nachweis für Enterobakterien erfolgte in Anlehnung an ISO 21528-1 (Abb. 6).



**Abbildung 6:** Schematisches Diagramm für den Nachweis von *E. sakazakii* und Enterobakterien mit dem MPN-Verfahren

### 3.1.4.3 Nachweis in 1500 g nach dem FOSTER-Stichprobenplan

Für den Nachweis von *E. sakazakii* in einem Ansatz von 1500 g (60x25 g) erfolgte eine Voranreicherung in 15 Liter Leitungswasser unter stetigem Rühren für acht Stunden bei Raumtemperatur. Daraufhin folgte die Abnahme von einem Aliquot von 3x1 Liter mit anschließender Inkubation bei 37°C für 18 h. Die Isolierung und Identifizierung erfolgte wie in Abb.7 angegeben.



**Abbildung 7:** Schematisches Diagramm für den Nachweis von *E. sakazakii* in 1500 g nach dem FOSTER-Stichproben-Plan

#### 3.1.4.4 Nachweis mit Zusatz von Ferrioxamin E

Der Nachweis von subletal geschädigten *Enterobacter sakazakii* in Trockenmilchpulver erfolgte durch den Zusatz von Ferrioxamin E im Voranreicherungsmedium. Das mit *E. sakazakii* beimpfte Milchpulver wurde in mit 100 ng Ferrioxamin E/ml versetztem gepuffertem Peptonwasser (BPW) bei 37°C für 24 h inkubiert. In einem Parallelansatz wurde der gleiche Versuch ohne Zusatz von Ferrioxamin E im BPW unter den gleichen Versuchsbedingungen durchgeführt. In einer zweiten Versuchsreihe wurde der Keim einem Hitzestress ausgesetzt, indem die Voranreicherung in einem Vorinkubationsschritt für 30 min bei 50°C in einem Wasserbad inkubiert wurde. Eine Zählung erfolgte im Plattengussverfahren mit Plate Count Agar (PCA) nach 30 min und 24 h. Die weiteren Nachweisschritte nach der Voranreicherung erfolgten nach ISO/DS 22964, wie in 3.1.4.1 beschrieben.

#### 3.1.4.5 Nachweis mit chromogenen und fluoreszierenden Nährmedien

Zum Nachweis von *E. sakazakii* wurde die  $\alpha$ -Glucosidase Aktivität herangezogen. Der Test beruht auf der Abspaltung von 5-Bromo-4-chloro-Indolol von der Indolylverbindung 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\alpha$ ,D-glucoopyranosid ( $X_{\alpha}$ Glc), welches in Gegenwart zu einem blauen Indigoderivat oxidiert wird. Die zu untersuchenden Bakterienkulturen wurden auf den chromogenen Nährmedien ESIA, DFI und ESPM ausgestrichen und bei 37°C (DFI, ESPM) und 44°C (ESIA) für 24 h inkubiert und anschließend ausgewertet. Blaue Kolonien auf ESIA und DFI und blau-schwarze Kolonien auf ESPM wurden als *E. sakazakii* - positiv bewertet. Für *E. sakazakii* typisch fluoreszierende Kolonien auf dem Nachweismedium TSA+ $\alpha$ -MUG, auf Basis des fluoreszierenden Substrates 4-Methyl-umbelliferyl- $\alpha$ -D-glucoopyranosid (4- $\alpha$ -MUG), wurden nach einer Inkubation bei 30°C für 24 h unter UV-Licht ( $\lambda=320$  nm) als positiv bewertet.

#### 3.1.5 Nachweis von Antibiotikaempfindlichkeiten

Die Überprüfung der Antibiotikaempfindlichkeiten der *E. sakazakii*-Isolate erfolgte mit dem Agar-Diffusions-Verfahren nach Kirby-Bauer. Dazu wurden die zu untersuchenden Kulturen in jeweils 50 ml TSB inokuliert und für 24 h bei 37°C inkubiert. Dem Ausspateln von 1 ml Bakteriensuspension auf Müller-Hinton Agar folgte das Aufbringen von antibiotikahaltigen Testblättchen (Oxoid, Wesel).

Getestet wurden folgende Antibiotika:

Ampicillin	2 µg
Chloramphenicol	10 µg
Cefixime	5 µg
Ciprofloxacin	5 µg
Erythromycin	5 µg
Gentamicin	10 µg
Kanamycin	5 µg
Neomycin	10 µg
Methicillin	5 µg
Oleandomycin	15 µg
Oxytetracycline	30 µg
Spectinomycin	10 µg
Streptomycin	10 µg
Sulphamethoxazole	25 µg
Tetracycline	10 µg

Der Aufbringung dieser Testblättchen folgte eine Diffusionsphase von 20 min bei Raumtemperatur und eine Inkubation der Platten für 18-24 h bei 37°C. Anschließend fand die Beurteilung der Empfindlichkeit der Isolate aufgrund der jeweiligen Hemmhofgröße statt.

### 3.1.6 Trockenresistenzen

In der Untersuchung zur Trockenresistenz wurden 10 g eines „γ-sterilen“ Milchpulvers mit 1 ml einer Keimkonzentration von  $10^7$  KbE/ml verschiedener *E. sakazakii*, *Pantoea agglomerans* sowie von *Citrobacter freundii* Stämmen versetzt. Diese Probenansätze wurden unter einer sterilen Werkbank für 4-6 h getrocknet und anschließend bei 20°C verschlossen gelagert. Keimzählungen dieser Ansätze erfolgten im Abstand von ca. 4 Wochen. Dafür wurde das beimpfte Milchpulver in 90 ml TSB gelöst, geschüttelt und eine dezimale Verdünnungsreihe mit PSS (Peptone Salt Solution) erstellt. Aus vier Verdünnungsstufen ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ) wurden jeweils 1 ml in eine Petrischale gegeben und mit 10 ml, auf 45°C abgekühltem TSA ausgegossen. Nach Aushärten des Agars wurde für 24 Stunden bei 30°C inkubiert und anschließend eine Keimzählung durchgeführt.

### 3.1.7 Wachstumskinetik

Zur Ermittlung der Wachstumsgeschwindigkeit verschiedener *E. sakazakii*-Isolate wurde von einer Über-Nacht-Kultur in TSB eine dezimale Verdünnungsreihe mit PSS hergestellt. 1 ml der Verdünnungsstufe  $10^{-6}$  diente zur Beimpfung von 90 ml TSB. Die verschiedenen Bakterienkulturen wurden bei 4°C, 10°C und 44°C inkubiert. Eine Zählung der Bakterienkulturen erfolgte durch das Herstellen einer dezimalen Verdünnungsreihe nach 2 h, 4 h, 24 h, 48 h, 72 h und 96 h.

### 3.1.8 Hitzeresistenzen

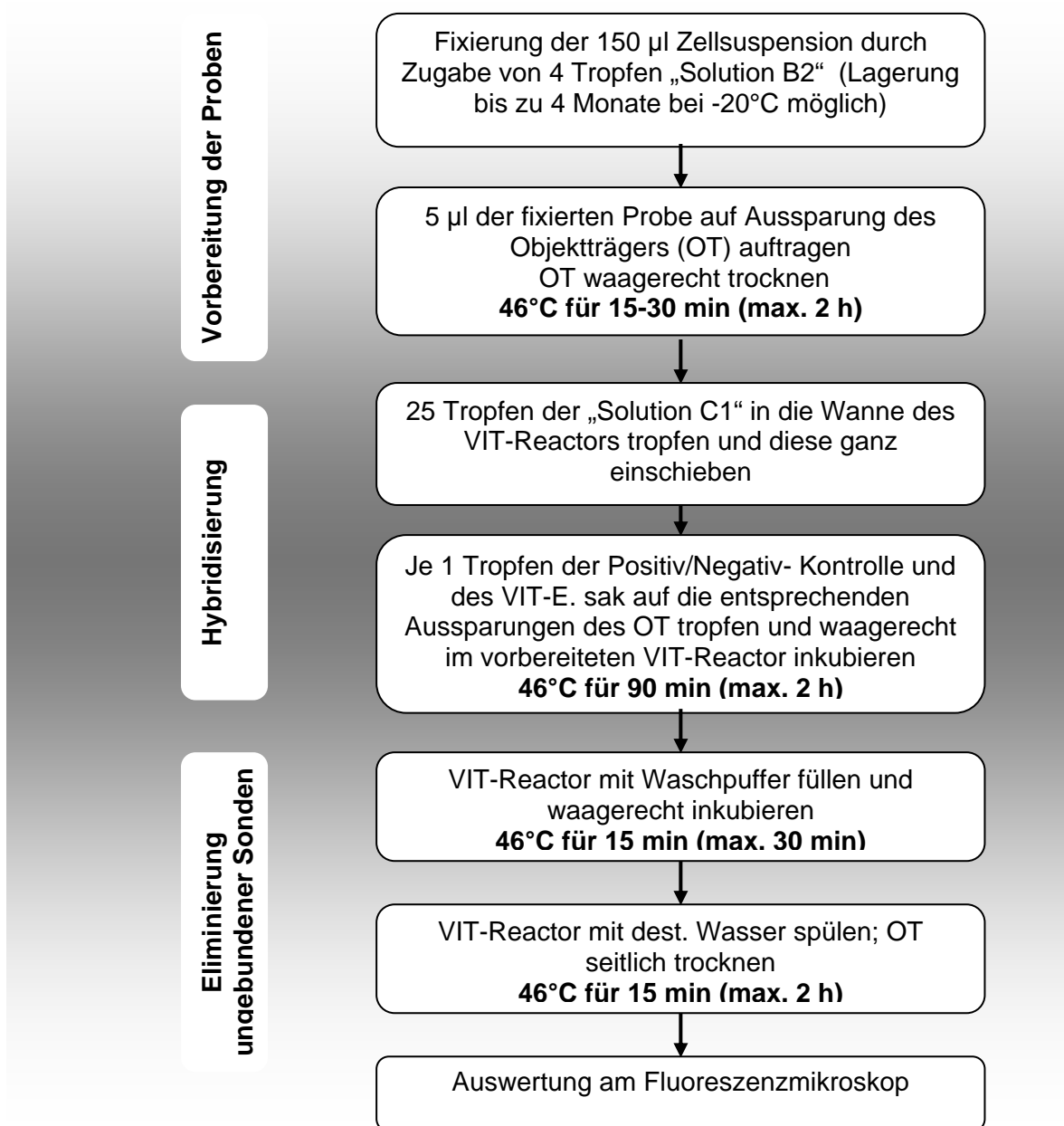
Die Hitzeresistenz verschiedener *E. sakazakii*-Isolate wurde mit dem Impedanzmessverfahren nach 3.1.11 ermittelt. Dazu wurden die Messzellen mit 10 ml TSB Medium befüllt und mit dem jeweiligen Bakterienstamm beimpft. Die Messzellen wurden im Impedanzmessgerät für 24 h bei 30°C, 37°C, 40°C, 42°C, 44°C, 45°C, 46°C, 48°C, 50°C und 55°C inkubiert. Die Auswertung erfolgte über die Auswertesoftware Bac Eval (Sylab, Purkersdorf, Österreich) mit der Betrachtung der Detektionszeit.

### 3.1.9 Resistenz gegen osmotische Beanspruchung

Für den Nachweis der osmotischen Resistenz ausgewählter *E. sakazakii*-Stämme wurden 90 ml LST mit einer Endkonzentration von 0,5 % (w/v), 3,4 % (w/v), 4,0 % (w/v), 4,5 % (w/v) und 5,0 % an NaCl mit der entsprechenden Bakterienkultur beimpft und bei 37°C inkubiert. Eine Keimzählung erfolgte nach 24 h.

### 3.1.10 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH)

Zur molekularen Typisierung der zu untersuchenden Kulturen wurde ein kommerzielles Testsystem (VIT-*Enterobacter sakazakii*, vermicon AG, München, D) genutzt, welches durch Hybridisierung der 16S-RNA den Nachweis von *E. sakazakii* ermöglicht. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers (Abb. 8). Als Nachweis der Hybridisierung mit der spezifischen VIT-Sonde galt der mikroskopische Nachweis von rot fluoreszierenden stäbchenförmigen Bakterien unter Anregung mit grünem Licht (ZEISS Filter 15). Fehlende Rot-Fluoreszenz von Stäbchenbakterien wurde als fehlende Hybridisierung mit dieser Sonde interpretiert.



**Abbildung 8:** Fließschema der *in-situ*-Hybridisierung mit fluoreszenzmarkierter gegen rRNA gerichteter Oligonukleotid-Sonde (Testkit: VIT- *E. sakazakii*, vermicon AG, München,D)

### 3.1.11 Impedanzmessverfahren BacTrac 4100

Die Impedanzmessung dient als Schnellmethode zur Erfassung mikrobieller Stoffwechselaktivitäten. Der Bewertung des Wachstums der Bakterienisolate wurde im BacTrac 4100 (Sylab, Purkersdorf, Österreich), anstatt der üblichen Gesamtimpedanz, die Medien- und Elektrodenimpedanz (M-Wert, E-Wert) zugrunde gelegt. Ein sowohl quantitativer als auch qualitativer Nachweis von *E. sakazakii* in Trockenmilchprodukten wurde mit der Impedanzmessung durchgeführt. Dafür wurden die Messzellen mit 10 ml Nährmedium befüllt und mit der entsprechenden Bakterienkultur beimpft bzw. mit der zu untersuchenden Probe befüllt. Die Inkubation der Messzellen erfolgte im Thermoblock bei 37°C bzw. 44°C für 24 h. Die Bestimmung der Impedanz-Detektionszeit erfolgte durch Einstellung des Schwellenwertes auf 5% Impedanzänderung. Die Auswertung wurde anhand des M- bzw. E-Werts mit der entsprechenden Auswertesoftware BacEval durchgeführt. Bei dem qualitativen Nachweis wurde nach der Kalibrierung mit einer kultivierungsabhängigen Keimzahlbestimmung auf den Keimgehalt in der untersuchten Probe geschlossen.

### 3.1.12 Molekularbiologische Identifizierung mittels Polymerasekettenreaktion

#### 3.1.12.1 Nachweis von *E. sakazakii* - spezifischen Genabschnitten mittels PCR

#### 3.1.12.2 Präparation der bakteriellen DNA

Zur Aufbereitung der einzusetzenden DNA kam eine von HASSAN *et al.* (2000) modifizierte Methode zum Einsatz. Dazu erfolgte zunächst die Subkultivierung der zu untersuchenden *Enterobacter sakazakii* - und *Enterobacteriaceae* - Isolate nach 3.1.2 auf Columbia-Blutagar und deren Inkubation unter aeroben Bedingungen für 18-24 h bei 37°C. Zur Präparation der bakteriellen DNA wurden zwei bis fünf Kolonien des jeweiligen Stammes in 100 µl TE-Puffer (3.1.2.2) in 1,5 ml-Reaktionsgefäßen (Eppendorf, Hamburg, D) suspendiert. Die Zugabe von 10 µl Proteinase K (14-22 mg/ml, Roche Diagnostics, Penzberg, D) zu der Suspension und die Inkubation für 120 min bei 56°C im Wasserbad führten zur Auflösung der Bakterienzellwand sowie zur Deproteinisierung. Die Inaktivierung der Proteinase K konnte durch zehninütiges Kochen bei 100°C erzielt werden. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert (10000 x g, 15 s, Sigma 202MK, Sigma, Osterode am Harz, D) und 2,5 µl des Überstands als „template“ in die PCR eingesetzt.

### 3.1.12.3 Amplifizierung eines speziesspezifischen Abschnitts des 16S rRNA-Gens und des *macro molecular synthesis* Gens

Zur Amplifizierung des speziesspezifischen Abschnitts des 16S rRNA-Gens und *macro molecular synthesis* Gens von *Enterobacter sakazakii* wurden die von LEHNER *et al.* (2004), HASSAN *et al.* (2005) und SEO und BRACKETT (2005) beschriebenen Primer (Tab. 11) verwendet. Zur Durchführung der PCR erfolgte die Erstellung eines Mastermix mit folgender Zusammensetzung je Reaktionsansatz:

Primer 1	1,0 µl (10 pmol/µl)
Primer 2	1,0 µl (10 pmol/µl)
dNTP	0,6 µl (10 mmol/l, MBI Fermentas, St. Leon-Rot, D)
Inkubationspuffer	3,0 µl (10x Puffer, Promega, Mannheim, D)
MgCl <sub>2</sub>	1,8 µl (25 mmol/l, Promega, Mannheim, D)
Taq-Polymerase	0,2 µl (5 U/µl, Promega, Mannheim, D)
aqua bidest.	19,9 µl

Nach gründlicher Durchmischung wurden jeweils 27,5 µl des Mastermixes pro Reaktionsansatz zusammen mit 2,5 µl der nach 3.1.12.2 präparierten DNA in 0,2 ml-Reaktionsgefäße (Sarstedt, Nümbrecht, D) pipettiert. Das anschließende Temperaturprogramm im Thermocycler (*i*Cycler-Biorad, München, D) umfasste folgende Schritte:

**Tabelle 11:** Übersicht über Oligonukleotidprimerpaare und des PCR - Programmes zur Amplifikation der 16S rRNA- bzw. MMS-Gen-Abschnitte von *E. sakazakii*

Ziel-Gen	Oligonukleotidprimer: Sequenz (5' - 3') <sup>1</sup>	PCR-Programm <sup>2</sup>	Bp <sup>3</sup>	Referenz
16S rRNA	Esakf: CTYTGCTGACGAGTGGCGG Esakr: TCTCTGCAGGATTCTCTGG	30X: 94°C-30s, 64°C-60s, 72°C-90s	929	LEHNER <i>et al.</i> (2004)
16S rRNA	Saka-1a: ACAGGGAGCAGCTTGCTGC Saka-2b: TCCGCGATCTCTGCAGGA	30X: 95°C-60s, 50°C- 60s; 72°C -90s	952	HASSAN <i>et al.</i> (2005)
MMS	MM1: GGGATATTGTCCCCTGAAACAG MM2: CGAGAATAAGCCGCGCATT	30X: 94°C-15s, 60°C-15s, 72°C-15s	78	SEO und BRACKETT (2005)
16S rRNA	660-V-1: AGA GTT TGATYM TGG CTC 630R: CAK AAA GGA GGT GAT CC	30X: 95°C-15s, 52°C- 30s; 72°C-90s	1450	LEHNER <i>et al.</i> (2004)

<sup>1</sup> = Oligonukleotidprimer bezogen von MWG-Biotech (Ebersberg, Deutschland)

<sup>2</sup> = Initiale Denaturierung: 95°C für 4 min und Renaturierung: 72°C für 4 min.

<sup>3</sup> = Basenpaare

Im Anschluss erfolgte die Elektrophorese nach 3.1.14.3 und das Färben und Waschen des Gels nach 3.1.14.4.

### **3.1.13 BAX<sup>®</sup>-PCR**

Die Vorbereitung und Durchführung der automatisierten PCR BAX<sup>®</sup>-Methode (Du Pont Qualicon / Oxoid, D) erfolgte laut Angaben des Herstellers wie folgt:

Die Bakterienisolate wurden nach 3.1.2 in 50 ml TSB bei 37°C für 24 h angezüchtet. Ein Aliquot von je 10 µl wurde in die vorbereiteten Reaktionsgefäße mit 500 µl Brain-Heart-Infusion Bouillon (BHI) überführt und erneut drei Stunden bei 37°C inkubiert. Dem Zwischenanreicherungsschritt folgte die Lyse der einzelnen Bakterienisolate, indem 5 µl der Bakterienisolate in 200 µl einer Lysispuffer/Protease K Lösung (Ausgangskonzentration: 12,5 µl Protease/1 ml Lysispuffer) beigemischt wurden. Darauf folgten die Inkubationsschritte [20 min bei 37°C und 10 min bei 95°C] um die Bakterienzellen vollständig zu lysieren. Nach der Lyse wurden die Reaktionsgefäße in Kühlblöcke überführt. Abschließend konnten die fertigen PCR- Reaktionsgefäße aus dem Testkit mit 50 µl der lysierten Probe versetzt und mit den dazu gehörenden Flat Optical Caps verschlossen werden. Die Testansätze wurden in den Thermocycler des BAX<sup>®</sup> System gestellt und das folgende PCR-Programm gestartet: 38X: 94°C-120s, 94°C-15s, 70°C-180s. Durch die vervielfältigte DNA wurde ein fluoreszierendes Signal erzeugt und damit das Ergebnis bestimmt. Die Bewertung der Ergebnisse erfolgte automatisch und wurde nach 4-5 Stunden von der Auswertesoftware (BAX<sup>™</sup> Software, (Du Pont Qualicon / Oxoid, D) entnommen werden.

### **3.1.14 Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)**

#### **3.1.14.1 Präparation der bakteriellen DNA**

Die Präparation der bakteriellen genomischen DNA erfolgte nach einer modifizierten Methode nach CLAROS *et al.* (1995). Dazu wurden die zu untersuchenden Isolate nach 3.1.2 auf TSA für 18-24 h bei 37°C unter oxidischen Bedingungen kultiviert. In ein Reaktionsgefäß (1,5 ml Safe-Lock-Tube, Eppendorf, Hamburg, D) wurden 2-3 Kolonien in 100 µl Aqua bidest. überimpft und zur DNA-Freisetzung im Heizblock (Grant UBD, Grant Instruments, UK) bei 95°C für 15 min erhitzt. Anschließend erfolgte die Zentrifugation (11000 x g, Eppendorf Zentrifuge 5415, Eppendorf, Hamburg, D) für 2 min. Diese Rohextrakte dienten als „template“ in der PCR.

### 3.1.14.2 Durchführung der Polymerasekettenreaktion mit Primer M13 Core/ T3B

Für die Amplifizierung wurden die von CLAROS *et al.* (1995) beschriebenen Primer M13 Core mit der Sequenz 5'-GAG GGT GGC GGT TCT-3' und T3B mit der Sequenz 5' AGG TCG CGG GTT CGA ATC C-3' verwendet. Die Primer wurden von MWG-Biotech (Ebersberg, D) bezogen. Das Pipettieren des Mastermix, an einem Reaktionsansatz dargestellt, erfolgte nach folgendem Protokoll:

	M13 Core	T3B	
Aqua bidest.	17 µl	18 µl	
Mastermix	20 µl	20 µl	(2,5x, Eppendorf, Hamburg, D)
Primer	5,0 µl	5,0 µl	(65 pmol/µl / 49 pmol/µl)
MgCl <sub>2</sub>	3,0 µl	-	(25 mM, Eppendorf, Hamburg, D)

Zur Herstellung eines Mastermix für mehrere Reaktionsansätze wurden die Reagenzien mit der Anzahl der gewünschten Ansätze entsprechend multipliziert. Nach gründlichem Mischen wurden jeweils 45 µl (M13 Core) bzw. 33 µl (T3B) des Mastermix pro Reaktionsansatz zusammen mit 5µl (M13 Core) bzw. 7 µl (T3B) der nach 3.1.14.1 präparierten DNA in 0,2 ml-Reaktionsgefäße (Biozym, Hessisch-Oldendorf, D) pipettiert. Die anschließende PCR fand im Thermocycler (Gene Amp<sup>®</sup> PCR System 9700, PE Applied Biosystems, USA) statt. Das Temperaturprogramm umfasste folgende Schritte:

#### Für Primer M13 Core:

1 Zyklus	94°C	2 min	Initiale Denaturierung
33 Zyklen	94°C	20 s	Denaturierung
	50°C	1 min	Primeranlagerung
	72°C	20 s	Polymerisierung
1 Zyklus	72°C	6 min	Renaturierung

#### Für Primer T3B:

1 Zyklus	94°C	2 min	Initiale Denaturierung
36 Zyklen	94°C	20 s	Denaturierung
	50°C	30 s	Primeranlagerung
	72°C	1,20 min	Polymerisierung
1 Zyklus	72°C	6 min	Renaturierung

Bis zur Entnahme verbleiben die Proben bei 4°C in Thermocycler.

### 3.1.14.3 Agarosegelelektrophorese

Der Nachweis der amplifizierten DNA-Fragmente der PCR erfolgte durch Elektrophorese in einem 1,2%-igen Agarosegel. Zur Herstellung des Agarosegels wurden 1,2 g SeaKem-Agarose (Biozym, Hessisch-Oldendorf, D) in 100 ml 1x Tris-Acetat-Puffer (TAE), hergestellt nach Angaben von SAMBROOK *et al.* (1989), suspendiert. Der Puffer setzte sich wie folgt zusammen:

Tris-Base	(40 mmol/l, Roth, Karlsruhe, D)	242,0 g
Eisessig	(1,14 mol/l)	57,1 ml
EDTA	(0,5 mol/l ,Titriplex III, Merck, Darmstadt, D)	100 ml
Aqua dest.		ad 1000 ml
pH 8,0		

Diese Mischung wurde bis zum vollständigen Auflösen in der Mikrowelle (Whirlpool PRO 2860) gekocht, im Wasserbad auf 56°C abgekühlt, in eine mit einem Kamm versehene Gelform gegossen und bis zum Erstarren des Gels bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach Entfernen des Kammes wurde das Gel in die Gelkammer gelegt mit Puffer überschichtet. Anschließend wurden 12 µl des PCR - Produktes mit 3 µl 6x „Orange Loading Solution“ (Fermentas Life Science, St. Leon-Rot, D) vermischt, in die Taschen des Agarosegels pipettiert und bei 120 mA für 2,5 h in einer Elektrophoresekammer (Midi SuperCast Standard, BIOplastic BV, S. Martino in Campo, Italien) aufgetrennt. Als Elektrophoresepuffer diente 0,5 x TAE-Puffer. Für die Abschätzung des Molekulargewichtes des jeweiligen Amplifikats wurden Molekulargewichtsstandard-Marker von 100 Bp (1µg/µl) (DNA Low Ladder, Sigma-Aldrich, Steinheim, D) randständig aufpipettiert.

### 3.1.14.4 Ethidiumbromidfärbung

Die Zugabe einer wässrigen Ethidiumbromid-Lösung (5 µg/ml, Sigma, Osterode am Harz, D) zum Gel erfolgte vor dem Gießen des Gels in die Kammer. Darauf folgte die Gelelektrophorese mit anschließender Darstellung der Fragmente. Der fluoreszierende Farbstoff Ethidiumbromid lagert sich dabei als interkalierende Substanz in die Doppelstränge der DNA ein, wodurch diese bei Bestrahlung mit UV-Licht sichtbar wird. Anschließend wurde das Gel unter UV-Licht fotografiert (MultiImage™ Light, Alpha Innotech Corporation, Biozym, Hessisch Oldendorf, D). Die DNA-Fragmente stellen sich als helle Streifen vor dunklem Hintergrund dar.

### 3.1.15 Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)

#### 3.1.15.1 Präparation der bakteriellen DNA

Die Präparation der bakteriellen Gesamtzell-DNA erfolgte nach einer Methode im Rahmen einer Zusammenarbeit mit dem Institut für Milchwissenschaften an der Universität Gießen. Dazu wurden die zu untersuchenden Isolate nach 3.1.2 in 40 ml BHI für 24 h bei 37°C unter oxidischen Bedingungen angezüchtet. Dem Zentrifugieren der Bakteriensuspension (10 min, 10000 x g, Heraeus Sepatech Biofuge 22 R) und einmaligem Waschen in TE-Puffer (3.1.2.2) folgte das Resuspendieren des Bakteriensediments in 0,5 ml TE-Puffer und die fotometrische Einstellung bei einer Wellenlänge von 620 nm (Shimadzu, UV-1601, Shimadzu Corporation, Japan) auf eine Transmission von 4 %. Für jedes Isolat wurden aus der eingestellten Bakteriensuspension Agaroseblöckchen hergestellt. Für die Herstellung jedes Blöckchens erfolgte die sorgfältige Mischung von 50 µl der für 5 min im Wasserbad auf 56°C vorgewärmten fotometrisch eingestellten Bakteriensuspension mit 50 µl einer 1,5% igen FMC Incert® Agarose Lösung („low melting, low gelling“ Incert Agarose, Biozym Diagnostik GmbH, Hessisch Oldendorf, D: 15 mg Agarose, 1 ml TE-Puffer) und das Pipettieren dieser Mischung in eine Gießkammer (100 µl, Bio Rad Laboratories GmbH, München, D). Bis zum Erstarren der Agaroseblöckchen wurden die Gelkammern ca. 15-30 min auf Eis inkubiert. Zum Aufschluss der Bakterienzellwand wurden die Blöckchen in einem Lysispuffer (200 µl/Blöckchen, pH 7,6) mit Lysozym (100.000 U/Blöckchen; Sigma-Aldrich, Steinheim, D) für 6 h bei 37°C inkubiert. Der Lysispuffer setzte sich wie folgt zusammen:

			Ansatz für 500 ml
1 mol/l	NaCl		29,3 g
6 mmol/l	Tris-Base	(Roth, Karlsruhe, D)	363 mg
100 mmol/l	EDTA	(Titriplex III, Merck, Darmstadt, D)	18,61 g
0,5 %	Brij-58	(Polyoxyethylene-20-Cetyl-Ether; Sigma, Osterode am Harz, D)	2,5 g
0,5 %	Na-Laurylsarkosin	(Sigma, Osterode am Harz, D)	2,5 g
0,2 %	Na-Dodecylsulfat	(Sigma, Osterode am Harz, D)	1,0 g
Aqua bidest			ad 500 ml

Zum Verdauen der Proteine wurden 10 µl Proteinase-K pro Blöckchen (18,6 g/ml Stammlösung, Roche Diagnostic, Mannheim, D) für 24 h bei 56°C inkubiert. Im Anschluss erfolgte ein zweimaliges Waschen mit TE-Puffer (200 µl/Blöckchen) und eine Inkubation für jeweils 30 min bei Raumtemperatur im TE-Puffer.

Durch den Zusatz von 2 µl Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF, Endkonzentration 1 mmol/l; Sigma, Osterode am Harz, D) pro Blöckchen zu je 200 µl TE-Puffer kam es zu einer Inaktivierung der Proteinase K in einem Wasserbad bei 56°C für 60 min. Dieser Schritt wurde ebenfalls einmal wiederholt. Weiterhin folgte ein zweimaliges Waschen der Blöckchen mit TE-Puffer (200 µl/Blöckchen) und eine Inkubation für jeweils 30 min bei Raumtemperatur. Die so präparierte DNA in den Agaroseblöckchen konnte im Weiteren sofort mit Restriktionsenzymen verdaut oder in 1 ml TE-Puffer bei 4°C gelagert werden.

### 3.1.15.2 Restriktion der Gesamtzell-DNA

Für den Verdau der DNA in Agarosegelblöckchen wurde in der vorliegenden Arbeit die Restriktionsendonuklease *Xba*I (5'-TCTAGA-3') (Fermentas Life Science, St. Leon-Rot, D) verwendet. Der Restriktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

Verdau mit der Restriktionsendonuklease *Xba*I (Ansatz pro Blöckchen):

Universalpuffer (Buffer Tango™ y 10x, Fermentas Life Science, St. Leon-Rot, D)	20 µl
<i>Xba</i> I (10 U/µl)	2,0 µl
Aqua bidest.	178 µl

Der Verdau erfolgte für 6 h bei 37°C.

### 3.1.15.3 Durchführung der PFGE

Mittels PFGE erfolgte die Auftrennung der Fragmente der nach 3.1.15.1 präparierten und nach 3.1.15.2 verdauten bakteriellen Gesamtzell-DNA in einem 1,1% igen Agarosegel (1,54 g Agarose - Gigaphor Agarose, Eurobio- in 140 ml Tris-Borat-Puffer (TBE)).

Als Ausgangspuffer diente 10 x TBE-Puffer, hergestellt nach Angaben von SAMBROOK *et al.* (1989). Der Puffer setzte sich wie folgt zusammen:

Tris-Base	(45 mmol/l, Roth, Karlsruhe,D)	108 g
Borat	(1,14 mol/l)	55 g
EDTA	(0,5 mol/l, Titriplex III, Merck, Darmstadt, D)	40 ml
Aqua dest.		ad 1000 ml
pH	8,0	

Bis auf 2 ml wurde die Agaroselösung in eine 13 x 14 x 1 cm Flachbettform (Bio Rad, München, D), in die ein 10-fach-Kamm eingesetzt war, gegossen und bis zum Erstarren ca. 30 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach Entnahme des Kammes erfolgte im Anschluss an die Restriktion das Einsetzen der Agaroseblöckchen in die Vertiefungen des Gels. Als Längenstandard dienten Pulse Marker™ 0,1-200 kb und Marker™ 50-1000 kb (beide Sigma, Osterode am Harz, D). Die zuvor abgezweigten 2 ml Agaroselösung wurden zum Verschließen der Vertiefungen genutzt. Die Elektrophorese erfolgte im CHEF-DR II (Contour-Clamped Homogeneous Electric Field Electrophoresis) „Pulse Field Electrophoresis System“ (Bio Rad, München, D). Aufgefüllt wurde die Elektrophoresekammer mit 2,5 Litern 0,5 x TBE-Laufpuffer. Die PFGE fand unter folgenden Bedingungen statt:

XbaI-Programm:

	Lauf I	Lauf II
Pulszeiten:	0,1 s -15 s	15 s - 35 s
Spannung:	200 V	200 V
Dauer:	6 h	15 h
Temperatur:	14°C	14°C

Im Anschluss an die Pulsfeldgelelektrophorese folgte das Färben und Waschen des Gels nach 3.1.14.4 und anschließend wurde mit dem GelDoc 2000 (BioRad, München, D) unter UV-Licht (302 nm) digital fotografiert. Die Auswertung und Gruppierung der PFGE-Muster wurde sowohl visuell als auch mit dem Computerprogramm GelCompare 4.0 (Applied Maths, Belgien) durchgeführt, mit welchem die Erstellung eines Dendrogramm möglich war.

### 3.1.16 *Realtime* PCR (qPCR)

Zur Amplifikation des MMS-Gen-Abschnittes *dnaG* - Gen von *E. sakazakii* wurden die von DRUDY *et al.* (2006) beschriebenen Primer MMS Forward 5'GGG ATA TTGTCC CCT GAA ACA G-3' und MMS Reverse 5'CGA GAA TAA GCC GCG CAT T-3' auf Basis des "makromolekular synthesis operon" (MMS)-Gens verwendet (Tab. 12). Die MMS Taqman Probe mit der Sequenz 5' 6FAM-ACA GAG TAG TAG TTG TAG AGG CCG TGC TTC C-TMR 3' wurde mit den Fluoreszenzfarbstoffen 6-carboxyfluorescein (FAM, reporter dye) und 6-carboxytetramethylrhodamine (TMR, TAMARA, quencher dye) terminal markiert.

**Tabelle 12:** Primer und Taqman Probe für die Amplifikation des MMS-Gen-Abschnittes *dnaG*-Gen von *E. sakazakii*

Primer	Sequenz	Denaturierungs- temperatur	Lokalisation in <i>DnaG</i>
MMS Forward	5'GGG ATA TTGTCC CCT GAA ACA G-3'	60°C	201-221
MMS Reverse	5'CGA GAA TAA GCC GCG CAT T-3'	60°C	223-253
MMS Taqman Probe	5'6FAM-ACA GAG TAG TAG TTG TAG AGG CCG TGC TTC C-TMR 3'	70°C	260-278

<sup>a</sup> FAM, 6-Carboxyfluorescein (reporter dye); TMR, TAMARA, 6-Carboxytetramethylrhodamine (quencher dye)

Die Durchführung der *realtime* PCR (qPCR) erfolgte nach folgendem Reaktionsansatz:

Primer 1 (Hin)	1,0 µl	(10 pmol/µl)
Primer 2 (Rück)	1,0 µl	(10 pmol/µl)
Probe	2,0 µl	(50 pmol/µl, TQMMSn)
dNTP	0,4 µl	(10 mmol/l, Biotools, B&M Labs, S.A. Spanien)
Puffer A	2,0 µl	(Biotools, B&M Labs, S.A. Spanien)
MgCl <sub>2</sub>	1,6 µl	(25 mmol/l, Biotools, B&M Labs, S.A. Spanien)
Taq-Polymerase	1,0 µl	(1 U/µl, Biotools, B&M Labs, S.A. Spanien)
Aqua bidest.	9,0 µl	

Nach gründlichem Mischen wurden 18,0 µl des Reaktionsansatzes in 0,2 ml Reaktionsgefäße pipettiert und 2,0 µl der nach 3.1.14.1 präparierten DNA zugegeben. Bei allen qPCR-Ansätzen wurde ein Leeransatz mitgeführt. Das anschließend durchgeführte Temperaturprogramm im Rotor Gene RG 3000 (Corbett Life Science, Sydney, Australia) umfasst folgende Schritte:

1 Zyklus	50°C	2	min	
	95°C	10	min	Denaturierung
35 Zyklen	95°C	15	s	Denaturierung
	60°C	50	s	Anlagerung und Amplifikation

Die Messung von Fluoreszenzlicht erfolgt in Echtzeit und die Auswertung mit der entsprechenden Software.

### **3.1.17 16S rDNA – Sequenzierung**

Die vergleichende 16S rDNA Sequenzanalyse mit dem Sequenzierautomat von Applied Biosystems (ABI, Weiterstadt) wurde nach der Methode von BROSIUS *et al.* (1981) durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit der ARB-Software (LUDWIG *et al.* 2004). Die Topologie des Konsensusbaumes wurde über eine Maximum-Likelihood Analyse evaluiert. Die Sequenzierung wurde mit freundlicher Unterstützung von Claudia Beimfohr (vermiconAG, München,D) durchgeführt.

### **3.1.18 Nachweis zur Biofilmbildung**

#### **3.1.18.1 Aggregat- und Pellikelbildung**

Ein Pellikel ist eine aus aggregierten Bakterienzellen an der Flüssigkeit/Luft-Grenze gebildete Kahmhaut. Für den Nachweis der Pellikelbildung wurden 10 ml mLST-Medium mit der entsprechenden Bakterienkultur beimpft und bei 28°C oder 37°C inkubiert. Die Auswertung erfolgte visuell nach 24 h.

#### **3.1.18.2 Kongorot- und Calcoflour-Bindung**

Für den Nachweis der extrazellulären Matrixkomponente Curli-Fimbrien und Cellulose wurden die Farbstoffe Kongorot (CR)- und Calcoflour (CF) genutzt. Die Bakterienstämme wurden auf CR- und CF-Agar ausgestrichen und bei 28°C oder 37°C für 24 h bzw. 48h inkubiert. Auf CR-Agarplatten bilden die Curli-Fimbrien produzierenden Stämme ein rotes Pigment. Die Auswertung der CF-Agarplatten erfolgte unter UV-Licht ( $\lambda=366$  nm). Aufgrund der Bindung von CF an die Cellulose fluoresziert diese bei Cellulose produzierenden Stämmen, Cellulose-negative Bakterienstämme hingegen zeigten keine Fluoreszenz.

#### **3.1.18.3 Bakterielle Adhärenz an abiotische Oberflächen**

Für den Nachweis der Adhärenz der Bakterien an abiotischen Oberflächen wurden Polystyrol-Mikrotiterplatten und Glasröhrchen eingesetzt.

### **Bakterielle Adhärenz an Polystyrol Mikrotiterplatten**

Für die Beimpfung einer mit 200 µl LB-Medium (ohne Salz) befüllten 96-Well Mikrotiterplatte wurden je 5 µl einer Übernachtskultur in die Wells überführt. Die Platte wurde bei einer Temperatur von 28°C oder 37°C für 24 h inkubiert. Nach dem Verwerfen des Kulturüberstandes erfolgten ein dreimaliges Waschen mit PSS und die Trocknung der Platte über Nacht bei Raumtemperatur (RT). Die adhärierenden Bakterien wurden mit 0,4 % Kristallviolett (KV) für 10 min angefärbt und nach dem Verwerfen der KV-Lösung mehrmals mit Wasser gewaschen. Die Platte wurde über Nacht bei RT getrocknet und anschließend mit 200µl 95% Ethanol befüllt und im Fotometer (ELx808, Bio-Tek Instruments GmbH, Bad Friedrichshall, D) bei 570 nm gemessen. Der gefärbte, adhärierende Biofilm wurde sowohl visuell als auch fotometrisch quantifiziert.

### **Bakterielle Adhärenz an Glasröhrchen**

Die mit 10 ml LB-Medium (ohne Salz) befüllten Glasröhrchen wurden mit dem entsprechenden Bakterienstamm beimpft und bei 37°C für 24 h inkubiert. Anschließend wurde die Kultur verworfen, 3 x mit PSS gewaschen und über Nacht bei RT getrocknet. Die Glasröhrchen wurden dann mit 0,4 % Kristallviolett (KV) für 10 min gefärbt und mehrmals nach dem Abgießen der KV-Lösung mit Wasser gewaschen. Im Anschluss an die Trocknung der Röhrchen ÜN bei RT wurde der gefärbte, adhärierende Biofilm visuell quantifiziert.

## **3.1.19 Kalkulation und Auswertung der Ergebnisse**

Zur Keimzahlbestimmung nach dem Gussplattenverfahren wurden die auszählbaren Platten mit weniger als 300 Kolonien sowie die nächsthöhere Verdünnungsstufe bei der Auswertung in die Kalkulation einbezogen. Aus den gezählten Kolonien wurde der gewichtete Mittelwert mittels folgender Formel errechnet:

$$N = \frac{\sum C}{V(n_1 + 0,1n_2)d}$$

N gewichteter Mittelwert der Koloniezahlen

$\sum C$  Gesamtanzahl der Kolonien auf allen Petrischalen

V Volumina des Inokulums auf jeder Petrischale in ml

$n_1$  Anzahl der Petrischalen aus der ersten Verdünnung

$n_2$  Anzahl der Petrischalen aus der zweiten Verdünnung

d Verdünnung der ersten Zählung

Für einen Vergleich von verschiedenen Typisierungsmethoden wurde der Diskriminierungsindex herangezogen, basierend auf der Wahrscheinlichkeit das zwei unabhängige Stämme als der gleiche Type charakterisiert werden (HUNTER und GASTON, 1988).

$$D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^S n_j(n_j - 1)$$

$D$  Diskriminierungsindex

$N$  Gesamtanzahl der untersuchten Isolate

$S$  Gesamtanzahl der Typen

$n_j$  Anzahl der Stämme zugehörig zum  $j$ -ten Typ

## 3.2 Nachweis und Identifizierung

### 3.2.1 Phänotypische Eigenschaften

Bei allen 316 untersuchten *E. sakazakii*-Isolaten handelt es sich um gramnegative, Oxidasenegative und Katalasenegative Stäbchen, die sowohl auf TSA als auch charakteristisch auf Selektiv- und Chromogennährböden (3.1.2.1) wachsen. Die Einzelergebnisse zu den untersuchten Isolaten sind in einer Übersicht im Anhang zusammengefasst.

#### 3.2.1.1 Morphologie und biochemisches Leistungsspektrum

Die Bildung eines gelben Pigmentes (Abb. 9) wurde nach Anzucht der Bakterien auf TSA (3.1.2.1) bei einer Inkubationstemperatur von 30°C bei 27 ausgewählten Stämmen beurteilt (Tab. 13). Dabei zeigten nach 24 h Inkubationsdauer 21 (77%) Isolate ein hellgelbes Pigment, die verbleibenden 6 (22%) Isolate waren unpigmentiert. Nach einer Inkubationsdauer von 48 h zeigten 20 (74%) ein hellgelbes Pigment, 7 (26%) Isolate ein gelbes Pigment. Die Mehrzahl der untersuchten Isolate 22 (81%) waren nach 72 h gelb pigmentiert, lediglich 5 (19%) Isolate zeigten ein hellgelbes Pigment.

**Tabelle 13:** Ausprägung der Gelbpigmentierung verschiedener *E. sakazakii*-Stämme bei 30°C

Anzahl der Stämme nach (n=27)			Pigmentierung bei 30°C
24 h	48 h	72 h	
6	-	-	weiß
21	20	5	hellgelb
-	7	22	gelb

Eine weitergehende Untersuchung zur Gelbpigmentierung der Kolonien auf TSA mit klassisch mikrobiologischen Methoden ergab, dass gelb pigmentierte Isolate in einigen Fällen nicht als *E. sakazakii* identifiziert werden konnten (Tab. 14). Mit der CLF-Methode konnten von 20 gelb pigmentierten Isolaten 8 (40%) und von 6 fraglichen nur schwach gelb färbenden Isolate nur eines als *E. sakazakii* identifiziert werden.

Ähnliche Ergebnisse waren auch bei der FDA-Methode mit 10 (84%) von 12 positiven Isolaten und 2 von 11 fraglichen Isolaten zu beobachten. Die mit der ISO-Methode isolierten gelb pigmentierten Isolate konnten zu 55% als *E. sakazakii* identifiziert werden.

**Tabelle 14:** Anzahl der gelb pigmentierten Isolate, die durch verschiedene mikrobiologische Methoden tatsächlich als *E. sakazakii* identifiziert, wurden

	Gelbpigmentierung auf TSA	als <i>E. sakazakii</i> identifiziert	
		n	%
CLF-Methode	20 positiv (gelb)	8	40%
	6 fraglich (hellgelb)	1	17%
FDA-Methode	12 positiv (gelb)	10	84%
	11 fraglich (hellgelb)	2	18%
ISO-Methode	22 positiv (gelb)	12	55%

n= Anzahl der untersuchten Isolate

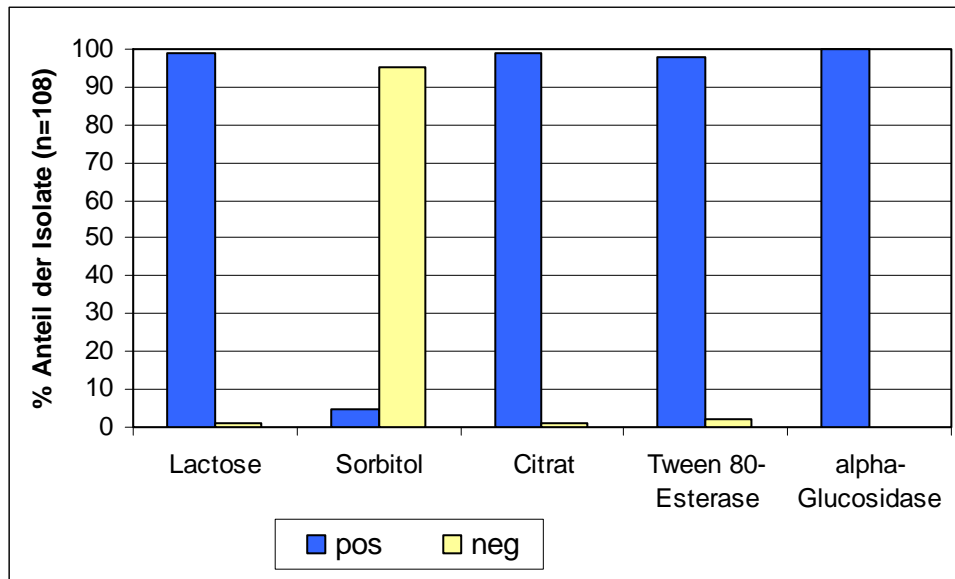
Bei den Isolaten, die nicht als *E. sakazakii* identifiziert wurden, handelt es sich, der Untersuchung mit dem API 32E nach, um die Spezies *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter asburiae*, *Leclercia adecarboxylata*, *Pantoea spp.*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* und *Pseudomonas aeruginosa*.



**Abbildung 9:** Typisches Wachstum von *Enterobacter sakazakii* (links, gelbes Pigment) und *Enterobacter cloacae* (rechts, weißes Pigment) auf Trypton Soya Agar (TSA)

Zur weiteren Charakterisierung der Isolate wurden die Verwertung der Kohlenstoffquellen Lactose, Sorbitol und Citrat sowie die Enzymaktivitäten untersucht (Abb. 10). Eine Verwertung von Lactose und Citrat konnte für 99 % der Isolate nachgewiesen werden. Hingegen waren 95 % der Isolate nicht in der Lage, Sorbitol zu verwerten.

Dabei war das Enzym  $\alpha$ -Glucosidase bei allen untersuchten Isolate und das Enzym Tween 80-Esterase bei 98% der untersuchten Isolate feststellbar.



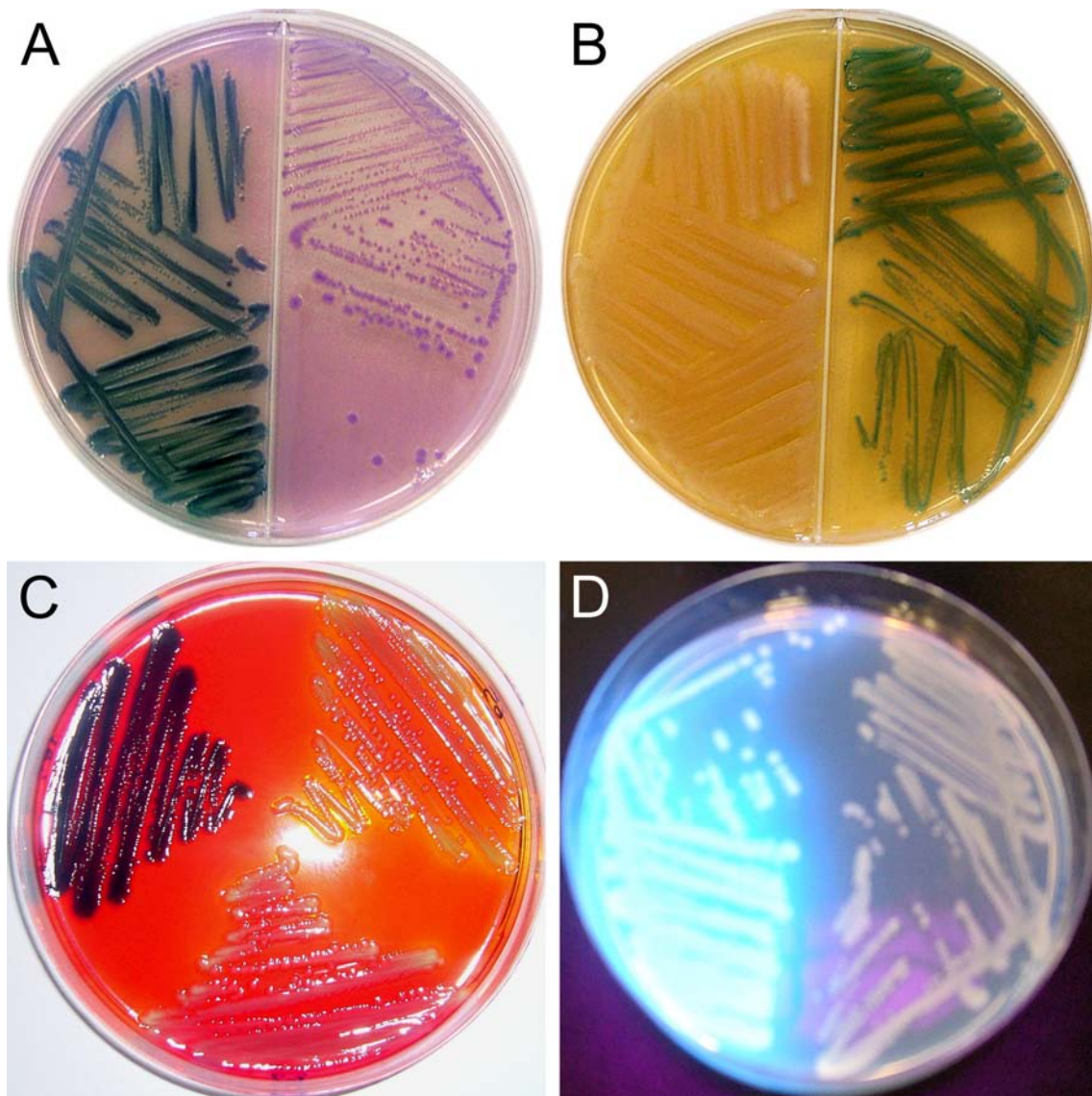
**Abbildung 10:** Verwertung von Kohlenstoffquellen und Enzymaktivitäten der untersuchten *E. sakazakii*-Isolate

Alle untersuchten *E. sakazakii* Isolate zeigten eine typische Färbung auf den mit positiver  $\alpha$ -Glucosidase-Reaktion beruhenden chromogenen Nährmedien ESIA mit blauen, auf DFI mit blau-grünen und ESPM mit blau-schwarzen Kolonien. Das fluoreszierende Medium TSA+ $\alpha$ -MUG zeigte für *E. sakazakii* typisch fluoreszierende Kolonien unter UV-Licht ( $\lambda$  320 nm) (Abb. 11). In einer Vergleichsuntersuchung zur Sensitivität und Spezifität dieser Nährmedien (Tab. 15) ergab sich für ESIA eine Sensitivität von 97,9% und für DFI, ESPM und TSA+ $\alpha$ -MUG eine Sensitivität von 100%. Für die chromogenen Nährmedien konnte eine Spezifität von 88% für DFI, 92,6% für ESIA und 100% für ESPM ermittelt werden. Lediglich TSA+  $\alpha$ -MUG zeigte eine geringe Spezifität von 47,6% auf.

**Tabelle 15:** Sensitivität und Spezifität der chromogenen und fluoreszierenden Nährmedien

Medium	Anzahl positiver Isolate	Anzahl negativer Isolate	% Anteil falsch positiver	% Anteil falsch negativer	Sensitivität (%)	Spezifität (%)
ESIA*	95	25	2	2	97,9	92,6
DFI*	98	22	3	0	100	88
ESPM*	95	25	0	0	100	100
TSA+ $\alpha$ -MUG**	106	10	11	0	100	47,6

\* Chromogene Nährmedien: ESIA- blaue Kolonien (Inkubation: 42°C); DFI – blau-grüne Kolonien (Inkubation: 37°C, 24 h); ESPM -blau-schwarze Kolonien (Inkubation: 37°C, 24 h); \*\* Fluoreszierende Medium: TSA+ $\alpha$ -MUG - fluoreszierende Kolonien unter UV-Licht ( $\lambda$  320 nm) (Inkubation: 30°C, 24 h); % Sensitivität=100 x (richtig positive/[richtig positive + falsch negative]); % Spezifität=100 x (richtig positive/[richtig positive + falsch positive])



**Abbildung 11:** Morphologische Differenzierung von *E. sakazakii* auf chromogenen und fluoreszierenden Nährmedien. (A) ESIA (AES Laboratories) *E. sakazakii* (blaue Kolonien), nicht-*E. sakazakii* (lila Kolonien). (B) DFI (Oxoid) *E. sakazakii* (blau-grüne Kolonien), nicht-*E. sakazakii* (weiße Kolonien). (C) ESPM (R&F Laboratories) *E. sakazakii* (schwarz-blaue Kolonien); *E. cloacae* (weiß-grünliche Kolonien). (D) TSA+ $\alpha$ -MUG (nach LEUSCHNER und BEW, 2004) *E. sakazakii* (fluoreszierend bei  $\lambda=320$  nm); *Pantoea* spp. (nicht fluoreszierend).

Alle 188 untersuchten Isolate zeigten bei der biochemischen Untersuchung mit dem API 32E die Fähigkeit zum Abbau von Mannit, Maltose, Glucose, Saccharose, Trehalose und Rhamnose sowie eine Aktivität von Ornithindecaboxylase, Arginindihydrolase, Lipase,  $\beta$ -Glucosidase,  $\beta$ -Galactosidase,  $\alpha$ -Glucosidase und  $\alpha$ -Galactosidase. Dagegen konnten Adonit, D-Arabitol und Malonat nicht umgesetzt werden und keine Aktivität für Lysindecaboxylase,  $\beta$ -Glucuronidase und L-Aspartat-Arylamidase nachgewiesen werden. Alle Substrate wurden von den *E. sakazakii*-Isolaten, wie in der API 32E v.3.0 Datenbank angegeben, umgesetzt.

Die einzige Ausnahme war Cellobiose, die nur von 40% statt der erwarteten 100% der Isolate umgesetzt werden konnte. Alle untersuchten Isolate wurden zuvor mit einer spezifischen PCR (siehe Ergebnisse, Tab. 21) als *E. sakazakii* bestätigt.

Tabelle 16 zeigt den prozentualen Anteil der *E. sakazakii*-Isolate an, die bestimmte Substrate umsetzen konnten, im Vergleich zu dem *E. sakazakii* Referenzstamm ATCC 29544 und der Prozenttabelle aus der API 32E v.3.0 Datenbank.

**Tabelle 16:** Biochemische Eigenschaften von 188 *E. sakazakii*-Isolate und dem Referenzstamm

Reaktionen	Reaktionen Referenzstamm ATCC 29544	% der positiven Reaktionen*	
		<i>E. sakazakii</i> (n=188)	<i>E. sakazakii</i> API 32 E**
Ornithindecaboxylase	+	100	95
Arginindihydrolase	+	100	95
Lysindecaboxylase	-	0	0
Urease	-	2	1
L-Arabitol	-	2	0
Galakturonat	+	99,5	100
5-Ketogluconat	-	1	0
Lipase	+	100	95
Phenolrot	-	2	0
$\beta$ -Glucosidase	+	100	100
Mannit	+	100	100
Maltose	+	99	100
Adonit	-	0	3
Palatinose	+	88	82
$\beta$ -Glucuronidase	-	0	0
Malonat	-	0	4
Indol	-	1	4
N-Acetyl- $\beta$ Glucosamidase	+	96	82
$\beta$ -Galactosidase	+	100	100
Glukose	+	100	100
Saccharose	+	99	99
L-Arabinose	+	90	100
D-Arabitol	-	0	1
$\alpha$ -Glucosidase	+	99	95
$\alpha$ -Galactosidase	+	100	95
Trehalose	+	100	95
Rhamnose	+	100	100
Inosit	+	56	50
Cellobiose	+	40	100
Sorbit	-	2	1
$\alpha$ -Maltosidase	+	89	100
L-Aspartat-Arylamidase	-	0	0

n = Anzahl der untersuchten *E. sakazakii* Isolate; + = Umsetzung des Substrates; - = fehlende Umsetzung des Substrates  
\*nach 24 h bei 37°C; \*\*% positive Reaktionen aus der API 32E v.3.0 Datenbank (API-Arbeitsanleitung, bioMérieux® Deutschland GmbH)

Die durch den Einsatz des API 32E ermittelten biochemischen Profile wurden zur Definition von Biotypen herangezogen. Insgesamt konnte aufgrund der vielfältigen Unterschiede im biochemischen Profil (Tab. 17) der 188 untersuchten *E. sakazakii*-Isolate 37 Biotypen ermittelt werden. Der Biotyp 1 bildet mit 32% der untersuchten Isolate die größte und der Biotyp 2 mit 28% der Isolate die zweitgrößte Gruppe. Die weiteren Biotypen könnten für eine Differenzierung von *E. sakazakii* Stämmen in epidemiologischen Studien sehr hilfreich sein.

**Tabelle 17:** Biochemische Differenzen der 37 Biotypen, ermittelt durch die 188 untersuchten *E. sakazakii*-Isolate mit dem API 32E

Biotyp	Biochemische Unterschiede zum Referenzstamm ATCC 29544	Anzahl der Isolate	% Anteil der Isolate
1	Keine Abweichungen zum Referenzprofil	59	32
2	Inosit -	52	28
3	Palatinose -	17	9
4	$\alpha$ -Maltosidase -	6	3
5	Inosit - Palatinose -	5	2,6
6	Palatinose - L-Arabinose -	5	2,6
7	Inosit - $\alpha$ -Maltosidase -	4	2
8	L-Arabinose -	3	1,6
9	Inosit - Palatinose - Cellobiose -	3	1,6
10	Inosit - L-Arabinose -	2	1,1
11	Maltose - L-Arabinose -	2	1,1
12	Palatinose - Cellobiose -	2	1,1
13	N-Acetyl- $\beta$ Glucosamidase -	2	1,1
14	Inosit - Palatinose - Galakturonat -	1	0,5
15	Inosit - Palatinose - Rhamnose - Lipase -	1	0,5
16	Inosit - Palatinose - Cellobiose - Lipase -	1	0,5
17	Inosit - Palatinose - Lipase -	1	0,5
18	Inosit - $\alpha$ -Maltosidase - Lipase -	1	0,5
19	Lipase -	1	0,5
20	Inosit - Palatinose - L-Arabinose -	1	0,5
21	Palatinose - N-Acetyl- $\beta$ Glucosamidase - Cellobiose -	1	0,5
22	Palatinose - N-Acetyl- $\beta$ Glucosamidase -	1	0,5
23	Inosit - Cellobiose - Lipase - Sorbit +	1	0,5
24	5-Ketogluconat + Phenolrot + Rhamnose - Urease +	1	0,5
25	Palatinose - $\alpha$ -Maltosidase - Cellobiose - Sorbit +	1	0,5
26	L-Arabitol + Inosit - $\alpha$ -Maltosidase - Cellobiose - Sorbit +	1	0,5
27	Lysindecaboxylase + Inosit - $\alpha$ -Maltosidase - Cellobiose - Sorbit +	1	0,5
28	Lysindecaboxylase + Urease +	1	0,5
29	Inosit - $\alpha$ -Maltosidase - L-Arabinose -	1	0,5
30	Inosit - N-Acetyl- $\beta$ Glucosamidase - L-Arabinose -	1	0,5
31	Inosit - $\alpha$ -Maltosidase - Cellobiose -	1	0,5
32	N-Acetyl- $\beta$ Glucosamidase - L-Arabinose -	1	0,5
33	N-Acetyl- $\beta$ Glucosamidase - Palatinose -	1	0,5
34	N-Acetyl- $\beta$ Glucosamidase - $\alpha$ -Maltosidase -	1	0,5
35	Inosit - L-Arabinose - Cellobiose -	1	0,5
36	Indol + L-Arabinose -	1	0,5
37	Inosit - Palatinose - L-Arabitol + Urease +	1	0,5
37	L-Arabitol +	1	0,5

**API ZYM**

Die Ermittlung des Spektrums an Enzymaktivität bei ausgewählten *E. sakazakii*-, *E. cloacae*- und *Pantoea agglomerans*-Isolaten erfolgte mit dem API ZYM-System. Das API ZYM ist eine Mikromethode zum semiquantitativen Nachweis von Enzymaktivitäten. Es ermöglicht den schnellen und systematischen Nachweis von 19 Enzymen in sehr geringen Probenmengen. Alle 34 untersuchten *E. sakazakii*-Isolate waren im Gegensatz zu den anderen Enterobacter-Isolaten in der Lage  $\alpha$ -Glucosidase zu produzieren (Tab. 18). Im Vergleich zeigten ebenfalls ein hoher Prozentsatz an *E. sakazakii* Isolaten sowie *Pantoea agglomerans* eine positive Reaktion für  $\beta$ -Galactosidase (97%). *E. sakazakii* verfügt darüber hinaus über eine vermehrte Esterase- (97%), Esterase-Lipase - (97%) und  $\alpha$ -Mannosidase (94%) - Aktivität.

**Tabelle 18:** Enzymaktivität ausgewählter *Enterobacter sakazakii* - Isolate im Vergleich mit *Enterobacter cloacae* und *Pantoea agglomerans*

Enzym	% Anteil der Stämme mit positiver Enzymaktivität			
	Reaktionen	<i>E. sakazakii</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>Pantoea agglomerans</i>
	Referenzstamm ATCC 29544	(n=34)	(n=1)	(n=1)
Alkalische Phosphatase	+	94	100	100
Esterase	+	97	0	0
Esterase Lipase	+	97	0	0
Lipase	-	12	0	0
Leucin-Arylamidase	+	97	100	100
Valin-Arylamidase	-	68	0	0
Cystin-Arylamidase	-	44	0	0
Trypsin	-	53	0	0
Chymotrypsin	-	3	0	0
saure Phosphatase	+	94	0	100
Phosphoamidase	-	65	0	0
$\alpha$ -Galactosidase	+	100	0	100
$\beta$ -Galactosidase	+	97	0	100
$\beta$ -Glucuronidase	-	0	0	0
$\alpha$ -Glucosidase	+	100	0	0
$\beta$ -Glucosidase	+	9	0	100
N-Acetyl- $\beta$ -Glucosaminidase	+	71	0	0
$\alpha$ -Mannosidase	-	94	0	0
$\alpha$ -Fucosidase	-	3	0	0

Bei der Bestimmung der Empfindlichkeit der Isolate mit dem Agar-Diffusions-Verfahren nach Kirby-Bauer gegenüber 15 ausgewählten Antibiotika erwiesen sich nahezu alle 67 (99%-100%) *E. sakazakii*-Isolate als empfindlich gegenüber Ampicillin, Cefixim, Ciprofloxacin, Gentamicin, Kanamycin, Streptomycin, Oxytetracyclin, Neomycin und Tetracyclin. Eine variable Empfindlichkeit hingegen konnte gegenüber den Antibiotika Chloramphenicol, Erythromycin und Spectinomycin festgestellt werden. Gegenüber Methicillin, Oleandomycin und Sulphamethoxazol erwiesen sich alle untersuchten *E. sakazakii*-Isolate als resistent. Die Ergebnisse sind in Tabelle 19 dargestellt.

**Tabelle 19:** Nachweis der Antibiotikaempfindlichkeit von *Enterobacter sakazakii* – Isolaten (n= 67)

Antibiotikum	Hemmhofgröße (mm)			% Anteil der Empfindlichen Isolate	
	Mittelwert	Standardabweichung	Rang		
<u><b>β-Lactam: Penicilline</b></u>					
Ampicillin	2 µg	4	1,7	2-7	99
Methicillin	5 µg	0	0	0	0
<u><b>β-Lactam: Cephalosporin</b></u>					
Cefixime	5 µg	8	2,2	3-11	100
<u><b>Chinolone</b></u>					
Ciprofloxacin	5 µg	10	3,3	4-17	100
<u><b>Makrolide</b></u>					
Erythromycin	5 µg	1	1,0	1-2	30
<u><b>Aminoglykoside</b></u>					
Gentamicin	10 µg	3	1,1	2-6	100
Kanamycin	5 µg	3	1,0	2-5	100
Oleandomycin	15 µg	0	0	0	0
Spectinomycin	10 µg	3	2,1	1-10	76
Streptomycin	10 µg	3	1,0	1-6	99
<u><b>Tetracycline</b></u>					
Oxytetracycline	30 µg	8	2,2	5-15	99
Tetracycline	10 µg	6	1,7	3-11	100
<u><b>Antifolate</b></u>					
Sulphamethoxazole	25 µg	0	0	0	0
<u><b>Andere Antibiotika</b></u>					
Neomycin	10 µg	2	0,9	1-5	100
Chloramphenicol	10 µg	6	2,2	3-10	94

n=Anzahl der untersuchten Isolate

### 3.2.2 Genotypische Charakterisierung

#### 3.2.2.1 Amplifizierung eines speziesspezifischen Abschnitts des 16S rRNA-Gens

Zur Übersicht und zum Vergleich ausgewählter speziesspezifischer Primerpaare wurde die Sequenz des 16S rRNA-Gens (1449 Bp) des *E. sakazakii* Stamms JCM 1233 (Gendatenbank-Zugangsnummer AB004746) nach HARADA *et al.* (1996) herangezogen. Die Anlagerungsstellen der speziesspezifischen Oligonukleotidprimer nach LEHNER *et al.* (2004) ESakf sind an Nukleotidposition 58 bis 76 und Esakr an Position 966 bis 984 markiert. Die Primer nach HASSAN *et al.* (2005) Saka-1a an Nukleotidposition 975 bis 992 und Saka-2b an Position 39 bis 57 sowie die Primer Esak3 an Position 137 bis 158 und Esak2 969 bis 990 nach KEYSER *et al.* (2003) sind markiert (Abb. 12).

```

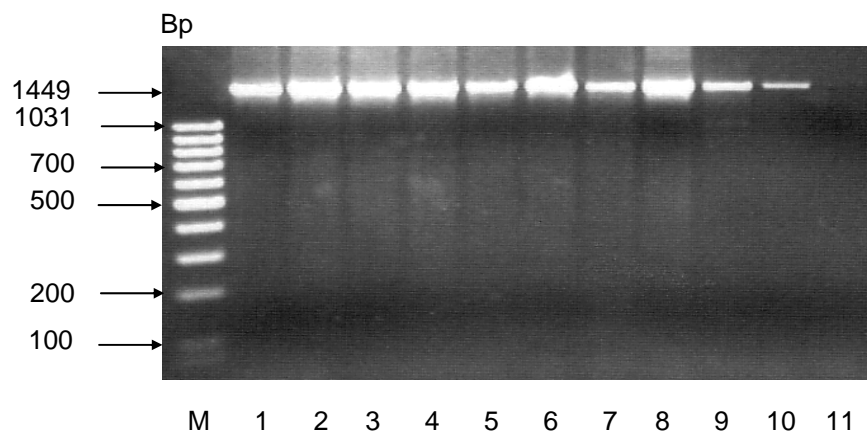
1 ACGCTGGCGG CAGGCCTAAC ACATGCAAGT CGAACGGTAA Saka-2b CAGGGAGCAG CTESakfTGCTGCTC
61 ESakfTGCTGACGAG TGGCGGACGG GTGAGTAATG TCTGGGAAAC TGCCTGATGG AGGGGGATAA
121 CTAESak3CTACTGGAAA CGGTAGCTAA TACCGCATAA CGTCTACGGA CCAAAGTGGG GGACCTTCGG
181 GCCTCATGCC ATCAGATGTG CCCAGATGGG ATTAGCTAGT AGGTGGGGTA ACGGCTCACC
241 TAGGCGACGA TCCCTAGCTG GTCTGAGAGG ATGACCAGCC AACTGGAAC TGAGACACGG
301 TCCAGACTCC TACGGGAGGC AGCAGTGGGG AATATTGCAC AATGGGCGCA AGCCTGATGC
361 AGCCATGCCG CGTGTATGAA GAAGGCCTTC GGGTTGTAAA GTACTTTCAG CGGGGAGGAA
421 GGTGTTGTGG TTAATAACCG CAGCAATTGA CGTTACCCGC AGAAGAAGCA CCGGCTAACT
481 CCGTGCCAGC AGCCGCGGTA ATACGGAGGG TGCAAGCGTT AATCGGAATT ACTGGGCGTA
541 AAGCGCACGC AGGCGGTTGA TTAAGTCAGA TGTGAAATCC CCGGGCTCAA CCTGGGAAct
601 GCATTTGAAA CTGGTCAGCT TGAGTCTCGT AGAGGGGGGT AGAATTCCAG GTGTAGCGGT
661 GAAATGCGTA GAGATCTGGA GGAATACCGG TGGCGAAGGC GGCCCCCTGG ACGAAGACTG
721 ACGCTCAGGT GCGAAAGCGT GGGGAGCAAA CAGGATTAGA TACCCTGGTA GTCCACGCCG
781 TAAACGATGT CGACTTGAGG GTTGTGCCCT TGAGGCGTGG CTTCCGGAGC TAACGCGTTA
841 AGTCGACCGC TGCGGGAGTA CGGCCGAAG GTTAAACTC AAATGAATTG ACGGGGGCCC
901 GCACAAGCGG TGGAGCATGT GGTTTAATTC GATGCAACGC GAAGAACCTT ACCTGGTCTT
961 GACATESakrCCAGAESak2GAATCCTGCASaka-1aGAGATGCGGG AGTGCCTTCG GGAACTCTGA GACAGGTGCT
1021 GCATGGCTGT CGTCAGCTCG TGTGTGAAA TGTGGGTTA AGTCCCGCAA CGAGCGCAAC
1081 CCTTATCCTT TGTTGCCAGC GGTTCGGCCG GGAACTCAA GGAGACTGCC GGTGATAAAC
1141 CGGAGGAAGG TGGGATGAC GTCAAGTCAT CATGGCCCTT ACGACCAGG CTACACACGT
1201 GCTACAATGG CGCATAAAA GAGAAGCGAC CTCGCGAGAG CAAGCGGACC TCATAAAGTG
1261 CGTCGTAGTC CGGATTGGAG TCTGCAACTC GACTCCATGA AGTCGGAATC GCTAGTAATC
1321 GTGGATCAGA ATGCCACGGT GAATACGTTT CCGGGCCTTG TACACACCGC CCGTCACACC
1381 ATGGGAGTGG GTTGCAAAAG AAGTAGGTAG CTTAACCTTC GGGAGGGCGC TTACCACTTT
1441 GTGATTCAT

```

**Abbildung 12:** Nukleotidsequenz des 16S rRNA-Gens von *Enterobacter sakazakii* mit 1449 Bp DNA. Die Unterschiede in den Anlagerungsstellen der Oligonukleotidprimer nach KEYSER *et al.* (2003) (grün), LEHNER *et al.* (2004) (rot) und HASSAN *et al.* (2005) (blau) sind markiert. Die DNA-Sequenz wurde von HARADA *et al.* (1996) (Gendatenbank-Zugangsnummer AB004746) beschrieben.

### 3.2.2.2 Nachweis *E. sakazakii*-spezifischer Genabschnitte

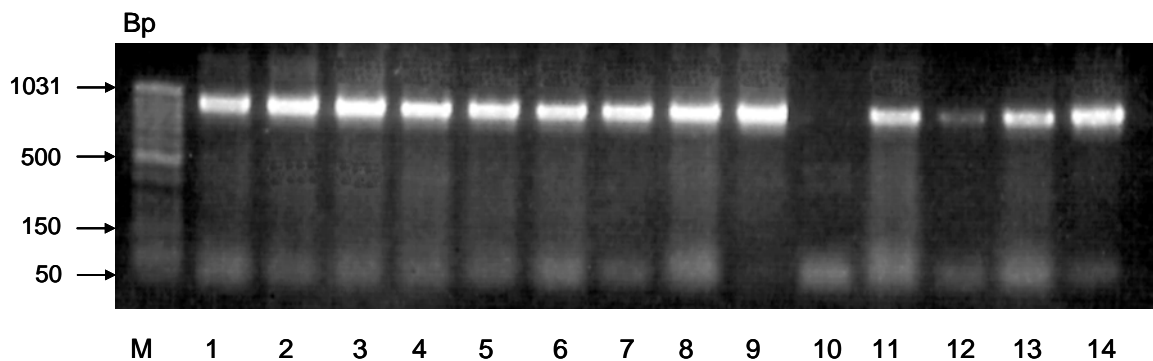
Eine weitergehende Identifizierung und Charakterisierung der untersuchten Isolate erfolgte durch PCR-vermittelte Nachweise speziesspezifischer Genabschnitte (3.12.1.2). Die Identifizierung der *E. sakazakii*-Isolate 36, 64, 95, 107, 128, 148, 149, 159, 345 und 348 (Spur 1-10) erfolgte für das 16S rRNA-Gen in voller Länge mit 1449 Bp (Abb. 13). Die PCR-Amplifizierung ergab für alle untersuchten *E. sakazakii*-Isolate ein Amplikon mit einer einheitlichen Größe von der erwarteten Länge.



**Abbildung 13:** Amplikon eines speziesspezifischen Abschnitts der 16S rRNA von *Enterobacter sakazakii* mit einer Größe von 1449 Bp unter Verwendung der spezifischen Primer 660V-1 und 630R. *E. sakazakii*-Isolate: 36, 64, 95, 107, 128, 148, 149, 159, 345 und 348 (Spur 1-10); M = GeneRular™ 100 Bp DNA Ladder (MBI Fermentas).

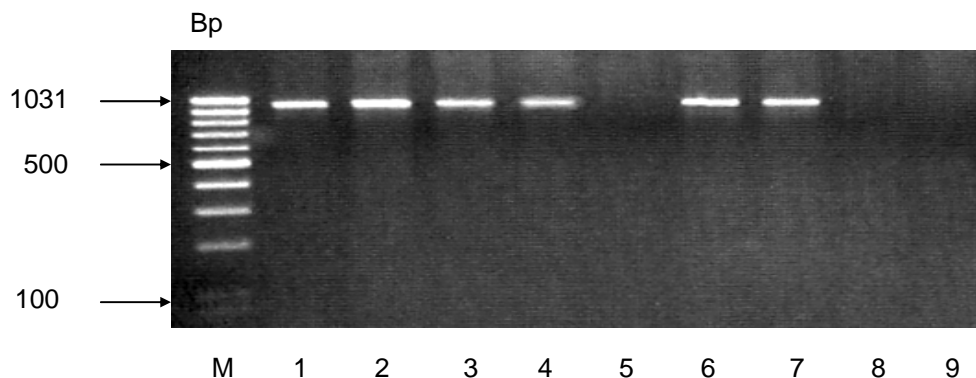
Zur molekularbiologischen Identifizierung wurden jeweils eine kommerzielle Methode (BAX®-System) sowie zwei weitere PCR-Methoden auf Basis des 16S rRNA-Gens (PCR-1 bzw. PCR-2) sowie zusätzlich eine PCR-Methode zum Nachweis des MMS-Gens (PCR-3) eingesetzt.

Das Amplifizieren des 16S rRNA-Gens mit den in 3.12.1.2. beschriebenen *E. sakazakii*-spezifischen Oligonukleotidprimer nach STEPHAN *et al.* (2004) (PCR-1) ergab für 84 *E. sakazakii*-Isolate nach gelelektrophoretischer Auswertung ein Amplikon mit der erwarteten einheitlichen Größe von 929 Bp. Für drei von 19 *Enterobacteriaceae*-Isolaten (nicht-*E. sakazakii*) und für zehn von 32 *Enterobacter*-Spezies (nicht-*E. sakazakii*) wurde ebenfalls ein Amplikon mit dieser Größe ermittelt (Tab. 20 und Abb. 14).



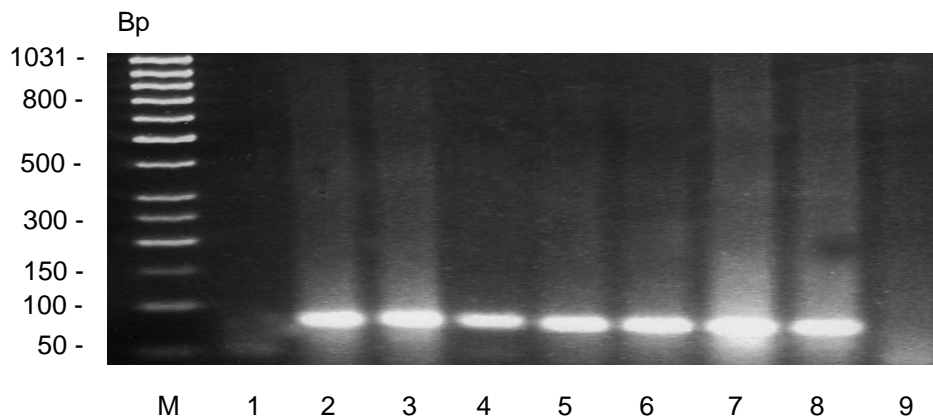
**Abbildung 14:** Amplikon eines speziesspezifischen Abschnitts der 16S rRNA von *Enterobacter sakazakii* mit einer Größe von 929 Bp unter Verwendung der spezifischen Primer Esakf und Esakr. *E. sakazakii*-Isolate: 54 bis 62 (Spur 1-9) und 64, 65, 67, 68 (Spur 11-14), *E. cloacae*-Isolat 66 (Spur 10); M = GeneRuler™ 50 Bp DNA Ladder (MBI Fermentas).

Im Weiteren erfolgte das Amplifizieren des 16S rRNA-Gens mit den in 3.12.1.2 beschriebenen *E. sakazakii*-spezifischen Oligonukleotidprimer nach HASSAN *et al.* (2005) (PCR-2) Es war bei allen 84 *E. sakazakii*-Isolaten ein Amplikon von 952 Bp nachweisbar. Für alle mitgeführten *Enterobacteriaceae*- ( $n=19$ ) (nicht-*E. sakazakii*) und *Enterobacter*-Isolaten ( $n=32$ ) (nicht-*E. sakazakii*) konnte bei keinem der PCR-Ansätze ein Fragment dieser Größe erhalten werden (Tab. 20 und Abb. 15).



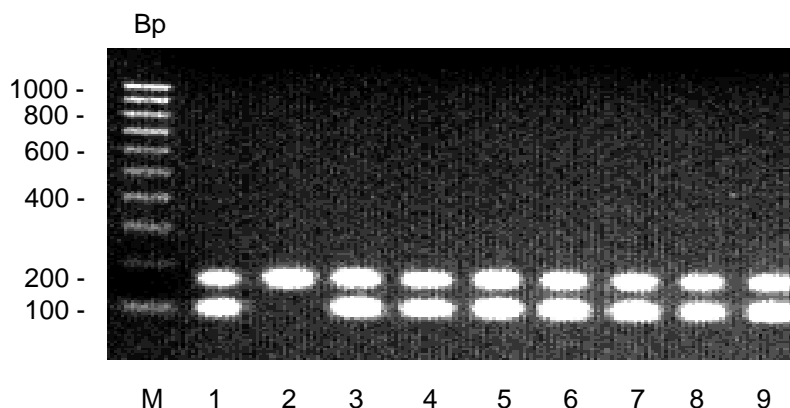
**Abbildung 15:** Amplikon eines speziesspezifischen Abschnitts der 16S rRNA von *Enterobacter sakazakii* mit einer Größe von 952 Bp unter Verwendung der spezifischen Primer Saka-1 and Saka-2b nach HASSAN *et al.* (2005). *E. sakazakii* Isolate 36, 64, 95, 107 (Spur 1-4), 148 und 149 (Spur 6-7). Negative Reaktion mit *E. cloacae* (Spur 5 und 8), und Mastermix ohne DNA (Spur 9). M = GeneRuler™ 100 Bp DNA Ladder (MBI Fermentas).

Bei dem Amplifizieren des *E. sakazakii*-spezifischen Abschnitts des Macro Molecular Synthesis-Gens mit dem in 3.12.1.2 beschriebenen Oligonukleotidprimer nach SEO und BRACKETT (2005) (PCR-3) konnte für alle 84 *E. sakazakii*-Isolate ein Amplikon mit 78 Bp nachgewiesen werden. Alle untersuchten *Enterobacteriaceae*- (n=19) (nicht-*E. sakazakii*) und *Enterobacter*-Isolate (n=32) (nicht-*E. sakazakii*) ergaben in der Untersuchung einheitlich kein Amplikon (Tab. 20 und Abb. 16).



**Abbildung 16:** Amplikon eines speziesspezifischen Abschnitts des MMS-Gens von *Enterobacter sakazakii* (Spur 2-8) mit einer Größe von 78 Bp unter Verwendung der spezifischen Primer MM1 und MM2 nach SEO und BRACKETT (2005). Negative Reaktion für *Pantoea* spp. (Spur 1) und Negativkontrolle (Spur 9). M = GeneRular™ 50 Bp DNA Ladder (MBI Fermentas).

Der PCR vermittelte Nachweis von *E. sakazakii* mit dem BAX-PCR-System ergab für alle untersuchten 84 *E. sakazakii* Isolate ein positives Amplikon von 100 Bp. Es wurde ebenfalls für 5 von 29 *Enterobacteriaceae*- (nicht-*E. sakazakii*) und 9 von 32 *Enterobacter* (nicht-*E. sakazakii*) -Isolaten ein positives Amplikon ermittelt (Tab. 20 und Abb. 17).



**Abbildung 17:** Amplifizierung eines *E. sakazakii*-spezifischen Abschnitts der 16S rRNA-Gens unter Verwendung der BAX®-PCR mit einer Größe von 100 Bp (Spur 1 und 3-9). Negative Reaktion für die Negativ-Kontrolle (Spur 2). Kontrollbande bei 200 Bp. M = GeneRular™ 100 Bp DNA Ladder (MBI Fermentas).

**Tabelle 20:** Übersicht zur Spezifität und Sensitivität verschiedener PCR-Systeme im Vergleich

	PCR-1	PCR-2	PCR-3	BAX <sup>®</sup> -System
<b>Spezifität</b>	74,5%	100%	100%	72,5%
<b>Sensitivität</b>	100%	100%	100%	100%
<b>Positiv (n)</b>	84	84	84	84
<b>Negativ (n)</b>	38	51	51	37
<b>Falsch positiv (n)</b>	13	0	0	14
<b>Falsch negativ (n)</b>	0	0	0	0

PCR-1 nach STEPHAN *et al.* (2005); PCR-2 nach HASSAN *et al.* (2004); PCR-3 nach SEO und BRACKETT *et al.* (2005); n= Anzahl der untersuchten Isolate; % Sensitivität=100 x (richtig positive/[richtig positive + falsch negative]); % Spezifität=100 x (richtig positive/[richtig positive + falsch positive])

In der vergleichenden Untersuchung zeigte die PCR-1-Methode nach Stephan *et al.* (2005) bis zu 74,5% spezifische, d.h. vermehrt richtige positive Ergebnisse, zumal eine Kreuzreaktion mit 13 Bakterienspezies zu erkennen ist (Tab. 21). Die Methode auf Basis der 16S rRNA (PCR-2) nach HASSAN *et al.* (2004) und des MMS-Gens (PCR-3) nach SEO und BRACKETT *et al.* (2005) erzielte eine 100%ige speziesspezifische Reaktion für alle in dieser Studie eingesetzten Bakterienstämme. Die im BAX<sup>®</sup>-System getesteten *E. sakazakii*-Isolate wurden zu 100% erkannt.

**Tabelle 21:** Vergleich verschiedener PCR-Methoden zum Nachweis von *Enterobacter sakazakii*

Verwendete Bakterienstämme (NCC)	Anzahl	PCR-System			
		PCR-1*	PCR-2*	PCR-3*	BAX® System
<i>E. sakazakii</i> (LMG: 2759, 2758, 2760, 2762, 2766, ATCC 29544)	5	+	+	+	+
<i>E. sakazakii</i> (37, 43, 44, 50, 56, 59, 60, 67, 68, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 81, 88, 90, 93, 108, 109, 132, 133, 134, 136, 144, 145, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 402, 403, 404, 405, 406, 407, 408, 409, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 420, 421, 422, 423, 424, 425, 426, 427, 428, 429, 430, 431, 432, 433, 434, 435, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450, 451, 452, 453, 454, 455, 456, 457, 458, 459, 460, 461, 462, 463, 464, 465, 466, 467, 468, 469, 470, 471, 472, 473, 474, 475, 476, 477, 478, 479, 480, 481, 482, 483, 484, 485, 486, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499, 500, 501, 502, 503, 504, 505, 506, 507, 508, 509, 510, 511, 512, 513, 514, 515, 516, 517, 518, 519, 520, 521, 522, 523, 524, 525, 526, 527, 528, 529, 530, 531, 532, 533, 534, 535, 536, 537, 538, 539, 540, 541, 542, 543, 544, 545, 546, 547, 548, 549, 550, 551, 552, 553, 554, 555, 556, 557, 558, 559, 560, 561, 562, 563, 564, 565, 566, 567, 568, 569, 570, 571, 572, 573, 574, 575, 576, 577, 578, 579, 580, 581, 582, 583, 584, 585, 586, 587, 588, 589, 590, 591, 592, 593, 594, 595, 596, 597, 598, 599, 600, 601, 602, 603, 604, 605, 606, 607, 608, 609, 610, 611, 612, 613, 614, 615, 616, 617, 618, 619, 620, 621, 622, 623, 624, 625, 626, 627, 628, 629, 630, 631, 632, 633, 634, 635, 636, 637, 638, 639, 640, 641, 642, 643, 644, 645, 646, 647, 648, 649, 650, 651, 652, 653, 654, 655, 656, 657, 658, 659, 660, 661, 662, 663, 664, 665, 666, 667, 668, 669, 670, 671, 672, 673, 674, 675, 676, 677, 678, 679, 680, 681, 682, 683, 684, 685, 686, 687, 688, 689, 690, 691, 692, 693, 694, 695, 696, 697, 698, 699, 700, 701, 702, 703, 704, 705, 706, 707, 708, 709, 710, 711, 712, 713, 714, 715, 716, 717, 718, 719, 720, 721, 722, 723, 724, 725, 726, 727, 728, 729, 730, 731, 732, 733, 734, 735, 736, 737, 738, 739, 740, 741, 742, 743, 744, 745, 746, 747, 748, 749, 750, 751, 752, 753, 754, 755, 756, 757, 758, 759, 760, 761, 762, 763, 764, 765, 766, 767, 768, 769, 770, 771, 772, 773, 774, 775, 776, 777, 778, 779, 780, 781, 782, 783, 784, 785, 786, 787, 788, 789, 790, 791, 792, 793, 794, 795, 796, 797, 798, 799, 800, 801, 802, 803, 804, 805, 806, 807, 808, 809, 810, 811, 812, 813, 814, 815, 816, 817, 818, 819, 820, 821, 822, 823, 824, 825, 826, 827, 828, 829, 830, 831, 832, 833, 834, 835, 836, 837, 838, 839, 840, 841, 842, 843, 844, 845, 846, 847, 848, 849, 850, 851, 852, 853, 854, 855, 856, 857, 858, 859, 860, 861, 862, 863, 864, 865, 866, 867, 868, 869, 870, 871, 872, 873, 874, 875, 876, 877, 878, 879, 880, 881, 882, 883, 884, 885, 886, 887, 888, 889, 890, 891, 892, 893, 894, 895, 896, 897, 898, 899, 900, 901, 902, 903, 904, 905, 906, 907, 908, 909, 910, 911, 912, 913, 914, 915, 916, 917, 918, 919, 920, 921, 922, 923, 924, 925, 926, 927, 928, 929, 930, 931, 932, 933, 934, 935, 936, 937, 938, 939, 940, 941, 942, 943, 944, 945, 946, 947, 948, 949, 950, 951, 952, 953, 954, 955, 956, 957, 958, 959, 960, 961, 962, 963, 964, 965, 966, 967, 968, 969, 970, 971, 972, 973, 974, 975, 976, 977, 978, 979, 980, 981, 982, 983, 984, 985, 986, 987, 988, 989, 990, 991, 992, 993, 994, 995, 996, 997, 998, 999, 1000)	79	+	+	+	+
<b><u>Enterobacter Spezies</u></b>					
<i>Enterobacter</i> spp. EN114	1	-	-	-	-
<i>E. cloacae</i> (180, 63, 65, 151, 188, 193, 200, 203)	8	+	-	-	(3+) (5-)
<i>E. asburiae</i> ATCC 35953	1	+	-	-	-
<i>E. asburiae</i> (135)	1	+ <sup>1</sup>	-	-	+
<i>E. cancerogenes</i> ATCC 33241	1	+	-	-	-
<i>E. nimipessuralis</i> ATCC 9912	1	-	-	-	-
<i>E. aerogenes</i> DSM 30053	1	-	-	-	-
<i>E. kobei</i> ATCC BAA-260	1	+	-	-	-
<i>E. gerogoviae</i> ATCC 33028	1	-	-	-	-
<i>E. amnigenus</i> ATCC 33072	1	-	-	-	+
<i>E. intermedius</i> ATCC 33110	1	+	-	-	-
<i>E. hormachi</i> ATCC 49162	1	-	-	-	-
<i>E. pyrinus</i> ATCC 49851	1	-	-	-	-
<i>E. dissolvens</i> ATCC 23373	1	-	-	-	-
<i>Pantoea agglomerans</i> DSM 3493	1	-	-	-	+
<i>Pantoea</i> spp (51, 177, 178, 179, 196)	5	+	-	-	(+1); (4-)
<i>Pantoea</i> spp1. (85, 189, 197, 198)	4	(+3); (1-)	-	-	(+2); (2-)
<i>Pantoea</i> spp3. (86)	1	-	-	-	-
<b><u>Enterobacteriaceae Spezies</u></b>					
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (87)	1	-	-	-	-
<i>K. oxytoca</i> DSM 5176	1	-	-	-	+
<i>E. vulneris</i> (204)	1	-	-	-	+
<i>Serratia rubidea</i> (512)	1	-	-	-	+
<i>Serratia marcescens</i> (513)	1	-	-	-	+
<i>E. coli</i> (514, 515)	2	-	-	-	-
<i>Proteus mirabilis</i> (516)	1	-	-	-	-
<i>P. vulgaris</i> MHI 913 (517)	1	-	-	-	-
<i>Citrobacter freundii</i> 2/18 (518)	1	+	-	-	-
<i>C. koseri</i> 1/1 (519)	1	-	-	-	-
<i>C. amalonaticus</i> 172 (520)	1	-	-	-	-
<i>Hafnia alvei</i> 2/14 (521)	1	+	-	-	-
<i>Salmonella choleraesuis</i> MHI 976 (522)	1	-	-	-	-
<i>S. infantis</i> M 144/02 (523)	1	-	-	-	-
<i>S. thyphimurium</i> ATCC 19585 (525)	1	-	-	-	-
<i>L. adecarboxylata</i> (137, 199, 202)	3	+	-	-	(1+) (2-)

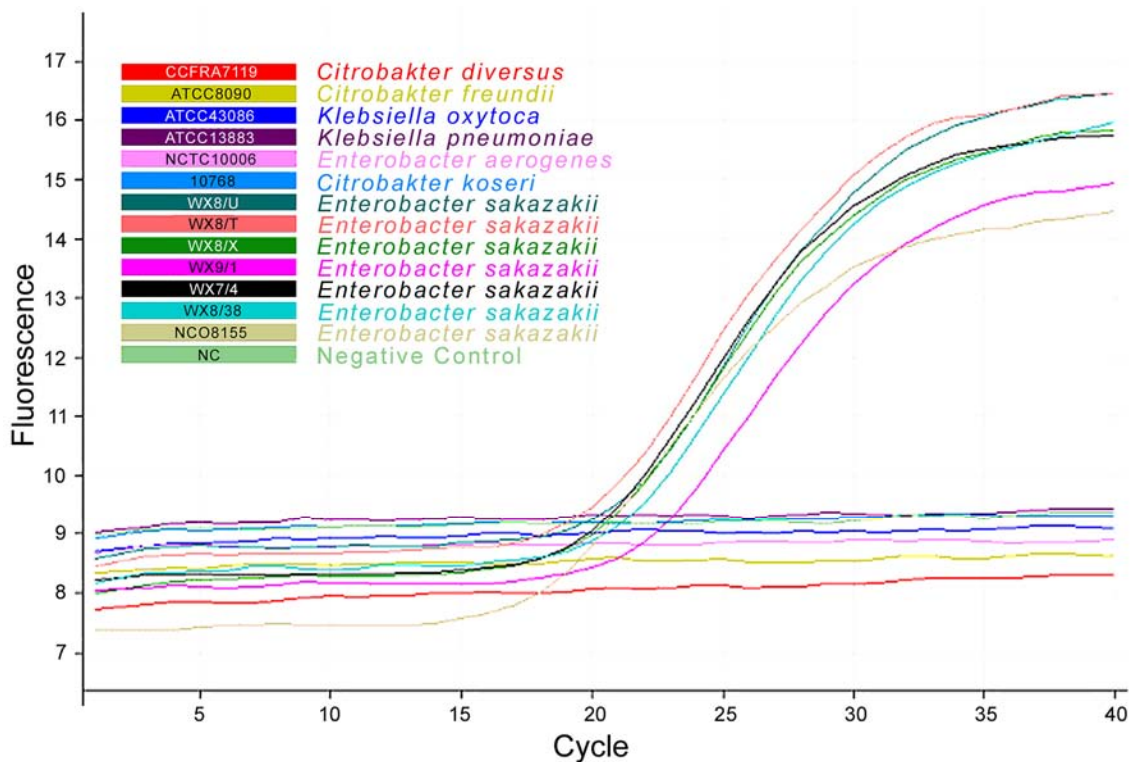
\* PCR-1 nach STEPHAN *et al.* (2005); PCR-2 nach HASSAN *et al.* (2004); PCR-3 nach SEO und BRACKETT *et al.* (2005)<sup>1</sup> = als *E. sakazakii* und *E. vulneris* identifiziert;

**Realtime PCR (qPCR)**

Der spezifische Nachweis von *E. sakazakii* mit den in 3.1.3 beschriebenen Primern und Probe zeigte für alle 61 untersuchten *E. sakazakii*-Isolate in der qPCR ein positives Signal (Tab. 22). Die *Enterobacteriaceae*-Spezies *Citrobacter diversus*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter koseri*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae* und *Enterobacter aerogenes* konnten in der qPCR als negativ bewertet werden (Abb. 18).

**Tabelle 22:** Übersicht der untersuchten Bakterienstämme in der *realtime* PCR

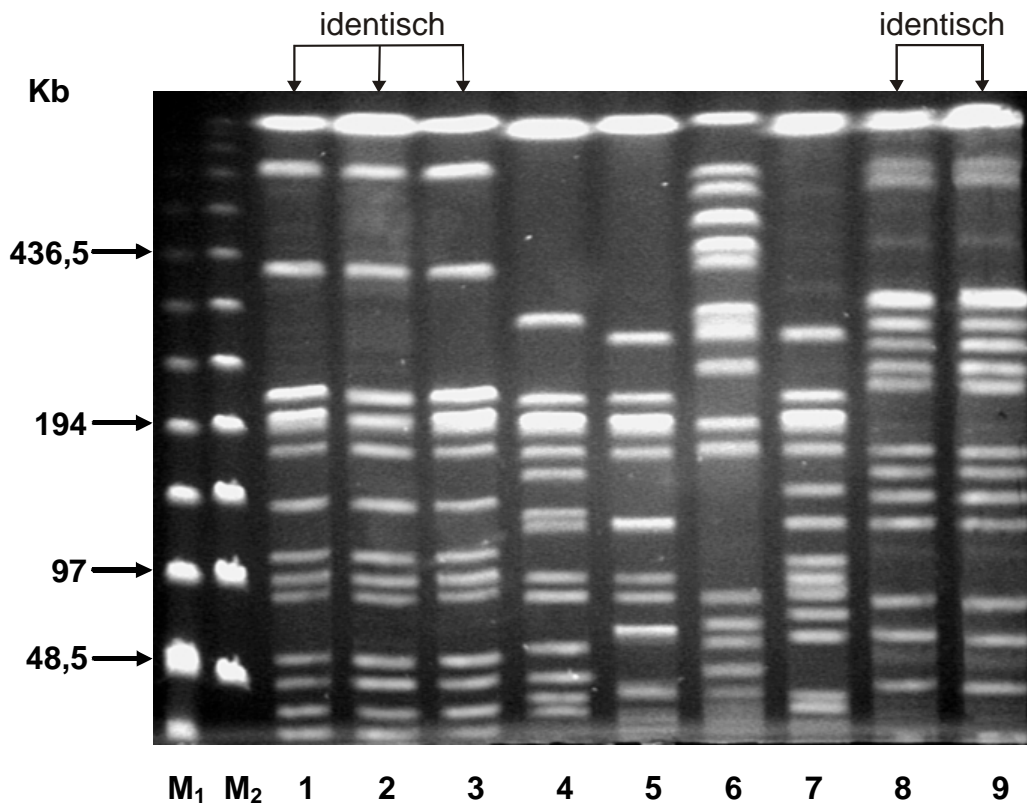
Verwendete Bakterienstämme (NCC)	Anzahl	qPCR
<i>Enterobacter sakazakii</i> (36, 37, 43, 44, 45, 49, 50, 52, 53, 59, 73, 74, 75, 76, 79, 80, 82, 83, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 110, 112, 162, 172, 187, 191, 195, 201, 205, 206, 207, 208, 228, 254, 255, 304, 305, 306)	54	+
<i>Enterobacter sakazakii</i> (WX8/U, WX8/T, WX8/X, WX9/1, WX7/4, WX8/38)	6	+
<i>Enterobacter sakazakii</i> NCTC 8155	1	+
<i>Citrobacter diversus</i> CCFRA 7119	1	-
<i>Citrobacter freundii</i> ATCC 8090	1	-
<i>Citrobacter koseri</i> WX10768	1	-
<i>Klebsiella oxytoca</i> ATCC 43086	1	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	1	-
<i>Enterobacter aerogenes</i> NCTC 10006	1	-



**Abbildung 18:** Nachweis von *Enterobacter sakazakii* mit der *realtime* PCR

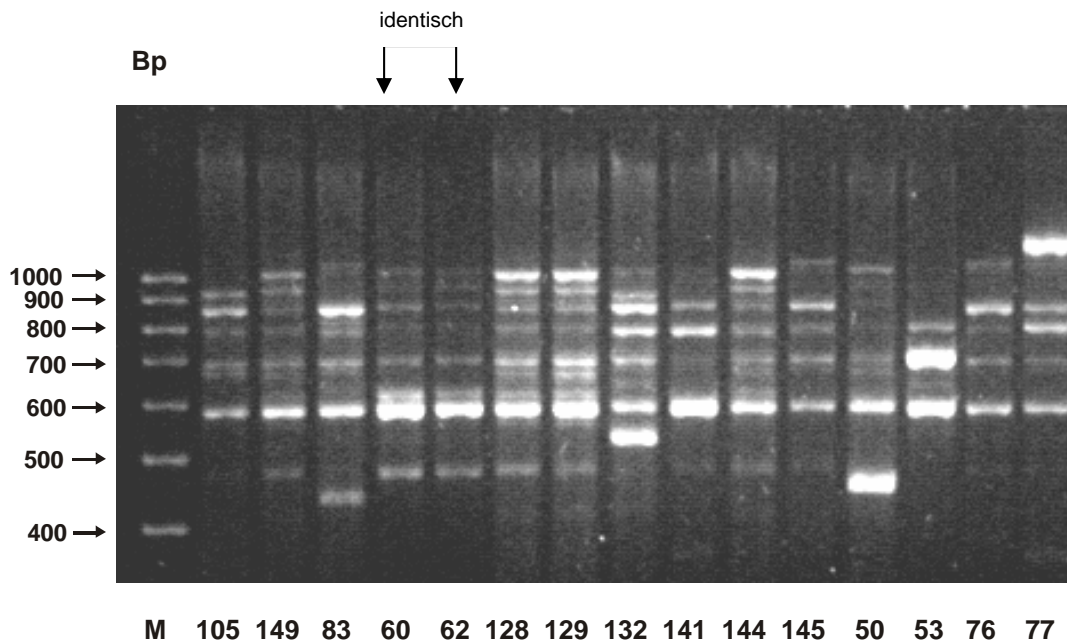
### 3.2.2.3 Typisierung von *E. sakazakii* mittels PFGE und RAPD - Ergebnisse des „DNA-Fingerprinting“

Die Ergebnisse der in dieser Arbeit entwickelten PFGE-Methodik ermöglichen eine deutliche Differenzierung sowie eine Feintypisierung der untersuchten *E. sakazakii*-Isolate. Die Makrorestriktionsanalyse der chromosomalen DNA mittels PFGE erfolgten mit den unter 4.1 aufgeführten 67 *E. sakazakii*-Isolaten, die Präparation der DNA sowie der Restriktionsverdau wie unter 3.1.15 beschrieben. Das verwendete Restriktionsenzym *Xba*I (T↓CTAGA) ergab für alle 67 Isolate reproduzierbare DNA-Fingerprintmuster. Nach Auftrennung der Fragmente konnten insgesamt 37 DNA-Restriktionsmuster unterschieden werden (Tabelle 24), die Anzahl der mittels PFGE auftrennbaren Fragmente (Banden) lag je nach Isolat zwischen 8 und 18 (Abb.19).

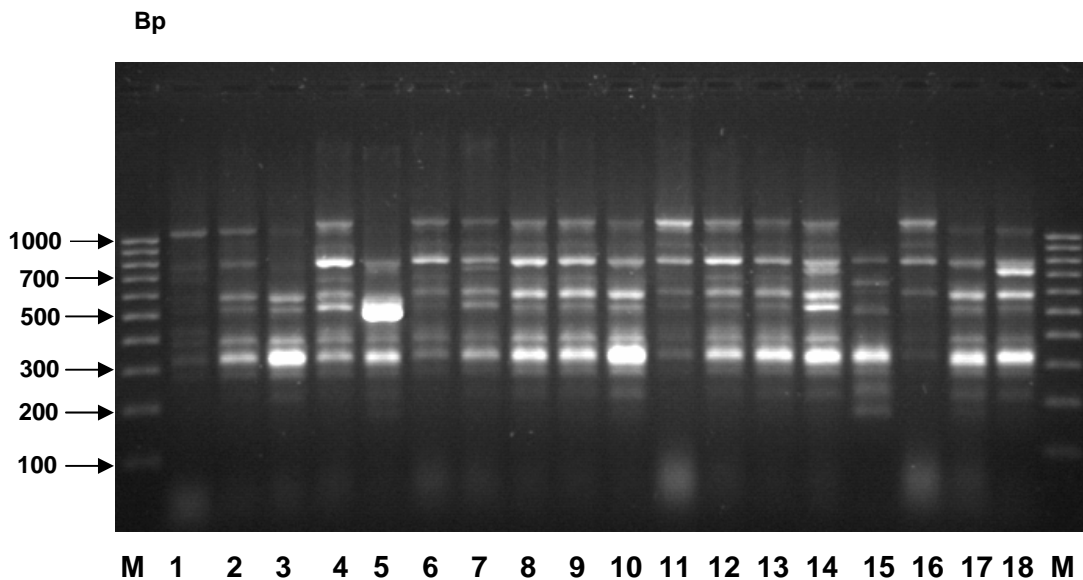


**Abbildung 19:** Beispiel verschiedener Restriktionsmuster nach Verdau der genomischen DNA mit *Xba*I. Spur 1 - 3: drei identische Isolate aus Asien; Spur 4-7: Isolate aus Europa; Spur 8-9: zwei identische Isolate aus Europa; M<sub>1</sub>: „low range“ PFGE Marker (0,1 - 200 Kb) und M<sub>2</sub>: Lambda Ladder PFGE Marker (50 - 1000 Kb).

Mit der RAPD konnten unter Verwendung von zwei verschiedenen Primern M13 Core und T3b 39 und 27 unabhängige Bandenmuster erhalten werden. Die erhaltenen DNA-Fragmente hatten bei beiden Primern eine Größe von 300-2500 Basenpaare (Abb. 20 und 21) ermittelt. In Abb. 20 zeigen Spur 4 und 5 identische Stämme auf, welche ebenfalls im PFGE ein identisches Muster aufzeigten.



**Abbildung 20:** RAPD von *Enterobacter sakazakii* unter Verwendung des universellen Primers M13 Core, M=GeneRular™ 100 Bp DNA Ladder (MBI Fermentas).



**Abbildung 21:** RAPD von *Enterobacter sakazakii* unter Verwendung des universellen Primers T3b, M=GeneRular™ 100 Bp DNA Ladder (MBI Fermentas).

Legt man die PFGE als Referenzmethode zu Grunde können 41 Stämme Clustern mit mehr als zwei Stämmen, aufgrund einer Übereinstimmung im Restriktionsmuster bzw. Bandenmuster, zugeordnet werden. Davon werden 35 mit dem Primer M13 Core bzw. 32 mit dem Primer T3b auch im RAPD entsprechend klassifiziert. Bei einer Kombination beider Primersysteme werden 28 Stämme ermittelt.

Ausgehend von den Ergebnissen der RAPD mit kombinierten Primern, also 28 Stämme in 9 Clustern, können diese auch mit der PFGE bestätigt werden (Tab. 23).

**Tabelle 23:** Ergebnisübersicht des RAPD-Fingerprinting und der PFGE. Übereinstimmende Clusterbildung im Vergleich der Primer M13 Core und T3B mit der PFGE

Vergleich PFGE mit RAPD (n=67)				
	PFGE	RAPD (M13 Core und T3b)	RAPD M13 Core	RAPD T3b
<b>Übereinstimmend*</b>	41	28	35	32
<b>Cluster** (≥2 Stämme)</b>	11	9	10	10
Vergleich RAPD mit PFGE (n=67)				
	RAPD (M13 Core und T3b)		PFGE	
<b>Übereinstimmend*</b>	28		28	
<b>Cluster** (≥2 Stämme)</b>	9		9	

\* Anzahl der Stämme, die Clustern  $\geq 2$  zugeordnet werden konnten

\*\* Ein Cluster ist in diesen Untersuchungen mit größer oder gleich zwei Isolaten desselben Types definiert.

Im Vergleich der PFGE-Restriktionsmuster und der RAPD-Bandenmuster mit dem Biotyp konnte keine Korrelation festgestellt werden (Tab.24).

Hinsichtlich der Restriktionsmuster in der PFGE für *E. sakazakii* „gleicher Herkunft“ wiesen die Isolate aus dem gleichen Herkunftsort (E) überwiegend (n=11) jeweils ein einheitliches Restriktionsmuster auf (Tab.24). In mehreren Fällen (n=4) waren jedoch bereits deutliche Unterschiede im Restriktionsmuster selbst für Isolate aus einem Herkunftsort (D) festzustellen. Die größte genotypische Vielfalt wurde mit siebzehn unterschiedlichen Restriktionsmustern (P21 bis P37) für 17 Isolate aus einem Herkunftsort festgestellt, für andere Herkunftsorte (E) wurden bis zu sechs verschiedene Restriktionstypen festgestellt. Dies deutet darauf hin, dass die Kontaminationsquellen von Säuglingsnahrung mit *E. sakazakii* sehr vielfältig und damit nicht einer einzigen Quelle zuzuordnen sind. Zwischen den Isolaten aus verschiedenen Herkunftsorten bestand nur in drei Fällen eine Übereinstimmung (F, A und C). Bis auf diese Ausnahmen waren alle *E. sakazakii* Isolate aus verschiedenen Herkunftsorten in ihren Restriktionsmustern deutlich verschieden.

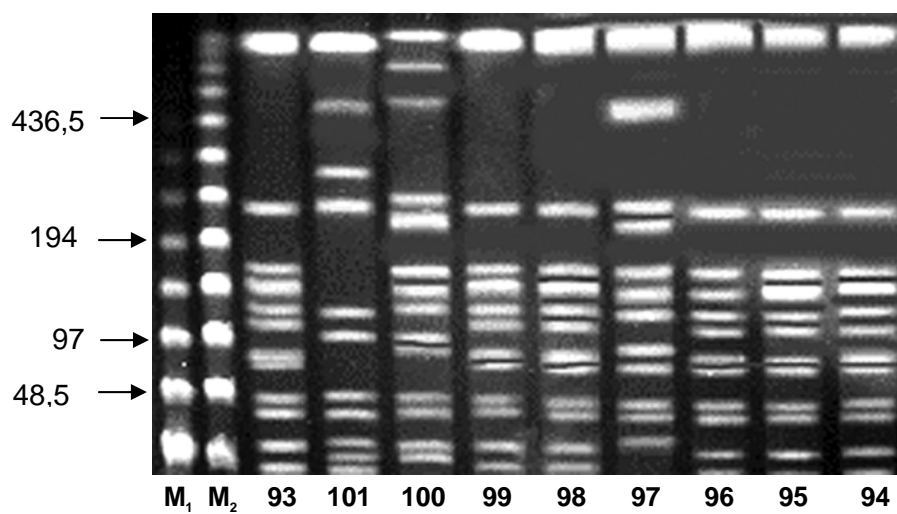
**Tabelle 24:** Verteilung der PFGE-Restriktionsmuster von *E. sakazakii*-Isolate nach Verdau mit dem Restriktionsenzym *Xba*I und RAPD-Bandenmuster unter Verwendung der Primer M13 Core und T3b im Vergleich zum Biotyp

Verwendete Isolate	Herkunftsort	Biotyp	PFGE	RAPD M13 Core	RAPD T3B
<i>E. sakazakii</i> 76	E	10	P1	R10	R4
<i>E. sakazakii</i> 89	E	17	P1	R5	R11
<i>E. sakazakii</i> 90	E	2	P1	R5	R11
<i>E. sakazakii</i> 91	E	32	P1	R5	R11
<i>E. sakazakii</i> 93	E	22	P1	R5	R11
<i>E. sakazakii</i> 94	E	20	P1	R5	R11
<i>E. sakazakii</i> 95	E	11	P1	R5	R11
<i>E. sakazakii</i> 96	E	16	P1	R5	R11
<i>E. sakazakii</i> 98	E	5	P1	R16	R13
<i>E. sakazakii</i> 99	E	12	P1	R5	R14
<i>E. sakazakii</i> 185	E	34	P1	R36	R20
<i>E. sakazakii</i> 82	B	14	P2	R3	R7
<i>E. sakazakii</i> 50	B	2	P2	R3	R1
<i>E. sakazakii</i> 67	C	7	P3	R39	R27
<i>E. sakazakii</i> 77	D	2	P4	R11	R4
<i>E. sakazakii</i> 127	D	8	P5	R28	R18
<i>E. sakazakii</i> 132	D	2	P6	R29	R18
<i>E. sakazakii</i> 148	I	4	P7	R33	R20
<i>E. sakazakii</i> 128	H	24	P8	R8	R18
<i>E. sakazakii</i> 129	H	24	P8	R8	R18
<i>E. sakazakii</i> 149	D	36	P8	R34	R20
<i>E. sakazakii</i> 152	Unbekannt	5	P9	R35	R20
<i>E. sakazakii</i> 186	E	34	P10	R36	R26
<i>E. sakazakii</i> 141	E	5	P11	R30	R19
<i>E. sakazakii</i> 88	E	2	P12	R14	R10
<i>E. sakazakii</i> 97	E	17	P13	R15	R12
<i>E. sakazakii</i> 100	E	15	P14	R17	R15
<i>E. sakazakii</i> 53	Unbekannt	13	P15	R1	R2
<i>E. sakazakii</i> 54	Unbekannt	3	P15	R1	R2
<i>E. sakazakii</i> 55	Unbekannt	1	P15	R1	R2
<i>E. sakazakii</i> 56	Unbekannt	14	P15	R1	R2
<i>E. sakazakii</i> 57	Unbekannt	1	P15	R1	R2
<i>E. sakazakii</i> 59	Unbekannt	12	P16	R2	R3
<i>E. sakazakii</i> 60	Unbekannt	4	P17	R2	R3
<i>E. sakazakii</i> 62	Unbekannt	2	P17	R2	R3
<i>E. sakazakii</i> 83	H	2	P18	R12	R8
<i>E. sakazakii</i> 84	Unbekannt	6	P19	R13	R9
<i>E. sakazakii</i> 205	F	4	P20	R6	R24
<i>E. sakazakii</i> 206	F	4	P20	R6	R22
<i>E. sakazakii</i> 207	F	4	P20	R6	R25
<i>E. sakazakii</i> 208	F	3	P20	R6	R22
<i>E. sakazakii</i> 209	A	24	P20	R6	R22
<i>E. sakazakii</i> 192	C	2	P20	R34	R21
<i>E. sakazakii</i> 101	C	10	P21	R9	R16
<i>E. sakazakii</i> 102	C	9	P21	R9	R16
<i>E. sakazakii</i> 103	C	27	P22	R18	R17
<i>E. sakazakii</i> 109	C	1	P22	R18	R17
<i>E. sakazakii</i> 111	C	8	P22	R18	R17
<i>E. sakazakii</i> 104	C	3	P23	R19	R18
<i>E. sakazakii</i> 105	C	5	P24	R20	R18
<i>E. sakazakii</i> 106	C	9	P25	R21	R19
<i>E. sakazakii</i> 107	C	5	P26	R22	R19
<i>E. sakazakii</i> 108	C	1	P27	R23	R20
<i>E. sakazakii</i> 110	C	19	P28	R24	R18
<i>E. sakazakii</i> 114	C	27	P28	R26	R18
<i>E. sakazakii</i> 112	C	9	P29	R7	R18
<i>E. sakazakii</i> 113	C	8	P29	R7	R18
<i>E. sakazakii</i> 115	C	33	P30	R27	R18
<i>E. sakazakii</i> 201	G	21	P31	R38	R23
<i>E. sakazakii</i> 144	C	27	P32	R31	R20
<i>E. sakazakii</i> 145	C	34	P33	R32	R20
<i>E. sakazakii</i> 190	C	2	P34	R37	R20
<i>E. sakazakii</i> 191	C	5	P35	R37	R21
<i>E. sakazakii</i> 78	C	3	P36	R4	R5
<i>E. sakazakii</i> 79	C	3	P36	R4	R6
<i>E. sakazakii</i> 81	C	1	P36	R4	R6
<i>E. sakazakii</i> 80	C	3	P37	R4	R7

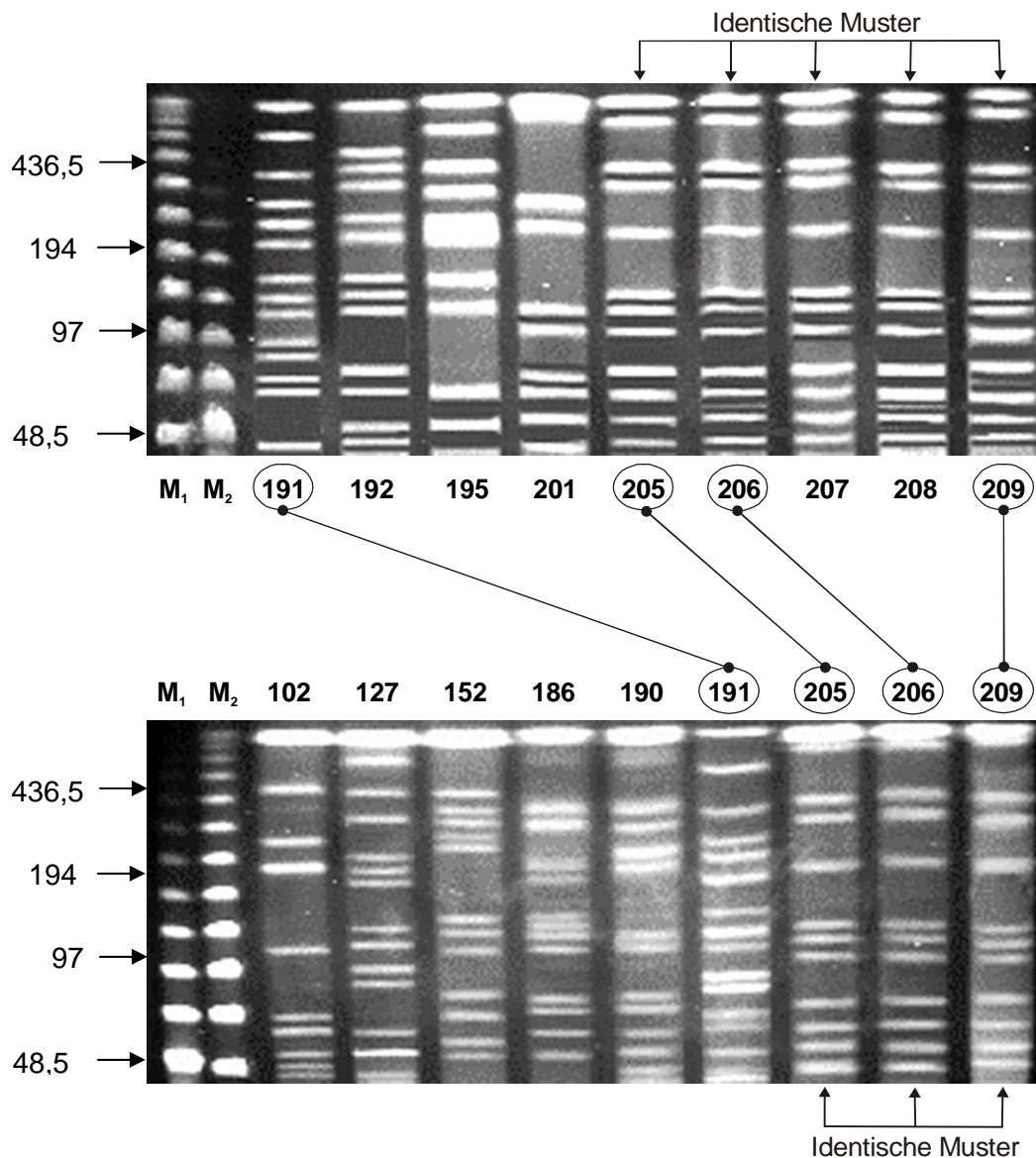
Die 67 untersuchten Isolate sind nach dem Herkunftsort eingeteilt. 53 der Isolate stammen aus Europa (A-E) und 4 aus Übersee (F: n=4).

### Reproduzierbarkeit

Insgesamt war die Reproduzierbarkeit der Methode sehr gut, welches eine Voraussetzung für „epidemiologische“ Aussagen ist. Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse wurde für jedes Isolat dreimal in zeitlich voneinander getrennten Versuchsansätzen geprüft. Es wurden keine Veränderungen in dem DNA-Fingerprintmuster festgestellt. Die mitgeführte Negativkontrolle war durchgehend negativ. Die PFGE-Restriktionsmuster der chromosomalen DNA von fünf *E. sakazakii*-Isolaten (94, 95, 96, 98 und 99) sind im gleichen Gel identisch (Abb. 22).

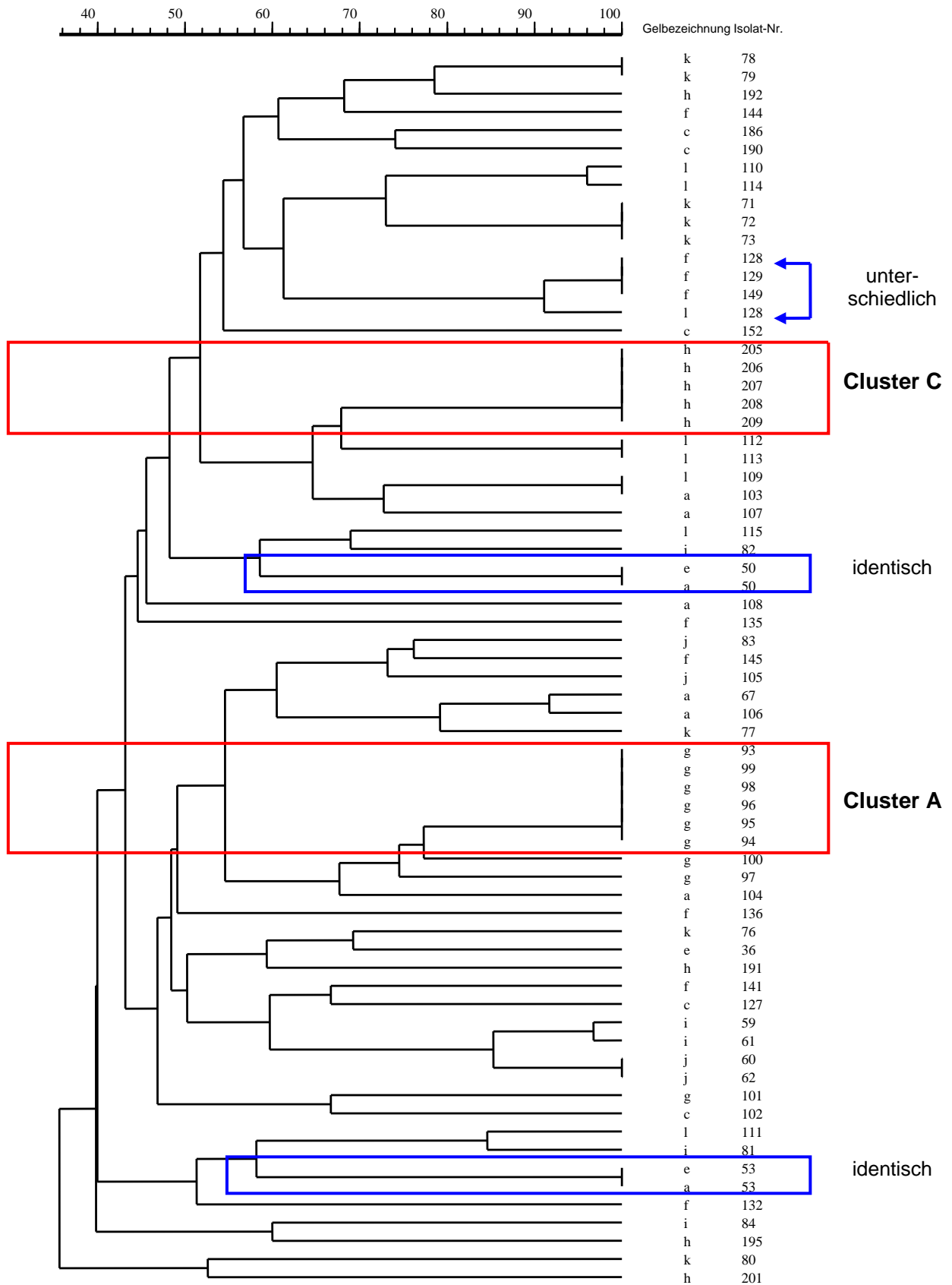


**Abbildung 22:** Identische Muster von 5 Isolaten (NCC 94, 95, 96, 98, 99) im selben Gel. M<sub>1</sub>: „low range“ PFGE Marker (0,1 - 200 Kb) und M<sub>2</sub>: Lambda Ladder PFGE Marker (50 - 1000 Kb).

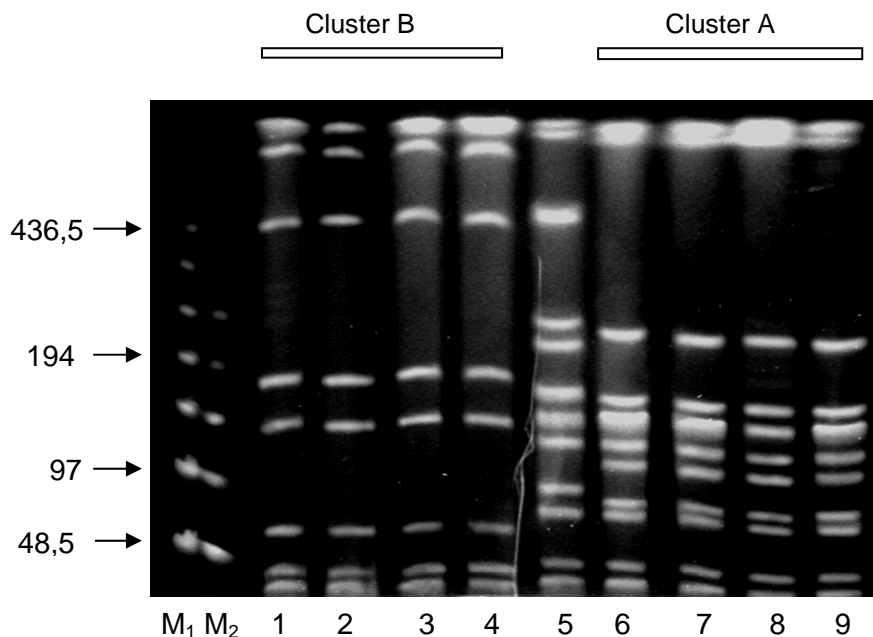


**Abbildung 23:** Identische Muster von Isolaten in unterschiedlichen Gelen. M<sub>1</sub>: „low range“ PFGE Marker (0,1-200 Kb) und M<sub>2</sub>: Lambda Ladder PFGE Marker (50 - 1000 Kb).

Bei einem Vergleich derselben Stämme (191, 205, 206 und 209) nach unabhängigem Restriktionsverdau der DNA und Auftragen auf verschiedenen Gelen konnte beispielhaft gezeigt werden, dass die untersuchten Isolate identische Restriktionsmuster in unterschiedlichen Gelen aufzeigen (Abb. 23). Ebenfalls identische Muster zeigten die Isolate 50 und 53 auf verschiedenen Gelen auf. Lediglich für Isolat 128 konnte nach dem Restriktionsverdau der chromosomalen DNA und Auftragen auf verschiedenen Gelen kein identisches Restriktionsmuster reproduziert werden (Abb. 24). Mit der Auswertesoftware GelCompar 3.1 (Fa. Applied Maths, Belgien, D) wurden die Bandenmuster der PFGE-Untersuchungen analysiert. Diese Ergebnisse sind beispielhaft als Dendrogramm in der Abbildung 24 dokumentiert. Die Prozentangaben beschreiben den Grad der Ähnlichkeiten.



**Abbildung 24:** Dendrogrammanalyse ausgewählter *E. sakazakii*-Isolate mit der Pulse Field Gel Electrophoresis (PFGE). Die Cluster A und C sind rot gekennzeichnet. Ein Vergleich der gleichen Isolate in unterschiedlichen Gelen ist blau gekennzeichnet.



**Abbildung 25:** Beispiel verschiedener Restriktionsmuster nach Verdau der genomischen DNA mit *Xba*I. Spur 1 - 4: vier identische *E. sakazakii*-Isolate - Cluster B (54-57); Spur 6-9: vier identische *E. sakazakii*-Isolate (89-91, 93)-Cluster A; M<sub>1</sub>: „low range“ PFGE Marker (0,1-200 Kb) und M<sub>2</sub>: Lambda Ladder PFGE Marker (50-1000 Kb).

### 3.2.2.4 Diskriminierungsstärke verschiedener Typisierungsmethoden

Bei einem Vergleich des Diskriminierungsindex (DI) verschiedener Methoden konnte gezeigt werden, dass die phänotypische Methode eine geringere Diskriminierung aufzeigt als die genotypischen Methoden (tab. 25). Der DI für PFGE, RAPD-M13 Core und RAPD-T3b liegt bei >0,90 im Vergleich zur Biotypisierung bei nur 0,817. Die RAPD und PFGE erwiesen sich als Methoden mit der höchsten Diskriminierung, gefolgt von der Biotypisierung.

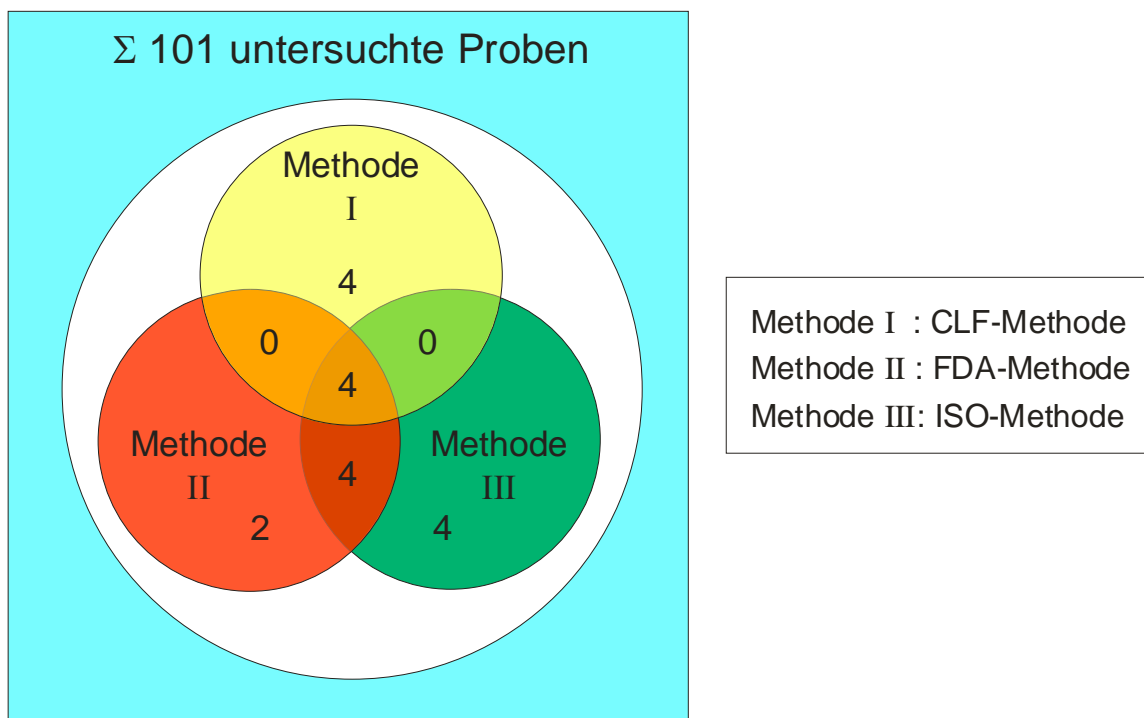
**Tabelle 25:** Diskriminierungsindex phänotypischer und genotypischer Methoden

Methode	Anzahl der Typen	Größe der größten Gruppe (in %)	Diskriminierungsindex
Biotypisierung	37	32	0,817
PFGE ( <i>Xba</i> I)	37	16	0,958
RAPD-M13 Core	39	11	0,971
RAPD-T3b	27	16	0,959

### 3.2.3 Methodenvergleich

#### 3.2.3.1 Vergleich der gängigen klassischen Nachweisverfahren

Im Rahmen dieser Untersuchung wurden insgesamt 101 Proben Milchpulver mikrobiologisch auf das Vorkommen von *E. sakazakii* untersucht. Von 101 untersuchten Proben konnten 18 Proben (17.8%) eindeutig als *E. sakazakii*-positiv identifiziert werden, wobei 4 Proben in allen drei Methoden (3.9% oder 22% der positiven Proben), 4 Proben in Methode II + III übereinstimmend als *E. sakazakii* positiv bestimmt werden konnten. In den einzelnen Methoden konnten 4, 2 und 4 Proben (Methode I + II + III) als *E. sakazakii* positiv bestätigt werden (Abb. 26).



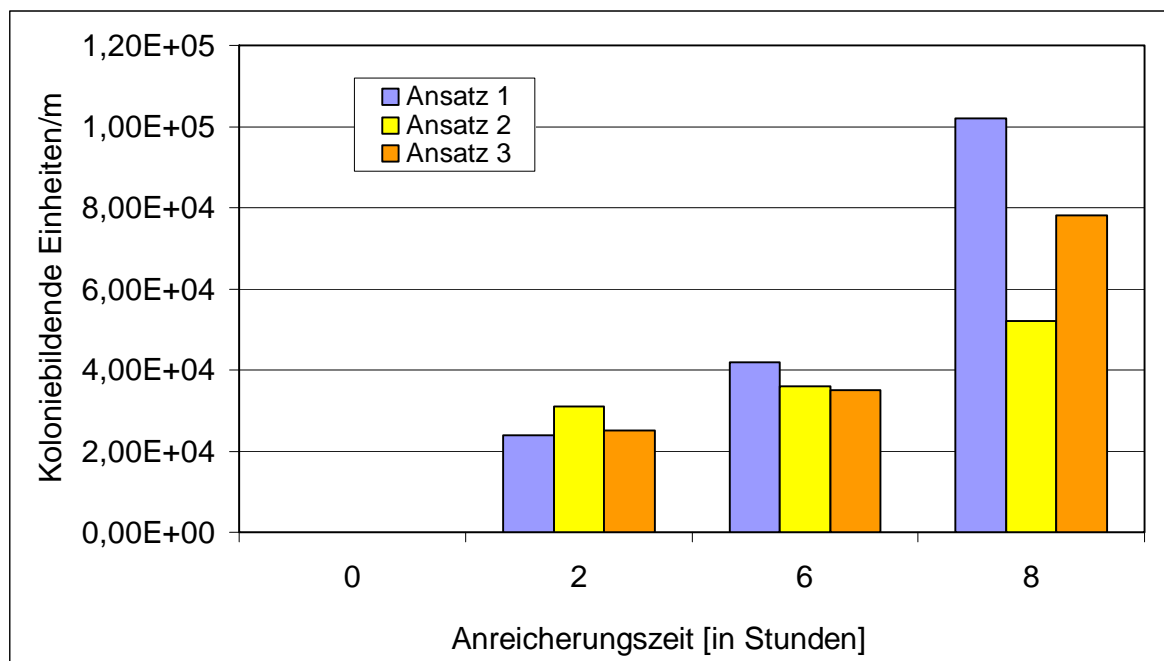
**Abbildung 26:** Übersicht zur Verteilung der *E. sakazakii* positiven Ergebnisse auf die angewandten Methoden der Studie.

Die FDA-Methode (Methode II), welche eine spezifische Anreicherung (EE Bouillon) mit der Gelbpigmentierung kombiniert, führte bei 10 Proben (9,9% aller Proben oder 55,5% der kontaminierten Proben) zum Nachweis von *E. sakazakii*. Mittels einer Hausmethode (Methode I) auf Basis einer unspezifischen Anreicherung und einer Selektion mittels biochemischer Parameter (Laktose-, Citrat- und Sorbitol-Fermentation) auf verschiedenen Selektivmedien konnte *E. sakazakii* in acht Proben detektiert werden (7,9% aller Proben oder

44,4% der kontaminierten Proben). Die ISO/TS 22964 Methode (Methode III) basiert auf einer spezifischen Anreicherung kombiniert mit einer Selektion nach Gelbpigmentierung und chromogenen Nährmedien. Insgesamt konnten mit dieser Methode 12 Proben (11,9% aller Proben oder 66,7% der kontaminierten Proben) als *E. sakazakii*-positiv nachgewiesen werden. Folglich steigert eine spezifische Anreicherung in mLST kombiniert mit chromogenen Nährmedien die Sensitivität der Methode auf 66,7%.

### Nachweis von *E. sakazakii* in einer Poolprobe nach dem FOSTER-Stichprobenplan

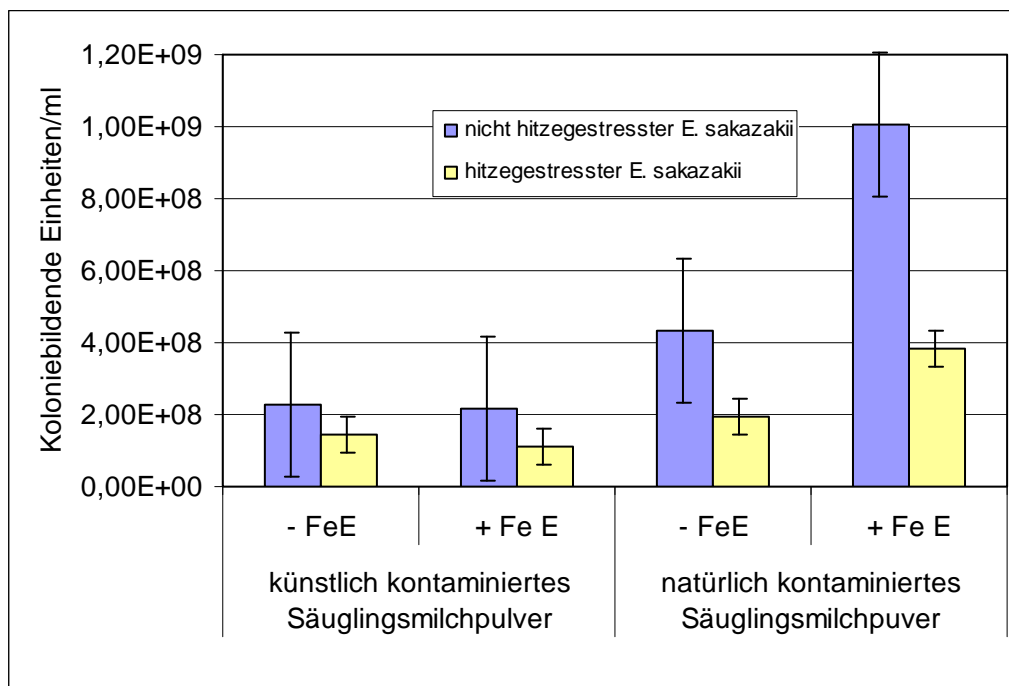
Die Stichprobe für *E. sakazakii* wird, wie auch bei den Salmonellen, mit einem automatischen Probennehmer gezogen, wobei pro Batch mehrere Proben von einigen Gramm vorliegen, die in einer Poolprobe von 1500g untersucht werden. Der Nachweis von *E. sakazakii* in 1500 g Milchpulver mit der in 3.1.4.3 beschriebenen Methode erwies sich für dieses große Probenvolumen als geeignet. In drei verschiedenen Ansätzen konnte *E. sakazakii* (Initialkeimzahl 105 KbE) bereits nach 2h Anreicherungszeit mit einer Keimzahl von durchschnittlich  $2,3 \times 10^4$  pro ml nachgewiesen werden (Abb. 27). Nach einer Inkubationszeit von 6h lag die Keimzahl bei durchschnittlich  $3,8 \times 10^4$  KbE/ml und nach 8h bei  $4,7 \times 10^4$  KbE/ml.



**Abbildung 27:** Nachweis von *E. sakazakii* in einer gespiketen Poolprobe vom Umfang von 1500 g (60 x 25 g) nach dem Foster-Stichprobenplan. Anreicherung der Probe bei Raumtemperatur in 15l Leitungswasser.

### Ferrioxamin E-abhängiger Nachweis

Die Auswirkungen einer Supplementierung der Voranreicherung mit Ferrioxamin E auf den Nachweis von *E. sakazakii* in Säuglingsmilchpulver wurde anhand eines mit *E. sakazakii* künstlich und natürlich kontaminierten Milchpulvers mit und ohne Hitzestress untersucht. Als Kontrolle diente eine Voranreicherung ohne Ferrioxamin E. Ein deutlich positiver Effekt konnte beim Nachweis mit Ferrioxamin E in einem natürlich kontaminierten Produkt mit  $1 \times 10^9$  KbE/ml anstatt nur  $4 \times 10^8$  KbE/ml ohne Hitzestress festgestellt werden (Abb. 28). Unter Hitzestress konnten  $3,86 \times 10^8$  KbE/ml mit dem Zusatz von Ferrioxamin E detektiert und im Vergleich ohne Ferrioxamin E nur  $1,93 \times 10^8$  KbE/ml. Bei dem künstlich kontaminierten Milchprodukt mit einem Referenzstamm (*E. sakazakii* DSM 4485) konnte keine positive Wirkung durch einen Zusatz von Ferrioxamin E erreicht werden. Die Verwertung des Siderophores Ferrioxamin E wird offensichtlich im Wesentlichen durch sublethal geschädigtem *E. sakazakii* in Anspruch genommen.

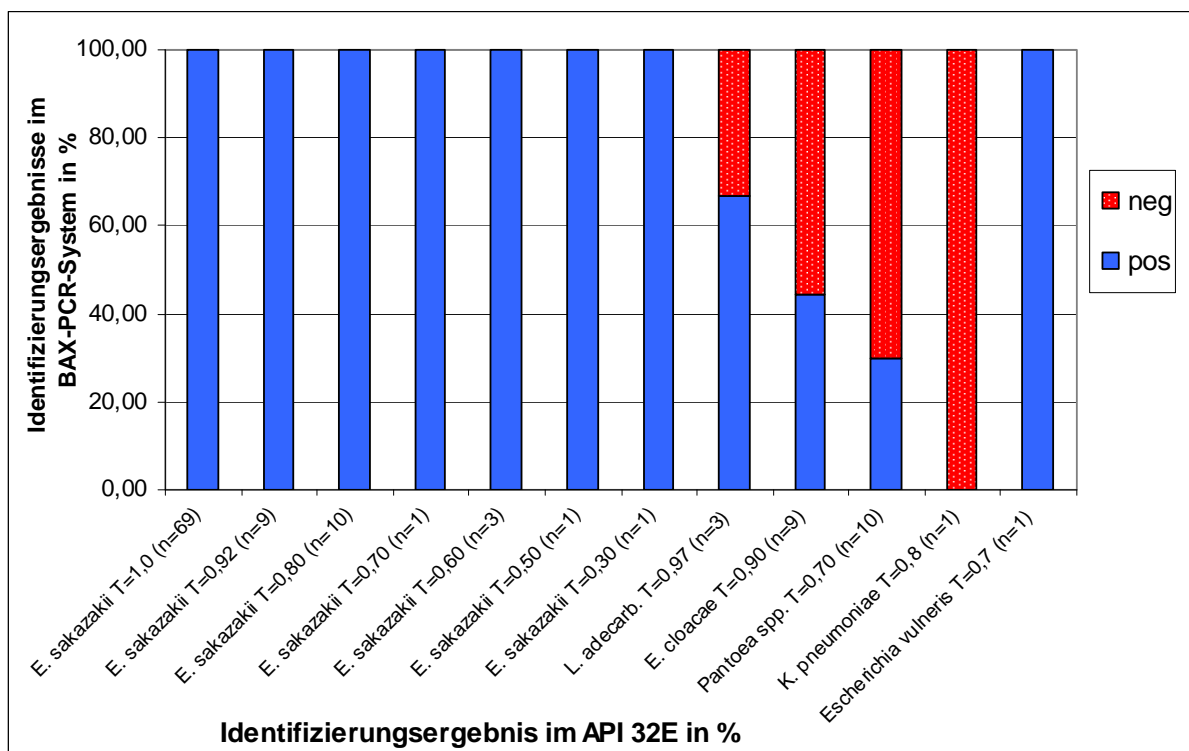


**Abbildung 28:** Nachweis von *E. sakazakii* in natürlich und künstlich kontaminierter Säuglingsmilchnahrung durch Zusatz von Ferrioxamin E in gepuffertem Peptonwasser bei 37°C nach 24 h.

### 3.2.3.2 Vergleich zu alternativen Verfahren

#### Bestätigungssysteme

Mittels verschiedener Identifizierungssysteme, dem API 32E (Biomerieux) und dem BAX<sup>®</sup> PCR-System (Oxoid), wurden 117 (94 *E. sakazakii*; 10 *Pantoea* spp; 9 *E. cloacae*, 3 *Leclercia adecarboxylata*; 1 *K. pneumoniae*) in den klassisch-mikrobiologischen *E. sakazakii*-Methoden auffällige Enterobacteriaceae-Stämme verifiziert (Abb. 29). Mit dem Identifizierungssystem API 32E und dem BAX<sup>®</sup> PCR-System konnten alle 94 *E. sakazakii*-Isolate eindeutig nachgewiesen werden. Allerdings wurden ebenfalls ein *Leclercia adecarboxylata*-, vier *E. cloacae*-, drei *Pantoea* spp.- und ein *Escherichia vulneris*-Isolat(e) in dem BAX<sup>®</sup> PCR-System als falsch positiv (*E. sakazakii*) erkannt, welche zuvor in anderen PCR-Methoden sicher als nicht-*E. sakazakii* bestätigt wurden (Vgl. 3.2.2).



T-Wert = Vergleich des identifizierten Stammes mit dem Datensatz, der in der Datenbank für diesen Stamm gespeichert ist. API32E (bioMérieux<sup>®</sup> Deutschland GmbH V 2.0)

**Abbildung 29:** Spezifität des API 32E im Vergleich zum BAX-PCR-System.

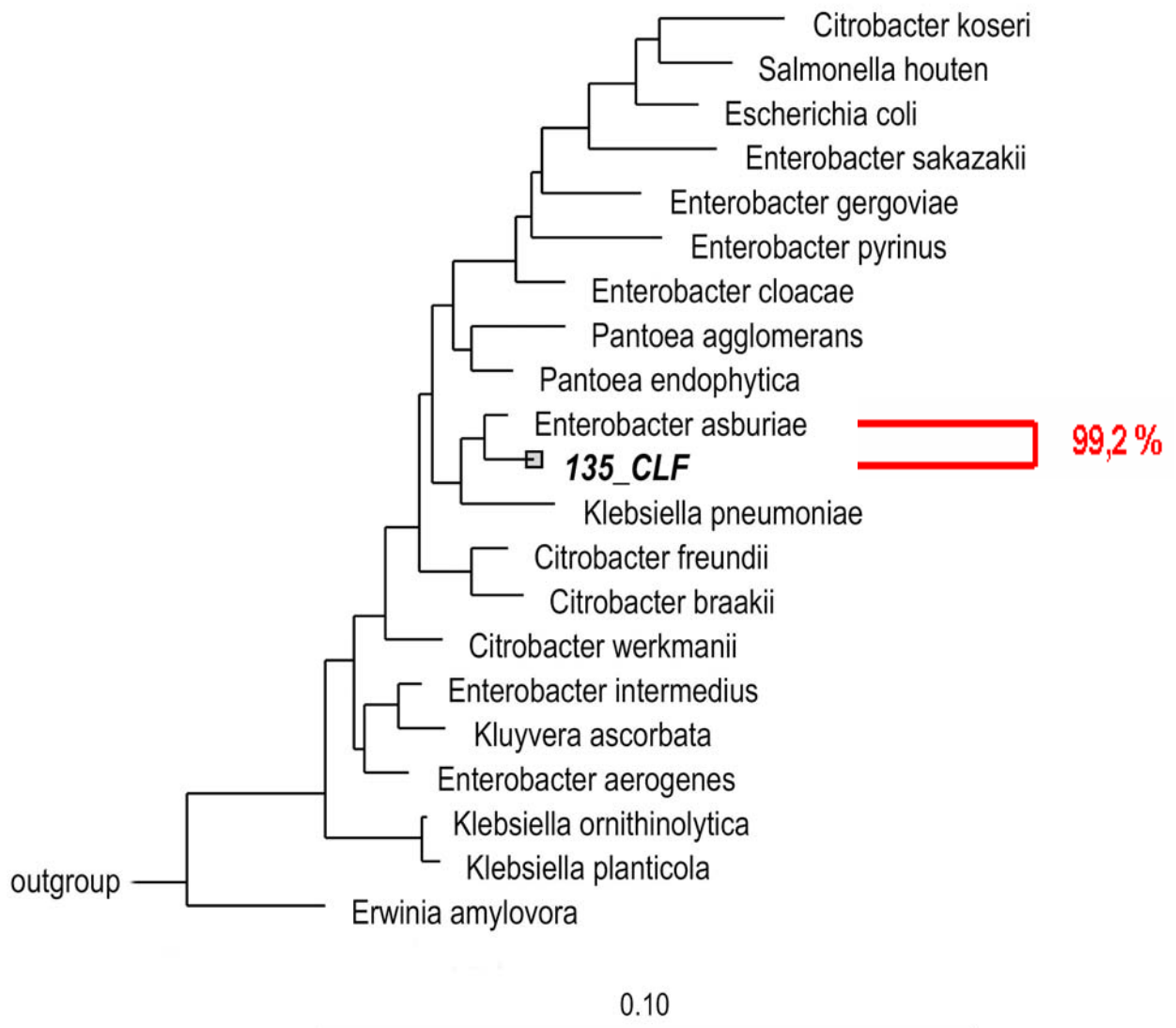
Setzt man das Identifizierungssystem API 32E als Referenz, werden die als *E. sakazakii* identifizierten Stämme in den verwendeten spezifischen Nachweissystemen zu 100% erkannt. Das PCR-System erfasst eine Reihe von Stämmen als *E. sakazakii*, die im API 32E abweichend identifiziert wurden.

Lediglich ein Stamm (135) zeigte ein abweichendes Ergebnis im Vergleich zu den biochemischen Identifizierungssystemen (API 32E, alpha-Glucosidase) und zur BAX-PCR. Die Einzelergebnisse für diese Spezies in *Enterobacter sakazakii* spezifischen Nachweissystemen sind in Tabelle 26 zusammengefasst.

**Tabelle 26:** Ergebnisübersicht für den Nachweis des Stammes 135 mit verschiedenen Identifizierungssystemen und Bestätigungsreaktionen

Identifizierungssysteme	Ergebnis für Stamm 135
API 32E (Biomerieux)	<i>E. sakazakii</i> mit 99,9 %, T=1,00
API 20E (Biomerieux)	<i>Escherichia vulneris</i> mit 61,5 %, T=1,00
Rapid one (Oxoid)	<i>Enterobacter gergoviae</i>
Biolog (Oxoid)	<i>Lecl. adecarboxylata</i>
16S rDNA Sequenzierung	<i>Enterobacter asburiae</i> zu 99,2 %
BAX <i>E. sakazakii</i> (Oxoid)	positiv/negativ
VIT <i>E. sakazakii</i> (Vermicon AG)	negativ
DFI (Oxoid)	negativ
ESIA (AES Laboratoire)	negativ
Alpha-Glucosidase (Sigma Aldrich)	positiv
Tween-80-Esterase-Aktivität	positiv
Sorbitol (Oxoid)	negativ
Gelbpigmentierung	negativ

Die phylogenetische Einordnung mittels 16S rDNA-Sequenzierung hat gezeigt, dass es sich bei dem Isolat (135) um einen Stamm handelt, der 99,2% Ähnlichkeit zu *Enterobacter asburiae* aufweist. Die Ähnlichkeit zu *Enterobacter sakazakii* beträgt nur 96,3 % (Abb. 30).



**Abbildung 30:** Vergleichende Sequenzanalyse des Stammes 135\_CLF

Die Topologie des Konsensusbaumes wurde über eine Maximum Likelihood-Analyse evaluiert. Der Messbalken entspricht einer Sequenzhomologie von 10%. *Bifidobacterium bifidum* (im Dendrogramm als outgroup bezeichnet) wurde als Wurzel für diesen Baum verwendet.

### FISH-Technologie

Für die *in situ* Detektion von *E. sakazakii* kam eine gegen die 16S-rRNA gerichtete fluoreszenzmarkierte Gensonde (VIT-*E. sakazakii*) zum Einsatz. Um die Spezifität zu testen, wurden Reinkulturen von insgesamt 124 Enterobakterien hybridisiert. In der FISH-Methodik konnten für sechs Enterobakterien-Spezies übereinstimmend negative Ergebnisse erzielt werden. Von 102 *Enterobacter sakazakii*-Isolaten wurden 101 im VIT-*E. sakazakii* als positiv bewertet (Abb. 31). Ein bereits in anderen Identifizierungssystemen auffällig gewordener und als *E. sakazakii*-negativ identifizierter Stamm (135\_CLF) wurde mit der VIT-Methode richtig als negativ erkannt.

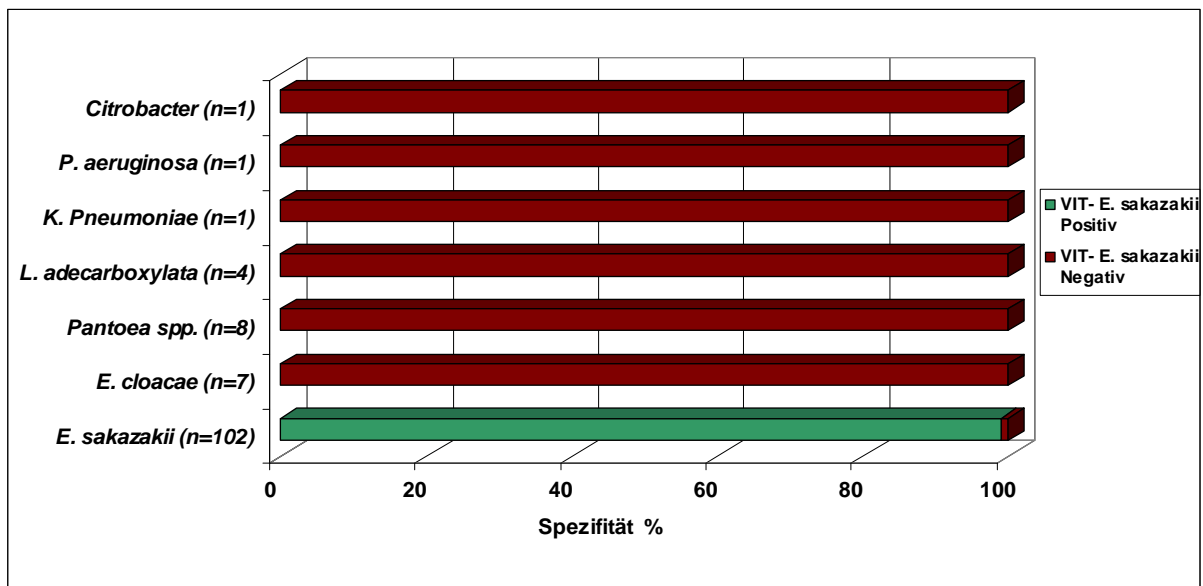
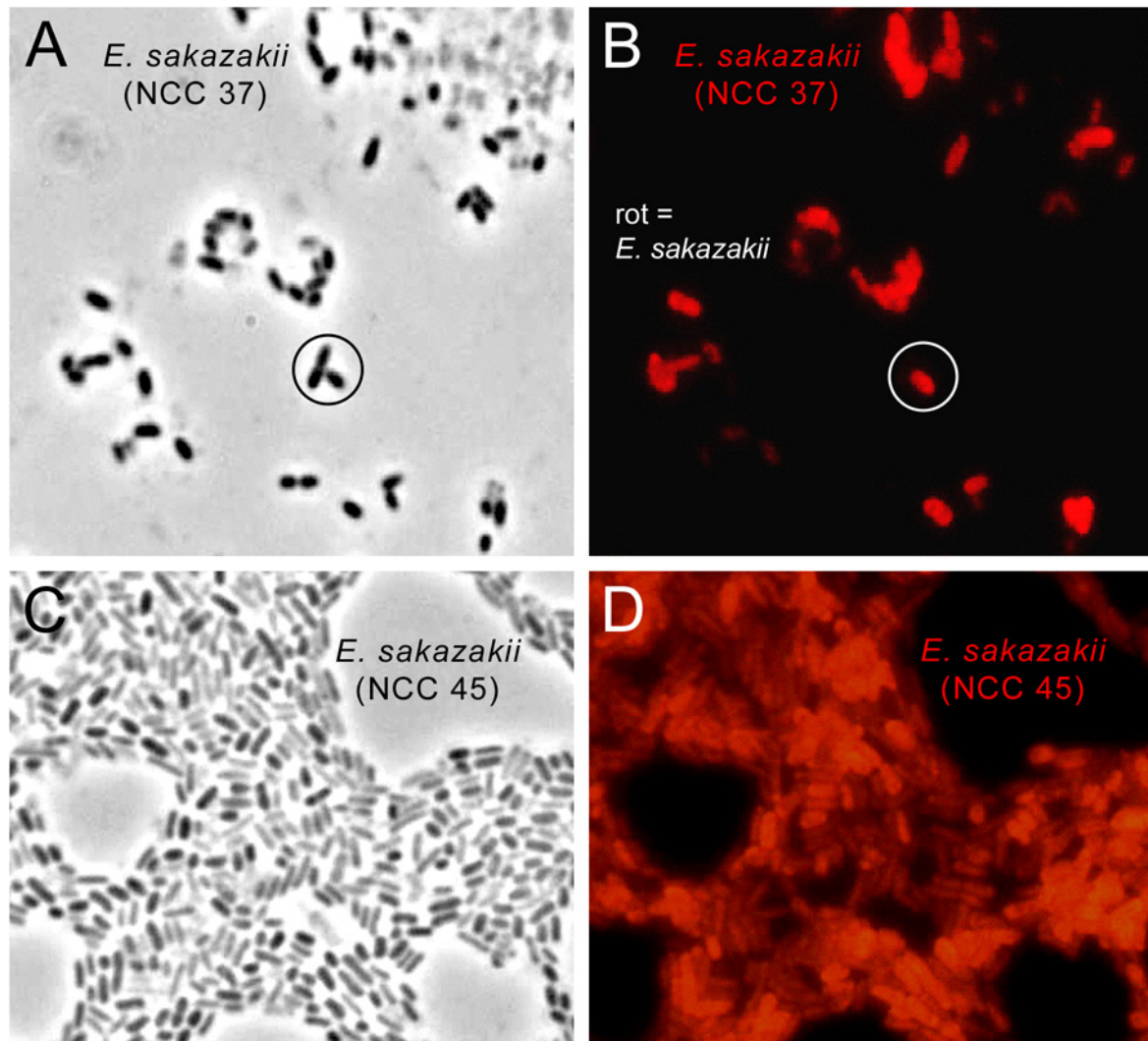


Abbildung 31: Spezifität des VIT-*E. sakazakii* in %

Als Nachweis der Hybridisierung mit der spezifischen VIT-Sonde galt der mikroskopische Nachweis von rot fluoreszierenden stäbchenförmigen Bakterien unter Anregung mit grünem Licht (Abb. 32). Alle rot leuchtenden Bakterien (weiße Kreise) gehören zur Art *Enterobacter sakazakii*. Fehlende Rot-Fluoreszenz von Stäbchenbakterien wurde als fehlende Hybridisierung mit dieser Sonde interpretiert. Alle Bakterien, die nicht leuchteten, sind entweder tot oder gehören nicht zur Art *Enterobacter sakazakii*.



**Abbildung 32:** Phasenkontrastaufnahme von *E. sakazakii* nach der Analyse mit VIT-*Enterobacter sakazakii* (A) NCC 37 (C) NCC 45. Fluoreszenzaufnahme von *E. sakazakii* nach der Analyse mit VIT-*Enterobacter sakazakii* (B) NCC 37 (D) NCC 45.

Unterschiedliche kommerziell erhältliche biochemische Identifizierungssysteme wurden auf die Eignung zur Identifizierung von *E. sakazakii* geprüft (Tab.24). Die eingesetzten *E. sakazakii*-Isolate wurden zuvor mit einer PCR bestätigt (Vgl. 4.2.2). Mit den Identifizierungssystemen API 20E und API 32E konnten alle 19 untersuchten *E. sakazakii*-Isolate eindeutig identifiziert werden. Das Identifizierungssystem BBL Crystal erkannte lediglich 68% (13) der Isolate als *E. sakazakii*. Für die anderen *E. sakazakii* Isolate ergaben sich bei Verwendung des BBL Crystal in 32% (6) der Fälle falsche Identifizierungen als *Enterobacter cancerogenus* und *Pantoea agglomerans*. Unterschiede in den biochemischen Reaktionen führten beim Vergleich zwischen den Identifizierungssystemen zu diskrepanten Ergebnissen.

**Tabelle 27:** Identifizierung von *E. sakazakii* (n=19) mittels biochemischer Identifizierungssysteme

Isolat	1. Identifizierung				2. Identifizierung				3. Identifizierung		
	API 32E				API 20E				BBL-Crystal		
	T-Wert <sup>a</sup>	ID <sup>b</sup> %	Profil <sup>c</sup>	Identifiziert als	T-Wert	ID %	Profil <sup>c</sup>	Identifiziert als	Profil	Konfidenz <sup>e</sup>	Identifiziert als
50	1,00	99,9	34276763250	<i>E. sakazakii</i>	0,92	51,1	3305173	<i>E. sakazakii</i>	7773632157	0,9994	<i>E. sakazakii</i>
55	0,92	99,9	34276767050	<i>E. sakazakii</i>	1,0	98,4	3305373	<i>E. sakazakii</i>	7773232157	0,9995	<i>E. sakazakii</i>
59	1,00	99,9	34076763210	<i>E. sakazakii</i>	1,0	98,4	3305373	<i>E. sakazakii</i>	7771632157	0,9995	<i>E. sakazakii</i>
62	0,76	99,9	34276763250	<i>E. sakazakii</i>	1,0	98,4	3305373	<i>E. sakazakii</i>	7773232357	0,9963	<i>E. sakazakii</i>
67	1,00	99,9	34276763210	<i>E. sakazakii</i>	1,0	98,4	3305373	<i>E. sakazakii</i>	7730632313	0,9556	<i>Enterobacter cancerogenus</i>
76	1,00	99,9	34276363250	<i>E. sakazakii</i>	0,92	51,1	3305173	<i>E. sakazakii</i>	7771632113	0,979	<i>E. sakazakii</i>
77	1,00	99,9	34276763250	<i>E. sakazakii</i>	0,92	51,1	3305173	<i>E. sakazakii</i>	7771632113	0,979	<i>E. sakazakii</i>
79	0,92	99,9	34276767050	<i>E. sakazakii</i>	0,92	51,1	3305173	<i>E. sakazakii</i>	7733632313	0,9094	<i>Enterobacter cancerogenus</i>
80	0,92	99,9	34276767050	<i>E. sakazakii</i>	0,92	51,1	3305173	<i>E. sakazakii</i>	7732633317	0,8766	<i>Enterobacter cancerogenus</i>
83	0,88	99,9	34276763250	<i>E. sakazakii</i>	0,92	51,1	3305173	<i>E. sakazakii</i>	7731632313	0,9818	<i>Enterobacter cancerogenus</i>
84	0,67	99,9	34276367050	<i>E. sakazakii</i>	1,0	98,4	3305373	<i>E. sakazakii</i>	7733632117	0,9892	<i>E. sakazakii</i>
88	1,00	99,9	34276763250	<i>E. sakazakii</i>	0,92	51,1	3305173	<i>E. sakazakii</i>	7771622313	0,9542	<i>E. sakazakii</i>
97	0,72	99,9	34274763050	<i>E. sakazakii</i>	0,92	51,1	3305173	<i>E. sakazakii</i>	7773632117	0,9994	<i>E. sakazakii</i>
98	0,67	99,9	34276763040	<i>E. sakazakii</i>	0,92	51,1	3305173	<i>E. sakazakii</i>	7771632313	0,8902	<i>E. sakazakii</i>
100	0,92	99,9	34272363050	<i>E. sakazakii</i>	0,92	51,1	3305173	<i>E. sakazakii</i>	7733632113	0,611	<i>Enterobacter cancerogenus</i>
105	0,80	99,9	34276763050	<i>E. sakazakii</i>	0,92	51,1	3305173	<i>E. sakazakii</i>	7671632113	0,9413	<i>E. sakazakii</i>
106	0,67	99,9	34276763040	<i>E. sakazakii</i>	0,92	51,1	3305173	<i>E. sakazakii</i>	7731632313	0,8225	<i>Pantoea agglomerans</i>
128	0,35	99,9	14236367250	<i>E. sakazakii</i>	86,1	0,5	1305371	<i>E. sakazakii</i>	7733632317	0,9394	<i>E. sakazakii</i>
148	0,92	99,9	34276763270	<i>E. sakazakii</i>	0,92	51,1	3305173	<i>E. sakazakii</i>	7773632111	0,9981	<i>E. sakazakii</i>

<sup>a</sup>T-Wert = Vergleich des identifizierten Stamms mit dem Datensatz, der in der Datenbank für diesen Stamm gespeichert ist. Dieser Wert sollte möglichst über 0,5 liegen; <sup>b</sup>ID= die Wahrscheinlichkeit, mit der das API Ergebnis als wahr angenommen werden kann

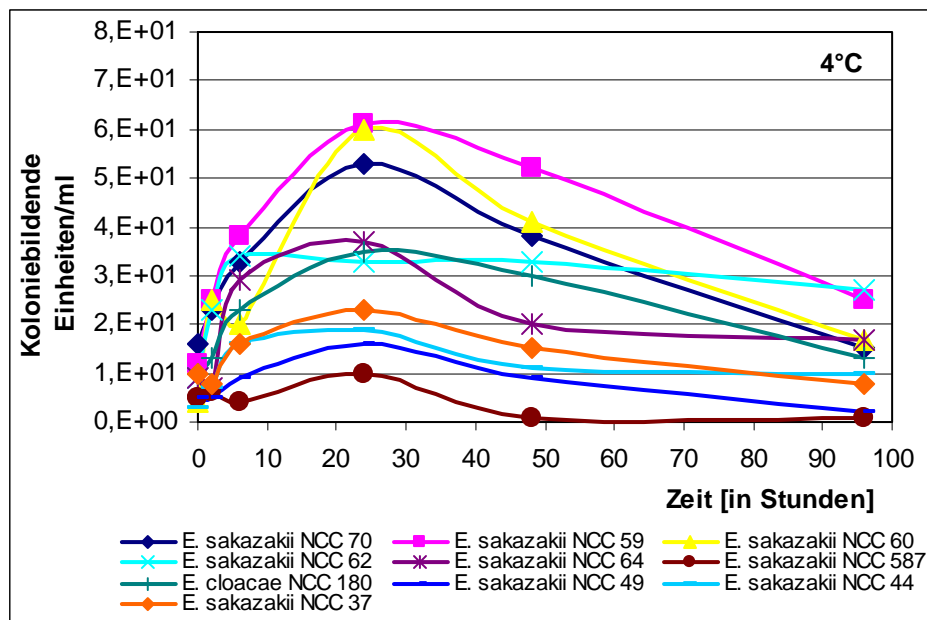
<sup>c</sup>Profil = die positiven und negativen Ergebnisse werden in eine 7-12-stellige Profilvernummer konvertiert und in die elektronische Datenbank zur weiteren Auswertung übermittelt; <sup>e</sup>Konfidenz -Vertrauensbereich

### 3.3 Verhalten von *Enterobacter sakazakii* im Produktionsumfeld und praxisbezogene Aspekte des Nachweises

#### 3.3.1 Wachstumskinetik

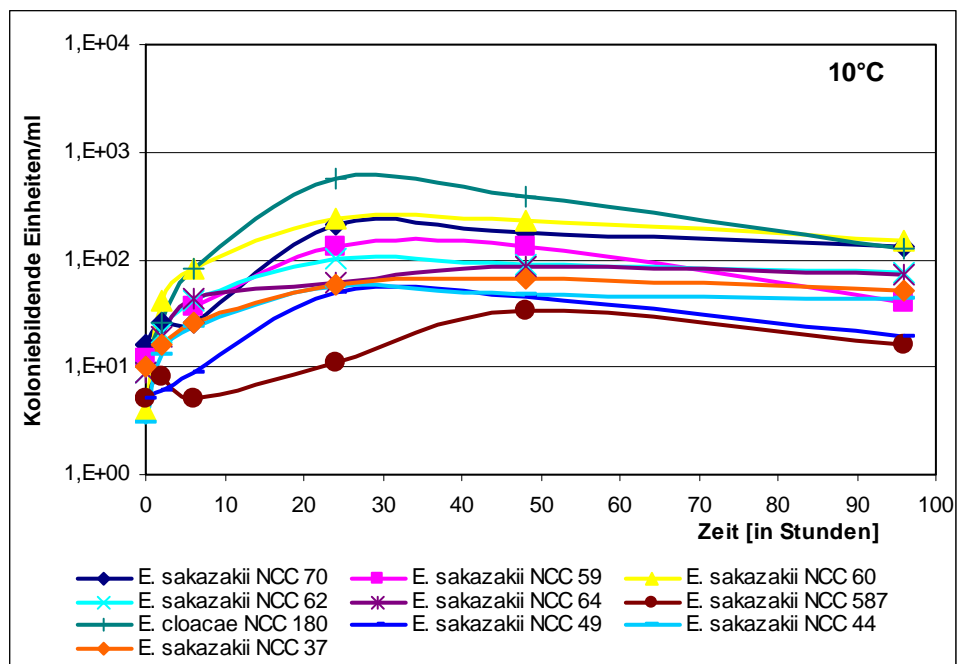
Zur Charakterisierung spezieller Eigenschaften von *E. sakazakii* wurde das Wachstum von neun Stämmen und einem Vergleichsstamm *E. cloacae* über einen Zeitraum von 96h bei unterschiedlichen Temperaturen beobachtet. Die Keimzählung erfolgte nach 2, 6, 24, 48 und 96 h mit dem Plattengussverfahren. Die Ergebnisse sind logarithmisch dargestellt.

Bei einer Temperatur von 4°C konnte bei einer Initialkeimzahl von 3-16 KbE/ml für keinen der untersuchten Stämme, auch über einen längeren Inkubationszeitraum hinweg, ein signifikantes Wachstum festgestellt werden (Abb. 33).



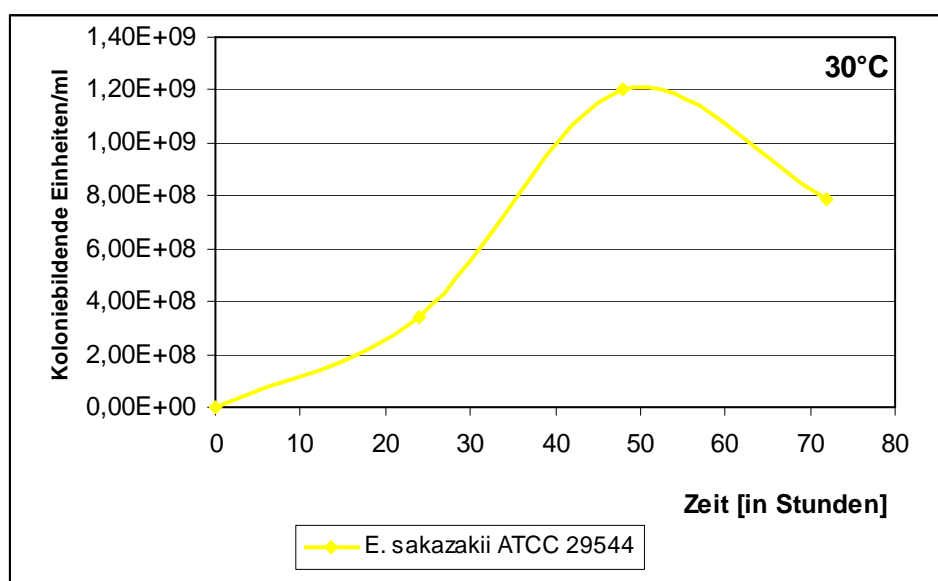
**Abbildung 33:** Wachstum verschiedener *E. sakazakii* - Stämme und *E. cloacae* in Tryptone Soya Broth bei 4°C in einem Zeitraum von 96 Stunden.

Bei einer Temperatur von 10°C konnte bei den untersuchten *E. sakazakii* – Stämmen ebenfalls kein signifikantes Wachstum festgestellt werden. Auch im Vergleich dazu wurde für den mitgeführten Kontrollstamm *E. cloacae* nach 24 h kein bedeutsames Wachstum (Abb. 34) beobachtet.



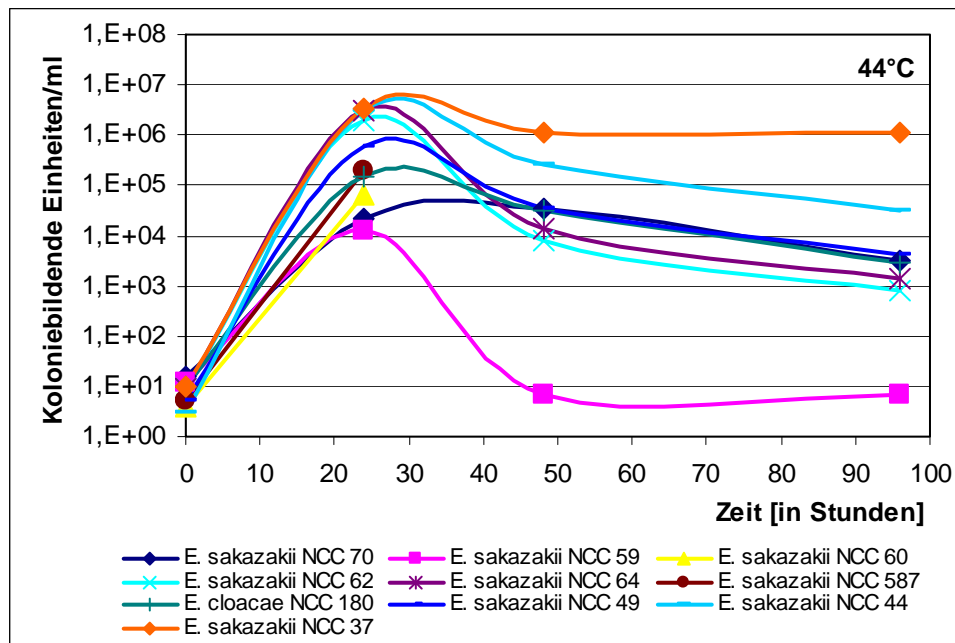
**Abbildung 34:** Wachstum verschiedener *E. sakazakii* – Stämme und *E. cloacae* in Trypton Soya Broth bei 10°C in einem Zeitraum von 96 Stunden.

*E. sakazakii* ATCC 29544 wurde in diesen Untersuchungen bei einer für *E. sakazakii* optimalen Temperatur von 30°C über einen Zeitraum von 72h als Wachstumsreferenzstamm mitgeführt. Die höchste Zelldichte war zwischen 24 h und 48h zu verzeichnen (Abb. 35)



**Abbildung 35:** Wachstum des Referenzstammes *E. sakazakii* ATCC in Trypton Soya Broth bei 30°C in einem Zeitraum von 72 Stunden.

Im Vergleich zum Wachstum der *E. sakazakii* bei 4°C und 10°C konnte bei einer selektiven Temperatur von 44° für alle Stämme innerhalb von 24 h ein sehr gutes Wachstum verzeichnet werden ( $2,14 \times 10^4$  bis  $3,24 \times 10^6$ ) (Abb. 36).



**Abbildung 36:** Wachstum verschiedener *E. sakazakii* – Stämme und *E. cloacae* in Tryptone Soya Broth bei 44°C in einem Zeitraum von 96 Stunden.

Keines der neun untersuchten Isolate konnte als psychrophil eingestuft werden.

### 3.3.2 Thermophiles Wachstum

Genauere Untersuchungen des Wachstums von *E. sakazakii*, in Abhängigkeit von der (erhöhten) Temperatur, zeigten einen ausgeprägten thermophilen Wachstumsbereich dieses mesophilen Organismus auf (Tab. 28). Die meisten Stämme (n=20) vermehrten sich bis zu einer Temperatur von 48°C. Nur zwei Isolate stellten das Wachstum bereits bei einer Temperatur oberhalb von 42°C, sieben weitere bei einer Temperatur oberhalb von 46°C ein. Bei einer Temperatur von 50°C konnte für keines der untersuchten *E. sakazakii* Isolate ein Wachstum verzeichnet werden.

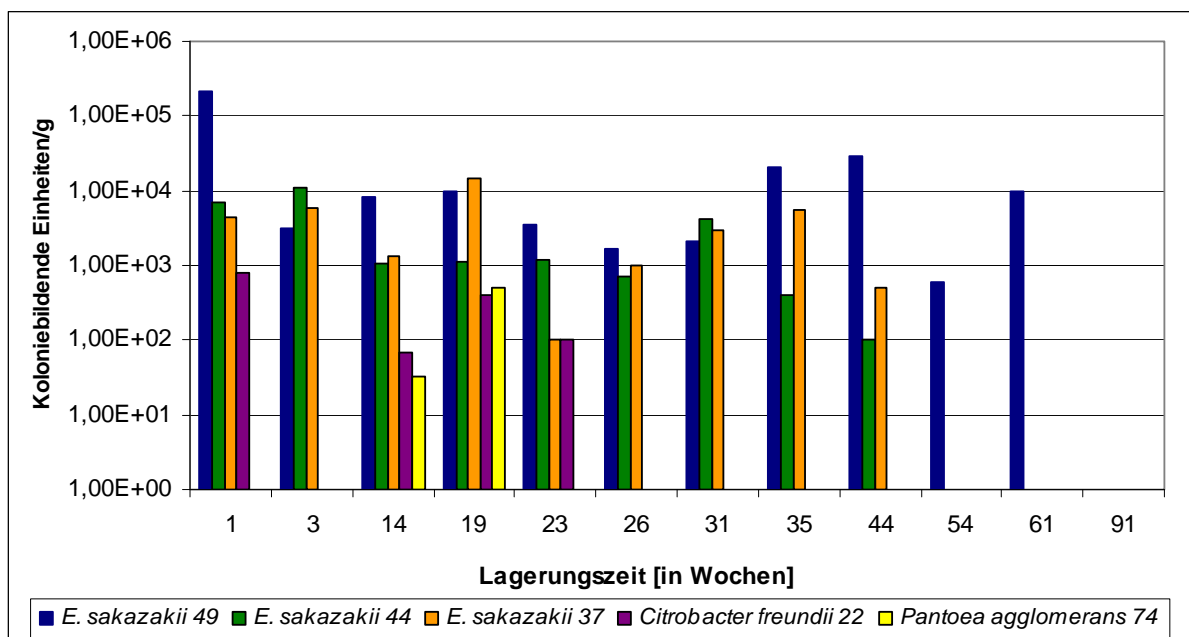
**Tabelle 28:** Wachstum ausgewählter *E. sakazakii* Stämme bei Temperaturen von 30-55°C

Nr.	Stamm	Temperatur									
		30°C	37°C	40°C	42°C	44°C	45°C	46°C	48°C	50°C	55°C
36	<i>E. sakazakii</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
37	<i>E. sakazakii</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
43	<i>E. sakazakii</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
44	<i>E. sakazakii</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
45	<i>E. sakazakii</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
50	<i>E. sakazakii</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
53	<i>E. sakazakii</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
54	<i>E. sakazakii</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
55	<i>E. sakazakii</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
56	<i>E. sakazakii</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
57	<i>E. sakazakii</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
59	<i>E. sakazakii</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
60	<i>E. sakazakii</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
61	<i>E. sakazakii</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
62	<i>E. sakazakii</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
64	<i>E. sakazakii</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
67	<i>E. sakazakii</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
68	<i>E. sakazakii</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
70	<i>E. sakazakii</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
71	<i>E. sakazakii</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
72	<i>E. sakazakii</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
73	<i>E. sakazakii</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
74	<i>E. sakazakii</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
75	<i>E. sakazakii</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
76	<i>E. sakazakii</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
77	<i>E. sakazakii</i>	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
78	<i>E. sakazakii</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
79	<i>E. sakazakii</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
49	<i>E. sakazakii</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
587	<i>E. sakazakii</i>	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-

### 3.3.3 Trockenresistenz

In dieser Langzeitstudie wurde die Absterbekinetik von *E. sakazakii*, *Citrobacter freundii* und *Pantoea agglomerans* in einem künstlich kontaminierten Milchprodukt über einen Zeitraum von 1¼ Jahr ermittelt. Das Milchpulver mit einer Ausgangskeimzahl von  $10^7$  KbE/ml und einem  $a_w$ -Wert von 0,2 wurde in einer verschlossenen Dose bei Raumtemperatur gelagert. In regelmäßigen Abständen wurde ein Teil des Milchpulvers rekonstituiert und die Keimzahl im Plattengussverfahren und im Doppelansatz bestimmt.

Alle drei *E. sakazakii* - Stämme konnten im Zeitraum von 1 und 61 Wochen detektiert werden. Die Ausgangskeimzahl von  $10^7$  KbE/10g sank innerhalb einer Woche auf Keimzahlen von 43 und 1000 KbE/10g für die *E. sakazakii*-Stämme. Der *Citrobacter freundii* Kontrollstamm konnte nach 3 Wochen nicht mehr nachgewiesen werden, allerdings konnte noch eine restlicher Level von 1 bis 4 KbE/10g nach 19 und 23 Wochen wiedergefunden werden. Im gleichen zeitlichen Rahmen war *E. sakazakii* konstant detektierbar mit Keimzahlen zwischen 10 und 100 KbE/10g. *Enterobacter sakazakii* ist in der Lage, lange in einer trockenen Umgebung zu überleben.



**Abbildung 37:** Absterbekinetik von *E. sakazakii* und *Citrobacter* in künstlich kontaminiertem Milchpulver ( $\gamma$ -Sterilisiert) nach Trocknung und Lagerung. Die Ausgangskeimzahl lag bei  $10^7$  KbE/ml ( $a_w$ -Wert 0,2).

Diese Untersuchungen (Abb. 37) zeigen deutliche Unterschiede zwischen den eingesetzten Enterobakterien-Spezies im Hinblick auf die Trockenresistenz. Dabei erwiesen sich die *E. sakazakii* - Spezies als deutlich widerstandsfähiger gegenüber osmotischem Stress als die mitgeführten Kontrollen *Citrobacter* und *Pantoea*.

Um mögliche Veränderungen in der Stoffwechselfähigkeit der im Milchpulver zugesetzten Keime nach 14 bis 20 Wochen Trockenstress festzustellen, wurden charakteristische biochemische Reaktionen untersucht (Tab. 29). Eine lange und „trockene“ Lagerung des Milchpulvers führte zu keiner Veränderung des biochemischen Leistungsspektrums bei den zugesetzten Keimen *E. sakazakii*, *Citrobacter freundii* und *Pantoea agglomerans*.

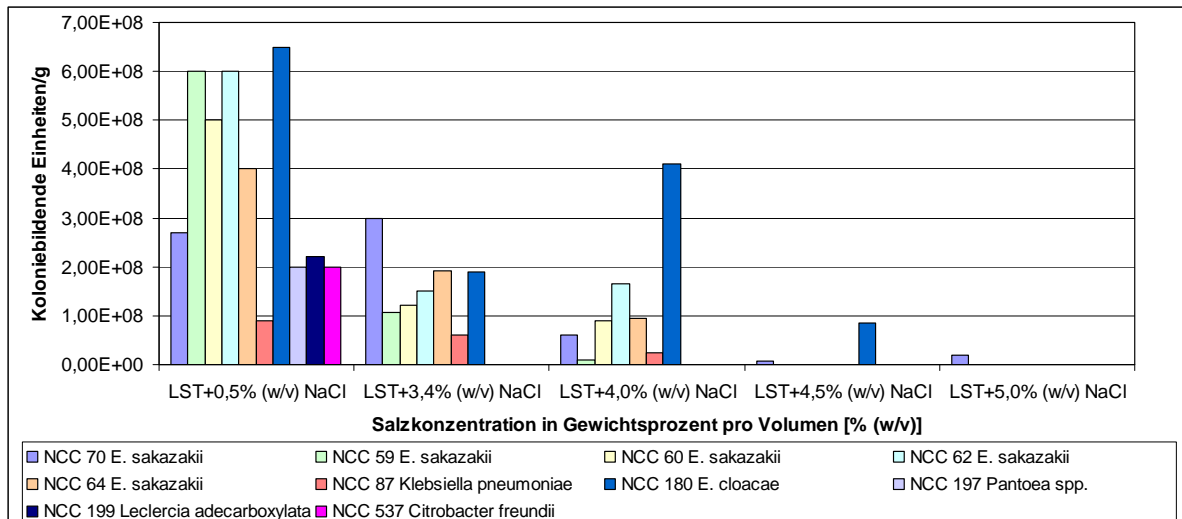
**Tabelle 29:** Biochemisches Spektrum der untersuchten Stämme nach Trockenstress

Stamm	Mac Conkey No.3	Simmons Citrate	Sorbitol Mac Conkey	$\alpha$ -Glucosidase	TSA Gelbfärbung
22 <i>Citrobacter freundii</i>	+	+	+	-	-
37 <i>E. sakazakii</i>	+	+	-	+	+
44 <i>E. sakazakii</i>	+	+	-	+	+
49 <i>E. sakazakii</i>	+	+	-	+	+
74 <i>Pantoea agglomerans</i>	+	+	-	-	-

### 3.3.4 Resistenz gegen osmotische Beanspruchung

Zur Untersuchung der Resistenz gegen osmotische Beanspruchung wurden die Wachstumseigenschaften von *E. sakazakii* in LST-Bouillon (ISO-Methode ISO/TS 22964) untersucht (Abb. 38). Dafür wurde die LST-Bouillon mit unterschiedlich hohen Salz (NaCl)-Konzentrationen angereichert, bei 37°C für 24 h inkubiert und die Keimzahlen im Plattengussverfahren ermittelt. Die modifizierte (m)LST-Bouillon enthielt ausgehend von der ursprünglichen LST-Bouillon (0,5% w/v NaCl) 3,4 % bis 5 % (w/v) NaCl.

Alle eingesetzten *E. sakazakii*-Stämme konnten bis zu NaCl-Konzentrationen von 4,0 % (w/v) nachgewiesen werden. Lediglich das Wachstum eines *E. sakazakii* Isolates (NCC 70) konnte ebenfalls in höheren NaCl-Konzentrationen von 4,5 und 5 % (w/v) nachgewiesen werden. Die mitgeführten *Enterobacteriaceae*-Kontrollen *Pantoea spp.*, *Leclercia adecarboxylata* und *Citrobacter freundii* konnten bereits bei NaCl-Konzentrationen von 4,0 % (w/v) nicht mehr nachgewiesen werden. Hingegen konnten bei *Klebsiella pneumoniae* sowie *Enterobacter cloacae* noch bei NaCl-Konzentrationen von 4,0 % (w/v) und Letzterer ebenfalls bei 4,5% (w/v) Wachstum detektiert werden.



**Abbildung 38:** Keimzahlen der Versuchsstämme bei 37°C nach 24 h in Abhängigkeit vom Salzgehalt in Lauryl Sulfat Tryptose Bouillon

Aufgrund dieser Untersuchung ist ersichtlich, dass sich bei NaCl-Konzentrationen bis 4% ein Wachstumsvorteil für *E. sakazakii* und *E. cloacae* gegenüber anderen Enterobakterien wie *Pantoea spp.*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae* und *Leclercia adecarboxylata* ergibt.

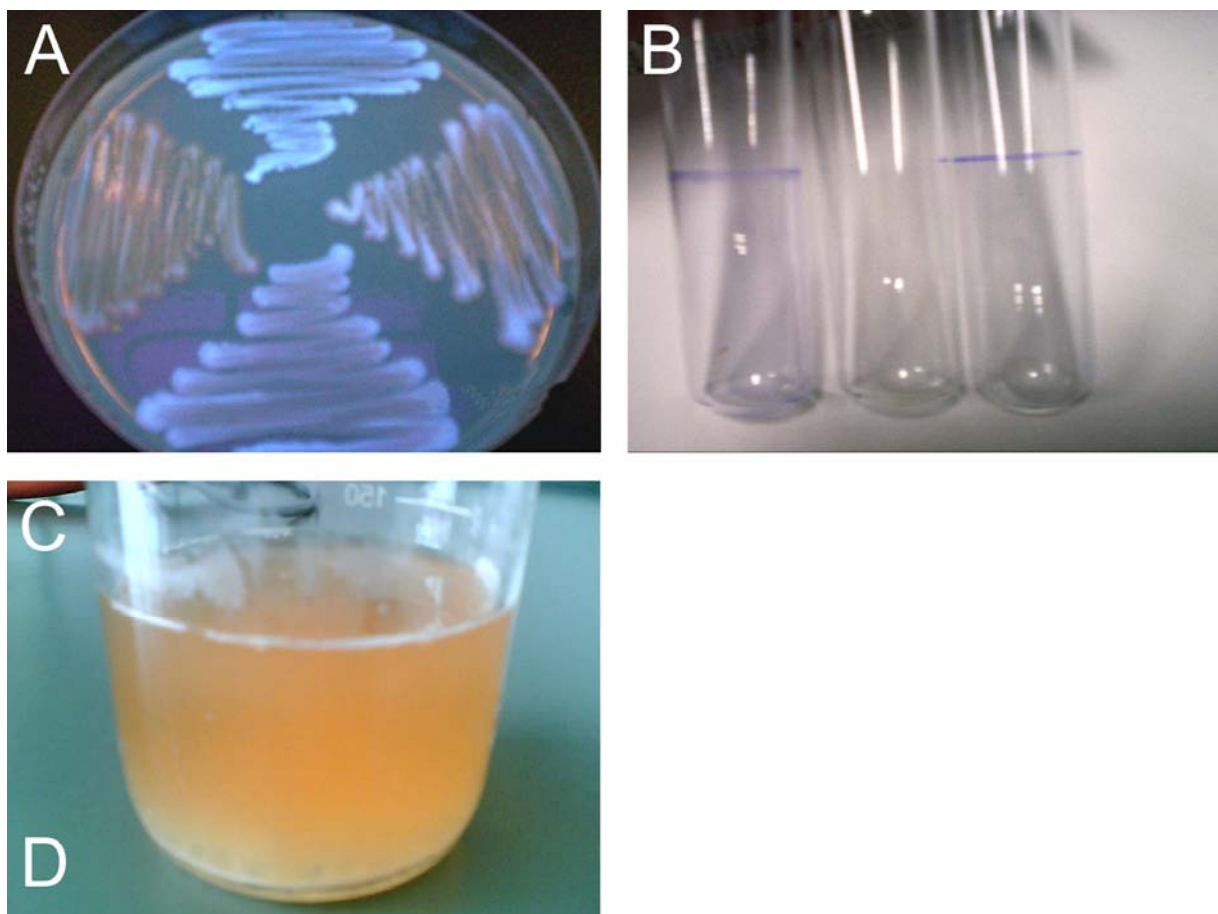
### 3.3.5 Expression von Biofilmkomponenten bei ausgewählten *Enterobacter sakazakii* - Stämmen

Für einen Vergleich der Adhärenz von 41 *E. sakazakii* Stämmen (Tab. 30) an Glas und Kunststoffoberflächen wurden Glasröhrchen und eine Polystyrol-Mikrotiterplatte eingesetzt. Vierunddreißig (82%) der untersuchten Isolate zeigten die Fähigkeit, an Glasoberflächen zu adhären und nur sieben (17%) Isolate wiesen eine Biofilmbildung in den Wells der Polystyrol-Mikrotiterplatte auf. Sieben Isolate (17%) adhärten an beiden Oberflächen.

Bei 29 (70%) der untersuchten *E. sakazakii* Isolate konnte eine Aggregatbildung in TSB bei 37°C nachgewiesen werden. Eine Pellikelbildung konnte bei 22 (54%) der untersuchten Isolate beobachtet werden. Die Stämme wurden für 24 h bei 44°C in mLST inkubiert und konnten durch Zellaggregation an der Flüssigkeit/Luft Grenze ein Pellikel bilden (Abb. 39).

Der Nachweis der Zellulose erfolgte mit Hilfe der Calcofluor (CF)-Färbung. Das Calcofluor bindet an 1-4 und 1-3-β-Glukane und fluoresziert bei Bestrahlung mit UV-Licht der Wellenlänge  $\lambda = 366$  nm. Demzufolge kann die Präsenz der Zellulose in den zu testenden Stämmen nachgewiesen werden. Aufgrund der Bindung des CF an die Zellulose fluoreszierten von 41 untersuchten *E. sakazakii* Isolaten 30 (73%) bei 28°C und 34 (83%) bei 37°C. Bei beiden Temperaturen konnten bei 37 *E. sakazakii* Isolate die Präsenz der Zellulose nachgewiesen werden.

Um einen Hinweis auf eine Produktion der extrazellulären Matrix-Komponente Curli-Fimbrien zu erlangen, wurde die Fähigkeit von *E. sakazakii*, den Farbstoff Kongorot (CR) zu absorbieren, bei zwei unterschiedlichen Temperaturen überprüft. Dabei wurden *E. sakazakii*-Stämme auf Luria-Bertani-Agar mit Kongorot als Supplement angezchtet. Stämme, die auf CR-Agarplatten ein rotes Pigment bilden, wurden als positiv bewertet. Von 39 untersuchten *E. sakazakii*-Isolate waren 18 (46%) bei 28°C und sieben (18%) bei 37°C in der Lage CR zu absorbieren. Insgesamt waren sieben Isolate in der Lage bei beiden Temperaturen CR zu absorbieren.

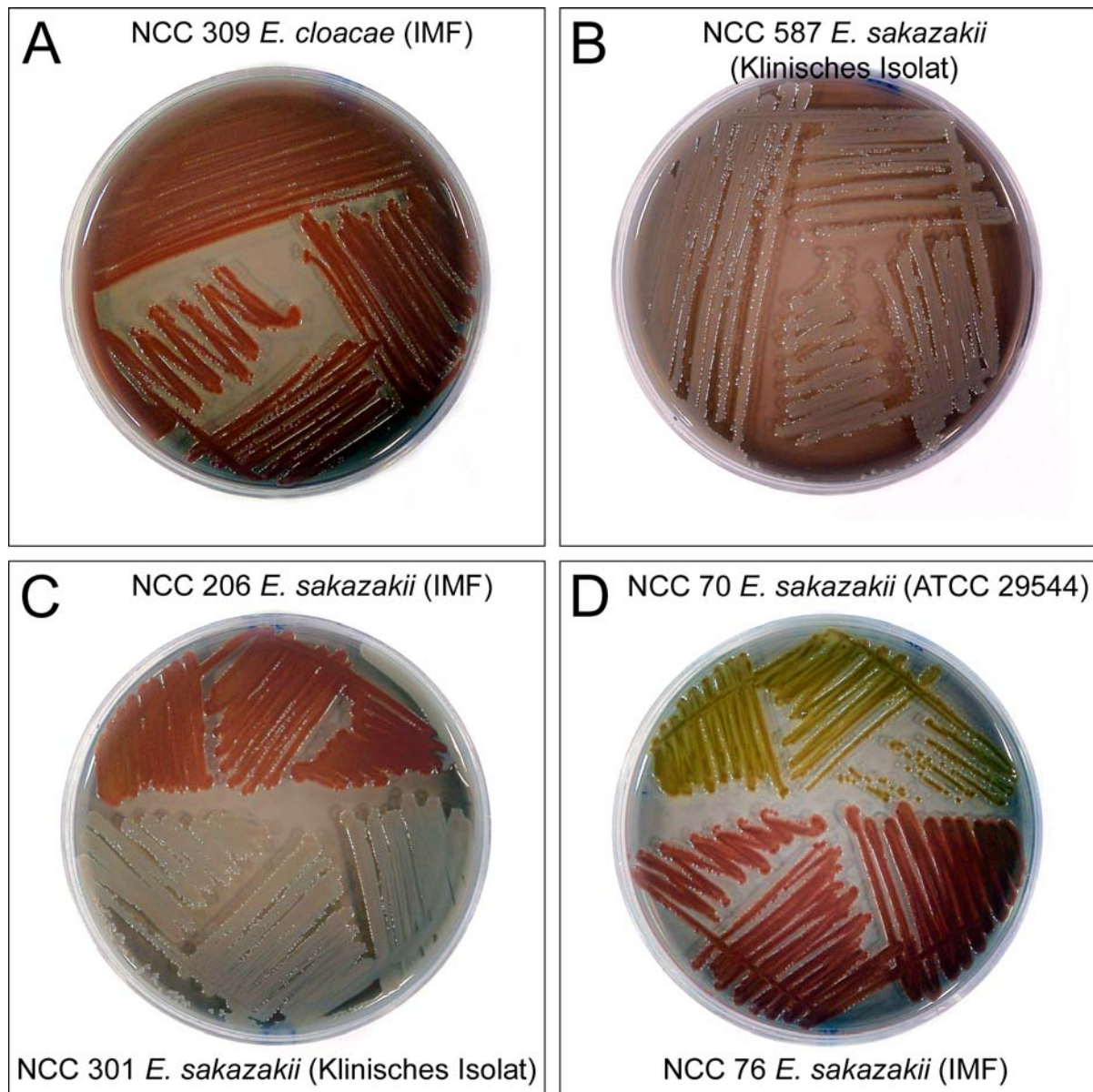


**Abbildung 39:** Erscheinungsformen des Biofilmphänotyps von *E. sakazakii*. (A) Nachweis der Zellulose durch Calcofluorfärbung; Inkubation bei 37°C für 72 h. (B) Bakterielle Adhärenz an Glas. (C) Pellicelbildung an der Flüssigkeit/Luft-Grenze. (D) Bakterienaggregate.

**Tabelle 30:** Phänotyp verschiedener *E. sakazakii*-Isolate unterschiedlicher Herkunft

Stamm-Nr.	Herkunft	Phänotyp							
		Pellikel und Bakterienaggregate		Bakterielle Adhärenz an		Absorption von Farbstoffen			
		TSB	mLST	Glasröhrchen	Polystyrol Platten	Kongorot		Calcofluor	
						28°C	37°C	28°C	37°C
ATCC 29544	Referenzstamm	+	Pellikel	+	-	-	-	-	-
NCC 916	Umfeldisolat	+	n.v.	+	-	-	-	-	-
NCC 917	Umfeldisolat	+	n.v.	+	-	-	-	-	-
NCC 918	Umfeldisolat	+	Pellikel	+	-	-	-	+	+
NCC 919	Umfeldisolat	+	n.v.	+	-	-	-	+	+
NCC 920	Umfeldisolat	+	n.v.	-	-	-	-	-	+
NCC 921	Umfeldisolat	+	n.v.	+	-	-	-	+	+
NCC 922	Umfeldisolat	-	n.v.	+	-	-	-	-	+
NCC 923	Umfeldisolat	-	n.v.	+	+	-	-	+	+
NCC 924	Umfeldisolat	-	n.v.	+	+	-	-	+	+
NCC 925	Umfeldisolat	+	Pellikel	+	-	-	-	+	+
NCC 926	Umfeldisolat	+	Pellikel	+	-	k.E.	k.E.	+	+
NCC 927	Umfeldisolat	+	n.v.	+	-	k.E.	k.E.	+	+
NCC 928	Umfeldisolat	+	n.v.	+	-	+	-	+	+
NCC 929	Umfeldisolat	+	n.v.	+	-	-	-	-	-
NCC 930	Umfeldisolat	+	n.v.	+	-	+	-	+	+
NCC 931	Umfeldisolat	+	n.v.	-	-	+	-	+	+
NCC 932	Umfeldisolat	+	Pellikel	-	-	-	-	-	-
NCC 933	Umfeldisolat	+	n.v.	-	-	-	-	-	-
NCC 934	Umfeldisolat	+	n.v.	+	-	+	-	+	+
NCC 935	Umfeldisolat	+	Pellikel	+	-	+	-	+	+
NCC 936	Umfeldisolat	+	n.v.	+	-	+	-	+	+
NCC 937	Umfeldisolat	+	Pellikel	+/-	-	-	-	+	+
NCC 938	Umfeldisolat	-	n.v.	-	-	-	-	+	+
NCC 939	Umfeldisolat	-	n.v.	-	-	+	+	+	+
NCC 940	Umfeldisolat	-	Pellikel	+/-	-	-	-	-	+
NCC 941	Umfeldisolat	+	Pellikel	+	+	+	+	+	+
NCC 942	Umfeldisolat	+	Pellikel	+	+	+	+	+	+
NCC 943	Umfeldisolat	-	Pellikel	+	-	-	-	-	+
NCC 944	Umfeldisolat	+	Pellikel	+	+	+	+	+	+
NCC 945	Umfeldisolat	+	n.v.	+	-	+	+	+	+
NCC 946	Umfeldisolat	+	n.v.	+	-	+	+	+	+
NCC 947	Umfeldisolat	+	n.v.	-	-	+	+	+	+
NCC 948	Umfeldisolat	-	n.v.	+	-	-	-	-	-
NCC 76	IMF	-	Pellikel	+	-	+	-	+	+
NCC 206	IMF	+	Pellikel	+	-	+	-	+	+
NCC 301	Klinisches Isolat	+	Pellikel	+	+	-	-	+	+
NCC 587	Klinisches Isolat	-	Pellikel	+	-	+	-	+	+
NCC 309	IMF	-	Pellikel	+	+	-	-	+	+
NCC 107	IMF	+	Pellikel	+	-	+/-	-	+	+
NCC 172	IMF	-	Pellikel	+	-	+	-	+	+

n.v.-nicht vorhanden; + positiv; - negativ; +/- Ergebnis nicht eindeutig; k.E. - kein Ergebnis; IMF-Infant Milk Formula



**Abbildung 40:** Charakteristisches Erscheinungsbild von *E. sakazakii* auf Congored-Agarplatten. (A) *E. cloacae* NCC 309 (Isoliert aus Anfangsnahrung). (B) *E. sakazakii* NCC 587 (Klinisches Isolat). (C1) NCC 206 *E. sakazakii* (Isoliert aus Anfangsnahrung). (C2) *E. sakazakii* (ATCC 29544). (D1) *E. sakazakii* NCC 301 (Klinisches Isolat). (D2) *E. sakazakii* NCC 76 (Isoliert aus Anfangsnahrung).

### 3.3.6 Untersuchung gängiger Nachweismethoden auf ihre Eignung zur Detektion gestresster Bakterien

Zur Kontrolle des Produktionsumfeldes wurde eine Probennahme aus der kritischen Zone des Sprühturms und der Abfüllanlage durchgeführt. In diesen Zonen wurden Proben von Böden, Abflüssen, Staubsaugern und Schuhsohlen entnommen (Tabelle 28). Die Untersuchungsfläche für Tupferproben betrug 25 cm<sup>2</sup> bis 1m<sup>2</sup>.

**Tabelle 31:** Umfeldmonitoring: Übersicht zu den *E. sakazakii* Positiven im Produktionsumfeld

Ort der Probennahme	Art der Probennahme	Anzahl der Proben	<i>E. sakazakii</i> positiv in %
	Tupferprobe von 25cm <sup>2</sup> - Fläche	25	0%
Böden / Abfluss	Tupferprobe von 100cm <sup>2</sup> -Fläche	36	5.6%
	Tupferprobe von 1m <sup>2</sup> -Fläche	59	25.4%
	-----		
Staubsauger	100g Pulverabfall	100	37,0 %
-----			
Schuhe	Tupferprobe von Schuhsohlen	8	25.0%
-----			
Luft	Luftkeimsammler	12	0%

Bei der Probennahme mittels Tupfer von einer Fläche von 25 cm<sup>2</sup> waren alle 25 getesteten Flächen *E. sakazakii*-negativ. Mit Vergrößerung der zu testeten Fläche konnte ebenfalls eine Zunahme der *E. sakazakii* positiven Ergebnisse mit 5,6% (100cm<sup>2</sup>) und 25,4% (1m<sup>2</sup>) verzeichnet werden. Die Untersuchungen von anfallenden Pulverabfällen in Staubsaugern waren mit 37% und 25 % der Tupferproben von Schuhsohlen positiv für *E. sakazakii*. Alle geprüften Luftproben (n=12) im Produktionsraum waren negativ.

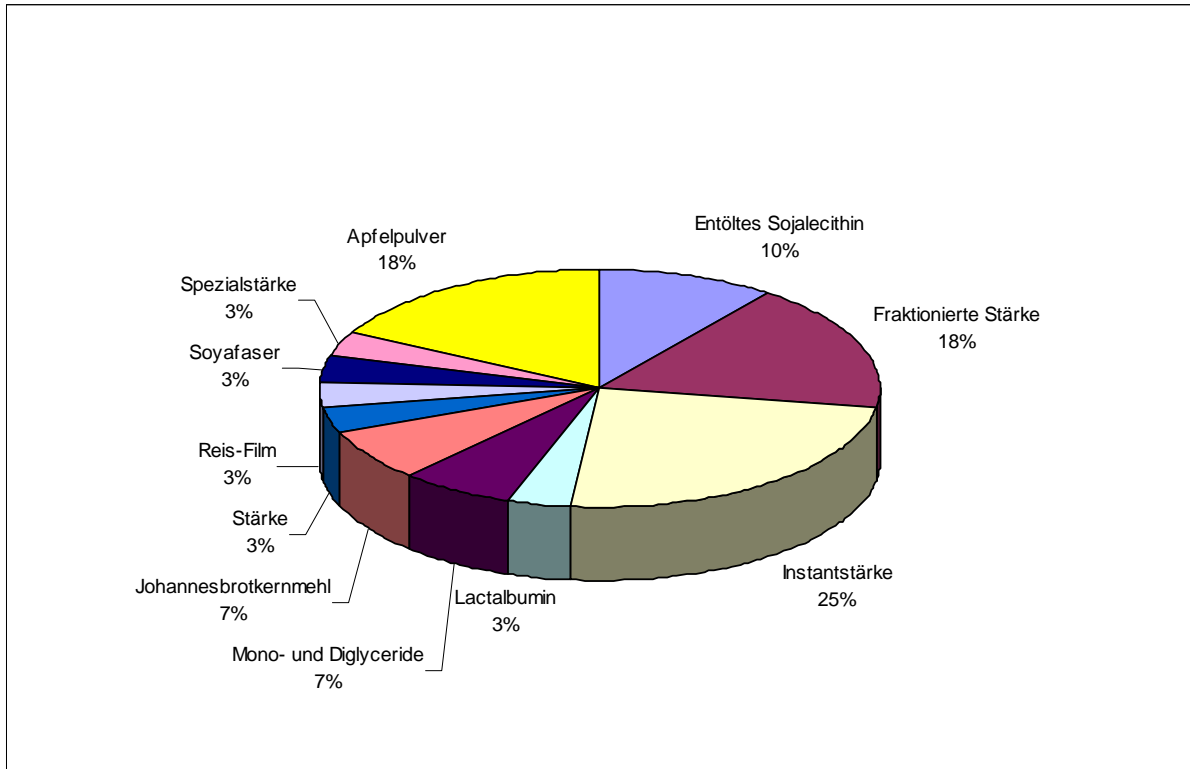
### 3.3.7 Untersuchung kritischer Rohstoffe

#### 3.3.7.1 Identifizierung kritischer Rohstoffe und ihrer Kontaminationshäufigkeit

Die zur Herstellung von Säuglingsnahrung zugesetzten Rohstoffe wurden evaluiert (Tab. 32) und die als kritisch eingestuften Rohstoffe näher betrachtet (Abb. 41). Die Zugabe der Rohstoffe erfolgt zumeist nach dem Erhitzungsschritt und ist somit für eine mögliche Kontamination als kritisch einzustufen. Für das Verdickungsmittel Stärke wurde ein *E. sakazakii*-Kontaminationslevel von <0,3 bis 2,5 KbE/100g und für Johannisbrotkernmehl von <0,3 bis 4,3 KbE/100g ermittelt. Aber auch bei Mono- und Diglyceriden wurde *E. sakazakii* mit 0,92-7,5 KbE/100g detektiert. Als Quellstoff eingesetzt erwiesen sich Reisfilm und Sojafaser mit einer Kontamination von 0,6 und 0,36 KbE/100g ebenfalls als kritische Rohstoffe. Die Rohstoffe Akazia Gum, Zellulose, Kalziumkaseinat, Magermilchpulver, Laktose, Bananenflocken und Apfelaroma konnten aufgrund einer geringen Kontamination mit <0,3 KbE/100g als nicht kritisch eingestuft werden.

**Tabelle 32:** Übersicht der kontaminierten Rohstoffe

Rohstoff	Anzahl der Proben			<i>E.sakazakii</i> KbE/100g	
	Σ	neg	pos		% pos
<u>Verdickungsmittel</u>					
Stärke	25	24	1	4	<0,3 - 0,36
Fraktionierte Stärke	31	26	5	16	<0,3 - 0,7
Spezialstärke	9	8	1	13	<0,3 - 0,36
Instantstärke	19	12	7	37	<0,3 - 2,5
Johannesbrotkernmehl	13	11	2	15	<0,3 - 4,3
Akazia Gum	4	4	0	0	<0,3
<u>Emulgator</u>					
Mono- und Diglyceride	3	1	2	66	0,92 - 7,5
Entöltes Sojalecithin	4	1	3	75	0,36
<u>Quellstoff</u>					
Reis-Film	2	1	1	50	0,6
Sojafaser	12	11	1	8	0,36
Zellulose	4	4	0	0	<0,3
<u>Sonstiges</u>					
Lactalbumin	1	0	1	100	0,7 - 1,5
Kalziumkaseinat	30	30	0	0	<0,3
Magermilchpulver	2	2	0	0	<0,3
Laktose	3	3	0	0	<0,3
Apfelpulver	10	5	5	50	<0,3 - 9,3
Bananenflocken	8	8	0	0	<0,3
Apfelaroma	2	2	0	0	<0,3



**Abbildung 41:** Kontaminationsrate ausgewählter kritischer Rohstoffe (in %)

### 3.3.8 Bestimmung der Kontaminationsrate von *Enterobacteriaceae* im Verhältnis zu *Enterobacter sakazakii*

Im Rahmen dieser Untersuchung wurden insgesamt 269 Proben Säuglingsanfangsnahrung auf Trockenmilchpulverbasis von zwei Betrieben untersucht (Tab. 33). Diese umfasste die Analyse von jeweils drei Proben (Anfang, Mitte und Ende) eines Batches im MPN-Verfahren (3x100g, 3x10g und 3x1g) auf *Enterobacteriaceae* und *E. sakazakii*. Die ermittelte Kontaminationsrate in Trockenmilchpulver liegt für beide Betriebe insgesamt für *Enterobacteriaceae* bei 16,7 % und für *E. sakazakii* bei 2,97 % (Verhältnis *Enterobacteriaceae* : *E. sakazakii* = 5,6 : 1), die Höhe der Belastung bei 0,3 -21 *Enterobacteriaceae* KbE/100g bzw. bei 0,3-0,92 *E. sakazakii* KbE/100g Milchpulver.

**Tabelle 33:** Kontaminationen von Säuglingsanfangsnahrung mit *Enterobacteriaceae* und *E. sakazakii* in Betrieb 1 und Betrieb 2.

	Betrieb 1		Betrieb 2		Σ n=269
	Batches n=56	Proben n=164	Batches n=35	Proben n=105	
<i>Enterobacteriaceae</i> positiv in 333 g	14 (25 %)	20 (12,2 %)	18 (25,1 %)	25 (23,8 %)	16,7%
<i>E. sakazakii</i> positiv in 333 g	3 (5,35 %)	5 (3,0 %)	3 (8,57 %)	3 (2,85 %)	2,97%

Der Epsilon-Faktor (MOSSEL & STRUIJK, 1995), der das Verhältnis von Koloniebildenden Einheiten (KbE) des Indikators *Enterobacteriaceae* zu den KbEs des Erregers *E. sakazakii* beschreibt, liegt für Betrieb 1 bei 1,3 KbE : 0,5 KbE pro 100g (2,6 :1) und für Betrieb 2 bei 2,1 KbE : 0,6 KbE pro 100g (3,5 : 1) (Tab. 34).

**Tabelle 34:** Verhältnis von *Enterobacteriaceae* zu *E. sakazakii*

	Verhältnis (positiver Proben) <i>Enterobacteriaceae</i> : <i>E. sakazakii</i>	Epsilon-Faktor
Betrieb 1	4,1:1	2,6:1
Betrieb 2	2,92:1	3,5:1

Von Betrieb 1 (Tab. 35) wurden insgesamt 164 Proben analysiert, wovon 5 Proben sowohl für *Enterobacteriaceae* als auch für *E. sakazakii* positiv waren. Hier konnten somit alle *E. sakazakii*-positiven Proben in beiden Methoden erfasst werden. Als ausschließlich *Enterobacteriaceae*-positiv erwiesen sich 16 der getesteten Proben. Hierbei konnten aber andere Spezies als *E. sakazakii* identifiziert werden.

**Tabelle 35:** Untersuchungsergebnisse für *Enterobacteriaceae* und *E. sakazakii* in Säuglingsanfangsnahrung von Betrieb 1

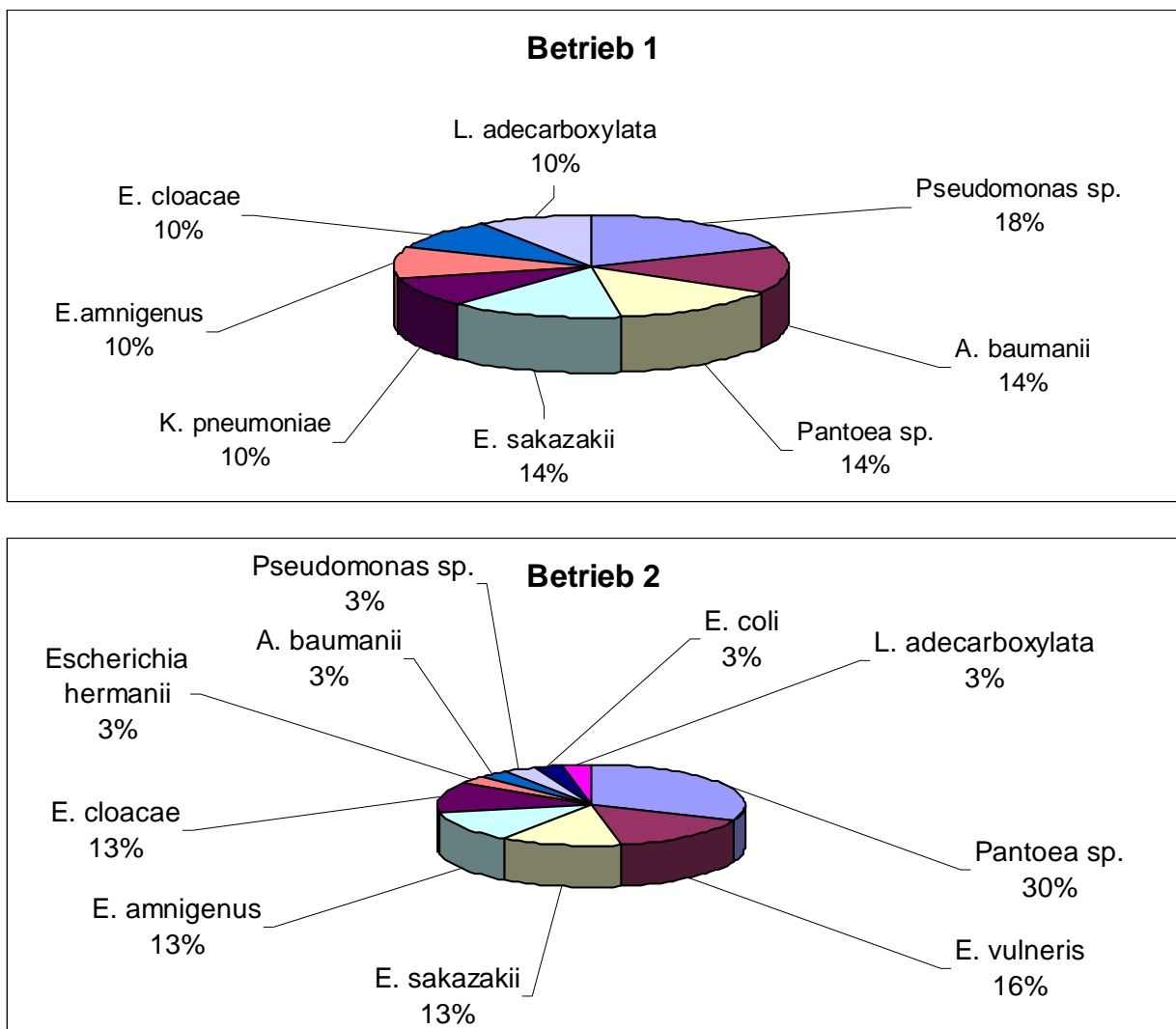
Betrieb 1	<i>E. sakazakii</i>		Gesamt
	Positiv	Negativ	
<i>Enterobacteriaceae</i>			
Positiv	5	16	21
Negativ	0	143	143
Gesamt	5	159	164

Es wurden insgesamt 105 Proben aus Betrieb 2 untersucht (Tab. 36), wovon 4 Proben sowohl für *Enterobacteriaceae* als auch für *E. sakazakii* positiv waren. Auch hier konnten somit alle *E. sakazakii*-positiven Proben in beiden Methoden erfasst werden. Als ausschließlich *Enterobacteriaceae*-positiv erwiesen sich 23 der analysierten Proben. Hierbei konnten ebenfalls andere Spezies als *E. sakazakii* identifiziert werden.

**Tabelle 36:** Untersuchungsergebnisse für *Enterobacteriaceae* und *E. sakazakii* in Säuglingsanfangsnahrung von Betrieb 2

Betrieb 2	<i>E. sakazakii</i>		Gesamt
	Positiv	Negativ	
<i>Enterobacteriaceae</i>			
Positiv	4	23	27
Negativ	0	78	78
Gesamt	4	101	105

Um einen Überblick über die Betriebsflora in den Säuglingsmilchnahrung herstellenden Betrieben 1 und 2 zu erhalten, wurden in diesen Untersuchungen die mit dem API32E identifizierten Stämme näher betrachtet (Abb. 42). Im Vergleich der identifizierten Stämme aus der *Enterobacteriaceae* und *E. sakazakii*-Methode ergab sich in den Betrieben 1 und 2 für die Spezies *E. sakazakii* (14% und 13%), *E. cloacae* (10% und 13%) und *E. amnigenus* (10% und 13%) ein ähnliches Bild. *Pantoea* sp. und *Pseudomonas* sp. wurden in Betrieb 1 mit 14% und 18% geringer als in Betrieb 2 mit 30% und 3% detektiert. Hingegen konnten die Spezies *E. coli*, *E. vulneris* und *E. hermanii* nur in Betrieb 2 und *K. pneumoniae* nur in Betrieb 1 identifiziert werden.



**Abbildung 42:** Anteil der mit dem biochemischen Identifizierungssystem API 32E identifizierten Enterobacteriaceenspezies in Betrieb 1 und Betrieb 2.

Im Vergleich der mittels *Enterobacteriaceae*- und *E. sakazakii*-Methode isolierten Stämme konnten mit beiden Methoden übereinstimmend 6 Isolate als *E. sakazakii* identifiziert werden (Tab. 37). Lediglich zwei Isolate wurden in der *Enterobacteriaceae*-Methode nicht als *E. sakazakii* erfasst.

**Tabelle 37:** Vergleich der Identifizierungsergebnisse mittels API 32E im Vergleich zu der isolierenden klassisch mikrobiologischen *Enterobacteriaceae*- und der *E. sakazakii*-Methode

Identifizierung von <i>E. sakazakii</i> mit API 32 E	<i>E. sakazakii</i> -Methode		Gesamt
	Positiv	Negativ	
<i>Enterobacteriaceae</i> -Methode			
Positiv	6	0	6
Negativ	2	261	263
Gesamt	8	261	269

## 4 DISKUSSION

### 4.1 Phänotypische Eigenschaften

In der vorliegenden Arbeit wurden aufgrund physiologischer, biochemischer und molekularer Eigenschaften 312 Isolate analysiert und als *Enterobacter sakazakii* identifiziert. In die verschiedenen Untersuchungen wurden unterschiedlich viele Isolate einbezogen. FARMER *et al.* (1977) und BRENNER *et al.* (1977) beschrieben *E. sakazakii* als gramnegatives, unbewegliches Stäbchen mit gelb pigmentierten Kolonien.

#### Gelbpigmentierung

Die unterschiedliche Gelbpigmentierung der Stämme ermöglichte eine phänotypische Differenzierung der Isolate. In diesen Untersuchungen wurden 27 *E. sakazakii*-Isolate auf die Gelbpigmentierung auf TSA bei einer Inkubationstemperatur von 30°C untersucht. Hierbei bildeten 81% der Isolate ein gelbes Pigment nach 72 h, 74% der Isolate konnten nur ein hellgelbes Pigment nach 48 h bilden und 22% der Isolate wuchsen als weiße, unpigmentierte Kolonien in einer Inkubationszeit von 24 h. In den vorliegenden Untersuchungen konnte eine ausreichende Gelbfärbung bei allen Stämmen erst nach 72 Stunden bei einer Anzüchtung auf TSA bei einer Temperatur von 30°C erreicht werden. Die bisher gängigen Methoden zum Nachweis von *E. sakazakii* (FDA, 2002; MUYTJENS *et al.* 1988; NAZAROWEC-WHITE und FARBER 1997a; KANDHAI *et al.* 2004b) machen sich als primäres Selektionskriterium nach der Selektivanreicherung die Gelbpigmentierung der Kolonien TSA zunutze. Die Intensität der Gelbfärbung ist aber von der Inkubationsdauer und vom Bakterienstamm abhängig.

Die Inkubationstemperatur spielt im üblichen Rahmen von 20-40°C keine Rolle für die Ausprägung der Pigmentierung. Durch diese schwankende Gelbintensität ist eine eingeschränkte Sensitivität der herkömmlichen Methoden zu befürchten. Die Intensität der Pigmentierung variiert in Abhängigkeit vom Stamm und kann somit nur als zusätzliches Merkmal zur Identifizierung von *E. sakazakii* herangezogen werden. Angaben in der Literatur zufolge ist die Gelbpigmentierung durch die Exposition an weißem Licht während der Inkubation von 37°C für 24 h deutlich ausgeprägter (KANDHAI *et al.*, 2004b) und bringt somit eindeutig mehr Vorteile im Vergleich zu den bisher beschriebenen Methoden basierend auf einer Inkubation für 2-3 Tage bei 25°C (FDA, 2002; FARMER *et al.*, 1980; MUYTJENS *et al.*, 1988). Die Durchführung einer Inkubation bei Licht bedarf eines Brutschranks mit integrierter Lichtquelle, welche unüblich ist und nicht der gängigen Laborausrüstung entspricht.

## Kohlenstoffverwertung

In der vorliegenden Untersuchung wurden 108 Isolate detailliert biochemisch charakterisiert. Nahezu alle (99%) Isolate waren in der Lage, die Kohlenhydrate Lactose und Citrat zu verwerten. Sorbitol hingegen konnte von 95% der Isolate nicht umgesetzt werden. Diese Eigenschaften entsprachen im Wesentlichen den Angaben von FARMER *et al.* (1980). HEUVELINK *et al.* (2001) hingegen berichten von *E. sakazakii*-Stämmen, die in der Lage sind D-Sorbitol, zu fermentieren. Dies konnte für 5% der Stämme nachgewiesen werden.

## Enzymaktivitäten

Zur weiteren Differenzierung zwischen *E. sakazakii* und anderen *Enterobacteriaceae* eignet sich der positive Nachweis von Tween<sup>TM</sup> 80-Esterase. Die Tween<sup>TM</sup> 80-Esterase-Aktivität konnte in den vorliegenden Untersuchungen bei 98% von 108 Isolaten nach 24 h Inkubationszeit bei 37°C beobachtet werden. Vergleichbare Ergebnisse konnten auch in den Studien von ALDOVÁ *et al.* (1983) und POSTUPA und ALDOVÁ (1984) gesehen werden.

Das Enzym  $\alpha$ -Glucosidase war bei allen 108 *E. sakazakii* Isolaten der vorliegenden Untersuchung nachweisbar. Die Bildung des Enzyms  $\alpha$ -Glucosidase in Medien mit 4-Nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside als Substrat gilt als eine typische Eigenschaft von *E. sakazakii* (MUJTJENS *et al.*, 1984). Für den Ausschluss von falsch-positiven Ergebnissen durch die Gelbpigmentierung wird der Nachweis von  $\alpha$ -Glucosidase als zusätzlicher Bestätigungstest empfohlen (MUJTJENS, 1985). Die  $\alpha$ -Glucosidase ist ebenfalls Basis der Differenzierungsreaktion auf den chromogenen Nährmedien Druggan-Forsythe-Iversen-Agar (DFI) (IVERSEN *et al.*, 2004a), *Enterobacter sakazakii* Isolation Agar (ESIA) (AES Laboratories, 2005) und *Enterobacter sakazakii* Plating Medium (ESPM) (RESTAINO, 2005). Das chromogene Substrat 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\alpha$ -D-glucopyranosid (X- $\alpha$ Glc) erbringt die gewünschte Farbreaktion und weist somit die  $\alpha$ -Glucosidase-Aktivität nach, indem die Phosphatgruppe abspaltet. Dadurch wird in Anwesenheit von Sauerstoff der Indolylrest zum Indigoderivat oxidiert, welches die *E. sakazakii* Kolonien auf dem Nachweismedium DFI blau-grün erscheinen lässt. Auf ESIA erscheinen die Kolonien blau und auf ESPM blau-schwarz. Die Sensitivität der chromogenen Nachweismedien lag in diesen Untersuchungen bei 120 überprüften *E. sakazakii* Isolaten für ESIA bei 97,9% und für DFI und ESPM bei 100%. Die einzelnen Nährmedien wiesen bei der Spezifität hingegen wesentliche Unterschiede auf. Die Spezifität bei dem DFI lag bei nur 88%. Hingegen konnte bei den Nährmedien ESIA und ESPM eine Spezifität von 92,6% und 100% ermittelt werden. Von vergleichbaren Ergebnissen berichtet auch MANAFI und LANG (2005), GURTLER und BEUCHAT (2005) und IVERSEN (2006). Die chromogenen Nachweismedien ESIA und ESPM erwiesen sich durchaus als effiziente Methode, um zwischen *E. sakazakii* und

anderen Bakterienspezies zu unterscheiden. Ein weiteres Medium zum selektiven Nachweis von *E. sakazakii* lässt die Kolonien gelb erscheinen und diese fluoreszieren unter UV-Licht auf Trypton Soya Agar mit 4-Methyl-umbelliferyl-  $\alpha$ -D-glucoside (TSA+ $\alpha$ -MUG) als Substrat (LEUSCHNER und BEW, 2004). In diesen Untersuchungen wurden für TSA+ $\alpha$ -MUG eine Sensitivität von 100% und eine Spezifität von lediglich 47,6% ermittelt. Die guten Ergebnisse des TSA+ $\alpha$ -MUG zur Differenzierung von *E. sakazakii* von anderen *Enterobacter*- und Nicht-*Enterobacter*-Spezies in einer Laborvergleichsuntersuchung von LEUSCHNER und BEW (2004) konnten nicht bestätigt werden. Die Enzymaktivität der in der vorliegenden Arbeit untersuchten 34 *E. sakazakii* Isolate, ermittelt mit dem API ZYM-System, bietet eine weitere Möglichkeit zur phänotypischen Charakterisierung. MUYTJENS *et al.* (1984) zeigten in ihrer Studie, dass die größten Unterschiede bei der Differenzierung zwischen *E. sakazakii* und anderen *Enterobacteriaceae* in der Anwesenheit von  $\alpha$ -Glucosidase und in der Abwesenheit von Phosphoamidase liegt. Bei allen in der vorliegenden Arbeit untersuchten *E. sakazakii*-Isolaten konnte zu 100% die Anwesenheit von  $\alpha$ -Glucosidase bestätigt werden. Eine vollkommene Abwesenheit von Phosphoamidase konnte wie bei MUYTJENS *et al.* (1984) nicht bestätigt werden. Bei 65% der untersuchten Isolate war nachweislich eine Phosphoamidase-Aktivität vorhanden.

### **Biotypisierung**

In den vorliegenden Untersuchungen wurden des Weiteren 188 Isolate exemplarisch mit dem biochemischen Identifizierungssystem API 32E biochemisch charakterisiert. Alle Isolate waren in der Lage die Substrate Mannit, Maltose, Glucose, Saccharose, Trehalose und Rhamnose umzusetzen und zeigten eine Aktivität für Ornithindecaboxylase, Arginindihydrolase, Lipase,  $\beta$ -Glukosidase,  $\beta$ -Galactosidase,  $\alpha$ -Glucosidase und  $\alpha$ -Galactosidase. Adonit, Malonat und D-Arabitol konnten dagegen nicht umgesetzt und für Lysindecaboxylase,  $\beta$ -Glukuronidase und L-Aspartat-Arylamidase keine Aktivität nachgewiesen werden. Diese Eigenschaften entsprachen im Wesentlichen den Angaben von FARMER *et al.* (1980). In diesen Untersuchungen wurde Cellobiose nur von 40% der untersuchten Stämme umgesetzt, entgegen den Angaben in der API 32E-Datenbank (bioMérieux® Deutschland GmbH, V. 2.0) und den Untersuchungen nach FARMER *et al.* (1980), in denen 100% aller untersuchten, Isolate in der Lage waren, dieses Substrat umzusetzen. Die Biotypisierung, basierend auf einer großen Bandbreite an biochemischen und kultivierungsabhängigen Tests, ist wohl die am meisten praktizierte Methode zur Typisierung bei für molekularbiologische Methoden unzureichender Laborausstattung (PODSCHUN und ULLMAN, 1998). Die Biotypisierung kann in biochemischen Einzeltests (RENNIE *et al.*, 1974) oder in Kombination mit einem miniaturisierten Identifizierungssystem wie dem API 32E-System erfolgen (IVERSEN *et al.*, 2006). FARMER *et al.* (1980) definierten

15 Biogruppen aus 57 *E. sakazakii*-Isolaten. Zugrunde lagen die Substrate und Reaktionen Inositol, Beweglichkeit, Ornithindecaboxylase, Malonat, Indol, Gasbildung, Nitrit, Dulcitol, Methyl-Rot, Voges-Proskauer und  $\alpha$ -Methylglucosid. In diesen Untersuchungen stimmt das untersuchte biochemische Spektrum nicht vollständig mit FARMER *et al.* (1980) überein. Die Ergebnisse von FARMER *et al.* (1980) und IVERSEN *et al.* (2006), bei denen der größte Teil der untersuchten Isolate der Biogruppe 1 mit dem Referenzstamm *E. sakazakii* ATCC 29544 zugeordnet werden konnten, konnten in diesen Untersuchungen bestätigt werden. Die Mehrheit der in diesen Untersuchungen überprüften Isolate (59/188 Isolate) konnte zur Biogruppe 1, gefolgt von Biogruppe 2 (52/188 Isolate) zugeordnet werden. Die Biogruppen 3 bis 13, bestehend aus mindestens zwei Isolaten, unterscheiden sich nach Abgleich mit dem Referenzprofil des ATCC 29544 Stammes in bis zu 7 verschiedenen Reaktionen wie Inosit, Cellobiose, Maltosidase, Palatinose, Arabinose und N-Acetyl- $\beta$ -Glucosamidase. Alle weiteren 23 Isolate der Biogruppen 14-37, vertreten durch nur ein Isolat, konnten aufgrund der biochemischen Varianz den Biogruppen 1-37 nicht zugeordnet werden.

### **Antibiotikaempfindlichkeiten**

Zur weitergehenden Charakterisierung der *E. sakazakii*-Isolaten eignet sich die Untersuchung ihres Resistenzverhaltens gegenüber Antibiotika. Einen Überblick über Antibiotikaresistenzen bei *Enterobacteriaceae*, unter anderem auch bei *E. sakazakii*, gaben SANDERS und SANDERS (1997) sowie MUYTJENS und VAN DER ROS-VAN DE REPE (1986). FARMER *et al.* (1980) gaben an, dass 100% der 24 untersuchten Isolate mit dem Agar-Diffusions-Verfahren nach Kirby-Bauer empfindlich gegenüber Gentamycin, 92% gegenüber Streptomycin, 100% gegenüber Kanamycin, 87% gegenüber Tetracyclin, 100% gegenüber Chloramphenicol und 100% gegenüber Ampicillin seien. Zur Erstellung von Resistenzmustern wurden in der vorliegenden Arbeit 15 Antibiotika ausgewählt. Alle 67 (100%) *E. sakazakii*-Isolate erwiesen sich mit dem Agar-Diffusions-Verfahren nach Kirby-Bauer als empfindlich gegenüber Ampicillin, Cefixim, Ciprofloxacin, Gentamicin, Kanamycin, Streptomycin, Oxytetracyclin, Neomycin und Tetracyclin. Diese Ergebnisse entsprachen weitestgehend den Angaben von IVERSEN und FORSYTHE, (2003). Eine variable Empfindlichkeit hingegen konnte gegenüber den Antibiotika Chloramphenicol, Erythromycin und Spectinomycin festgestellt werden. Resistenzen gegenüber Methicillin, Oleandomycin und Sulphamethoxazol zeigten alle 67 untersuchten *E. sakazakii*-Isolate. Von einer Resistenz gegenüber Sulphamethoxazol berichteten ebenfalls MUYTJENS und VAN DER ROS-VAN DE REPE (1986). MUYTJENS *et al.* (1983) berichten von *E. sakazakii* - Isolaten, die trotz ihrer *in-vitro*-Empfindlichkeit gegenüber Ampicillin, Gentamycin, Chloramphenicol und Kanamycin bei der Behandlung bei sechs von acht Patienten nur schwach ansprachen

und schließlich zum Tode führten. Eine generelle Vorgabe zur antimikrobiellen Therapie von *E. sakazakii*-Infektionen kann laut BLOCK *et al.* (2001) nicht gemacht werden.

Diese nicht-standardisierten *in-vitro*-Empfindlichkeitstests können bei der Behandlung von infizierten Patienten nur unterstützend eingesetzt werden.

## 4.2 Genotypische Eigenschaften

### Nachweis *E. sakazakii*-spezifischer Genabschnitte

Für die Identifizierung von *Enterobacter sakazakii* mit konventionellen qualitätsabhängigen Verfahren werden zwischen vier und zehn Tagen benötigt. Der Einsatz molekularer Untersuchungsverfahren führt zu einer deutlichen Verkürzung des Zeitraums bis zur Identifizierung. Durch molekulare Analysen bestimmter Abschnitte des bakteriellen Genoms ist eine PCR-vermittelte Identifizierung einer Bakterienspezies möglich. Bei der PCR, entwickelt von MULLIS (MULLIS und FALOONA, 1987), handelt es sich um eine *in-vitro*-Amplifikation von Nukleinsäurefragmenten, die heute eine Identifizierung und Charakterisierung von Bakterien auf molekularer Ebene ermöglicht. Vorwiegend kommen die codierenden Gene der ribosomalen RNAs (rRNA) für eine phylogenetische Klassifizierung bzw. molekulare Typisierung von Mikroorganismen zum Einsatz (WOESE, 1987).

Die Amplifizierung von 16S rRNA-spezifischen Genabschnitten zur PCR-vermittelten Identifizierung von *E. sakazakii* unter Verwendung von speziesspezifischen Oligonukleotidprimern wurde bereits von STEPHAN *et al.* (2005), HASSAN *et al.* (2005), SEO und BRACKETT *et al.* (2005) beschrieben.

In den vorliegenden Untersuchungen konnten unter Verwendung der von STEPHAN *et al.* (2005), HASSAN *et al.* (2005) und SEO und BRACKETT (2005) beschriebenen Oligonukleotidprimer durch das Amplifizieren von 16S rRNA-spezifischen Genabschnitten, von 84 untersuchten Isolate alle als *E. sakazakii* identifiziert werden.

Die 69 im BAX<sup>®</sup>-System getesteten *E. sakazakii*-Isolate wurden zu 100 % erkannt. Für die anderen *Enterobacteriaceae* ergaben sich bei Verwendung des API 32E-Ergebnisses als Referenz in 14 Fällen falsch-positive Ergebnisse für verschiedene Spezies (*E. cloacae*, *E. asburiae*, *E. amnigenus*, *Pantoea* spp., *K. oxytoca*, *Escherichia vulneris*, *Serratia rubidea*, *Serratia marcescens*). Die PCR unter Verwendung des Primerpaars nach LEHNER *et al.* (2004) (PCR1) zeigte nach dem Amplifizieren von *E. sakazakii*-Stämmen jeweils ein typisches Amplikon mit einer Größe von 929 Basenpaaren. Bei dieser PCR wurden allerdings für acht weitere *Enterobacteriaceae*-Spezies auch falsch-positive Resultate ermittelt. Mit der Methode nach HASSAN *et al.* (2005) auf Basis der 16S rRNA (PCR2) bzw. der Methode auf Basis des MMS-Gens (PCR3) nach SEO und BRACKETT (2005) konnten

jeweils alle *E. sakazakii*-Isolate eindeutig identifiziert werden. Alle anderen untersuchten Isolate ergaben jeweils negative Ergebnisse.

Zusammenfassend wurden mit allen eingesetzten Verfahren für Isolate von *E. sakazakii* stets positive Identifizierungen erzielt. Mittels des kommerziellen PCR-Systems sowie mit PCR1 wurden jedoch in erheblichem Umfang auch andere Spezies detektiert, was im Hinblick auf die Identifizierung als falsch-positive Ergebnisse zu werten ist. Dies ist insbesondere deshalb von Bedeutung, da die von diesen Verfahren „mit erkannten“ *Enterobacteriaceae* teilweise auch in Säuglingsnahrungsmitteln vorkommen können.

Das BAX-System und PCR1 erkennen *E. sakazakii* mit einer Sicherheit von 100%, wobei für 7,2 % bzw. 8,8% der eingesetzten *Enterobacteriaceae* eine Abweichung zum API-Ergebnis auftritt. Beide Methoden können als Screening auf *E. sakazakii* eingesetzt werden. Die PCR2 und PCR3-Methoden eignen sich zur Bestätigung von *E. sakazakii*.

Der konventionelle Nachweis von *E. sakazakii* ist mit einem Protokoll von vier bis zehn Tagen sehr mühsam und zeitaufwendig. Die *realtime* PCR (qPCR) wird als Schnellmethode bzw. Screeningmethode zum direkten Nachweis nach Voranreicherung in Lebensmitteln in Erwägung gezogen (MALORNY und WAGNER, 2005). Die *realtime* PCR wurde bereits erfolgreich zum Nachweis von pathogenen Keimen wie *Salmonella Enteritidis* und *Listeria monocytogenes* eingesetzt (MALORNY *et al.*, 2004; RODRIGUEZ-LAZARO *et al.*, 2004; SEO *et al.*, 2004). Ein *realtime*-Verfahren zum Nachweis von *E. sakazakii* wurde bereits von SEO und BRACKETT (2004), HEUVELINK *et al.* (2004), MALORNY und WAGNER (2005) und LIU *et al.* (2005) beschrieben.

SEO und BRACKETT (2005) entwickelten und evaluierten ein 5'-Nuclease 'realtime' PCR Protokoll zum Nachweis von *E. sakazakii* in Säuglingsnahrung. Dieses Protokoll nutzt eine *TaqMan*-Sonde, um einen bestimmten Teil des Macromolecular Synthesis (MMS) Operon zu amplifizieren. Insbesondere wurden spezifische Primer eingesetzt, um eine Amplifikation zwischen dem 3'-Ende des *rpsU* und des 5'-Ende des *dnaG* innerhalb des MMS Operon in Kombination mit einer 'Probe' durchzuführen mit anschließender Evaluierung. Die Autoren erzielten mit dieser Methode für eine Reinkultur und für rekonstituierte Milchnahrung ohne Voranreicherung eine Nachweisgrenze von 100 KBE *E. sakazakii* pro ml.

In der vorliegenden Arbeit wurden 61 *E. sakazakii*-Isolate nach einem Protokoll von DRUDY *et al.* (2006) in Anlehnung an SEO und BRACKETT (2005) auf Basis des MMS-Operon untersucht und eindeutig als positiv erkannt. Die mitgeführten Kontrollen der *Enterobacteriaceae*-Spezies *Citrobacter diversus*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter koseri*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae* und *Enterobacter aerogenes* konnten in der qPCR als negativ bewertet werden. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigen, dass mit dem hier beschriebenen qPCR-Verfahrens verlässliche Ergebnisse zu erzielen sind und

*E. sakazakii* zuverlässig identifiziert werden kann. Vergleichbare Ergebnisse konnten auch in den Studien von SEO und BRACKETT (2005) ermittelt werden.

### **Typisierung von *E. sakazakii* mittels PFGE und RAPD**

Aufgrund der besonderen Aufgabe der Infektionsepidemiologie, Infektionsquellen und Übertragungswege pathogener Keime zu ermitteln, gewannen in den letzten Jahren weitere molekularbiologische Verfahren an Bedeutung wie z. B. die Ribotypisierung, die Randomly Amplified Polymorphic DNA Analysis, die DNA Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis, die Restriction Endonuclease Analysis, die Multilocus Enzyme Electrophoresis und die Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) (CLARK *et al.*, 1990; GRANT und KROLL, 1993; FARBER, 1996; NAZAROWEC-WHITE und FARBER, 1999). Mit der Makrorestriktionsanalyse steht nach dem Verdau der chromosomalen DNA und der anschließenden PFGE ein sensitives und spezifisches Verfahren zur Typisierung von Bakterienstämmen zur Verfügung. In der vorliegenden Arbeit wurde zur Verfolgung von Kontaminationswegen der *E. sakazakii*-Isolate die Makrorestriktionsanalyse nach dem Verdau der chromosomalen DNA mit dem Restriktionsenzym *Xba*I und eine Auftrennung der Fragmente mittels PFGE eingesetzt. Die PFGE ist eine hochdiskriminatorische, aber zeitintensive Methode zur epidemiologischen Typisierung von Infektionserregern, die RAPD-Methode ist eine Schnellmethode mit guter Reproduzierbarkeit und einer diskriminatorischen Stärke vergleichbar zur PFGE.

Mit der PFGE steht nach GROTHUES und TÜMMLER (1991) ein Verfahren zur Verfügung, mit dem Infektionsquellen und Übertragungswege von bakteriellen Erregern ermittelt und die Diversität von Bakterienpopulationen aufgeklärt werden können. Die PFGE als Methode der Wahl wird auch als sogenannten Goldstandard für die epidemiologische Typisierung von Mikroorganismen, die für eine Infektionskrankheit verantwortlich gemacht werden, bezeichnet (RÖMLING *et al.*, 1994, RÖMLING *et al.*, 1995). Einen umfassenden Überblick über die Methode der Makrorestriktionsanalyse und der PFGE gaben die Autoren RÖMLING *et al.* (1995). Dabei werden die zu untersuchenden Bakterienzellen in ein Agaroseblöckchen eingebettet. Damit ist das intakte Bakterienchromosom vor Scherbruch geschützt und kann anschließend mit Hilfe selten schneidender Restriktionsenzyme in Fragmente definierter Anzahl und Länge gespalten werden.

In den allgemein gültigen Richtlinien nach TENOVER *et al.* (1995) für den epidemiologischen Vergleich von PFGE-Fragmentmustern können Isolate, die sich in bis zu drei Bandenpositionen unterscheiden, aus einem einzigen genetischen Vorfall entstanden sein. Solche Isolate stellen möglicherweise epidemiologisch eng verwandte Subtypen desselben Stammes dar. Isolate, die in mehr als drei Positionen differieren, können ebenfalls miteinander verwandt sein, wobei die verwandtschaftlichen Beziehungen der entsprechenden Isolate jedoch nicht so eng sind (Tab. 38).

**Tabelle 38:** Kriterien zur Beurteilung von PFGE - Bandenmuster nach TENOVER *et al.* 1995

	Genetische Ereignisse (n)	Bandenunterschiede	Interpretation
Typ A	0	0	Identisch
Subtyp A	1	2-3	Teilidentisch
Eventuell verwandt	2	4-6	Wahrscheinlich Teilidentisch
Nicht verwandt	≥3	≥7	Nicht identisch

Der Restriktionsverdau der 67 *E. sakazakii*-Isolate in der vorliegenden Arbeit zeigte, dass eine deutliche Differenzierung sowie eine Feintypisierung mittels PFGE-Methode zwischen den Isolaten möglich ist. Mit dem in dieser Untersuchung durchgeführten PFGE-Protokoll konnten unter Verwendung des Restriktionsenzym *Xba*I reproduzierbare DNA-Fingerprintmuster von allen 67 Isolaten erstellt werden. Die Auswahl der Restriktionsendonuklease beruhte auf der Erkennungssequenz des Enzyms und auf dem bekannten 57%igen Anteil an Guanin und Cytosin (G+C) bei *E. sakazakii* (FARMER *et al.*, 1980). Das Restriktionsenzym *Xba*I erwies sich bereits in einer vergleichbaren Untersuchung als optimales Enzym zur Analyse der chromosomalen DNA von *E. sakazakii* (NAZAROWEC-WHITE und FARBER, 1999a). Die Autoren ermittelten bei 18 untersuchten *E. sakazakii*-Isolaten 18 unterschiedliche Restriktionsmuster mit einer Fragmentgröße von 40 bis 690 kb.

In der vorliegenden Arbeit konnte nach Auftrennung der Fragmente der 67 *E. sakazakii* Isolate durch die PFGE insgesamt 37 DNA-Restriktionsmuster (P1-P37) mit *Xba*I unterschieden werden. Zum Nachweis herkunftsbezogener Zusammenhänge der *E. sakazakii*-Isolate aus Europa und Übersee (A-I) konnten für den Herkunftsort E insgesamt elf Übereinstimmungen festgestellt werden. Die größte Vielfalt wurde mit siebzehn unterschiedlichen Restriktionsmustern bei 17 Isolaten aus einem Herkunftsort festgestellt.

Auf Grundlage dieser Ergebnisse ist die Reproduzierbarkeit der Methode als Voraussetzung für die epidemiologischen Aussagen gegeben. Das verwendete Restriktionsenzym *Xba*I ergibt mit 8 bis 18 Banden eine zur Differenzierung ausreichende Bandenanzahl, wie auch bei MASLOW *et al.* (1993) beschrieben. Die eingesetzte Methode ist im Vergleich zu anderen Standardprotokollen (FARBER, 1996; NAZAROWEC-WHITE und FARBER, 1999a) bereits in 4 Arbeitstagen durchzuführen und erwies sich als zuverlässig. Mittels PFGE kann die klonale Verbreitung von *E. sakazakii*-Isolaten aus Säuglingsfertiernahrung und dem Umfeld nachvollzogen werden.

Die RAPD-PCR (Randomly Amplified Polymorphic DNA) wird als Fingerprintmethode basierend auf Zufallsprimer als sehr effiziente und kostengünstige Methode zur Stammcharakterisierung bei gleichzeitig sehr guter Diskriminierung angesehen (WILLIAMS *et al.*, 1990). Die sehr kurzen Oligonukleotidprimer besitzen aufgrund der geringen Größe auf

beiden Strängen der DNS viele Bindungsstellen, die bei günstiger Primerkonstellation den dazwischen liegenden Abschnitt amplifizieren. Als Ergebnis dieser PCR entsteht ein Fragmentmuster, welches eine Unterscheidung verschiedener Stämme voneinander erlaubt. Diese Methode birgt allerdings Nachteile, da eine PCR mit nicht-spezifisch bindenden Primern durch viele Faktoren beeinflusst werden kann. Für eine gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse innerhalb eines Labors ist eine Standardisierung erforderlich (TYLER *et al.*, 1997).

Die in der vorliegenden Untersuchung erzielten Ergebnisse mit der RAPD repräsentieren ein zuverlässiges und reproduzierbares Verfahren für die Feintypisierung *intra speciem*. Mit den Primern „M13Core“ und „T3b“ ist es möglich, zwischen verschiedenen *E. sakazakii*-Stämme anhand der spezifischen Bandenmuster reproduzierbar zu unterscheiden.

Mit den Ergebnissen der eigenen Untersuchungen konnte ein weiterer Beitrag für eine effiziente und schnelle Identifizierung von *E. sakazakii* geliefert werden. Auf der Ebene der molekularen Typisierungsmethoden konnten bereits CLARK *et al.* (1990) und NAZAROWEC-WHITE und FARMER (1999a) mit Hilfe des Ribotyping, RAPD, Multilocus Enzyme Electrophoresis und PFGE ähnliche Ergebnisse erzielen. Bislang wurden von keiner anderen Arbeitsgruppe die gleichen Untersuchungen mit der RAPD in der Verbindung mit dem Primer „M13Core“ und „T3b“ für *E. sakazakii* verfolgt bzw. präsentiert. Eine kanadische Arbeitsgruppe setzte andere universelle Primer (UBC 245 5'-CGCGTGCCAG-3' und UBC 282 5'-GGGAAAGCAG-3') für die Identifizierung von *E. sakazakii* ein (NAZAROWEC-WHITE und FARMER, 1999a). Die Verwendung von zwei unterschiedlichen und voneinander unabhängigen Primern wird empfohlen, um die Diskriminierung zwischen den Isolaten zu verbessern (WAGNER *et al.*, 1996).

Zur Evaluierung von Typisierungsmethoden werden Kriterien wie Typisierbarkeit, Reproduzierbarkeit und Diskriminationsfähigkeit herangezogen. Die Charakteristika Typisierbarkeit und Reproduzierbarkeit können am einfachsten quantifiziert werden und werden oft prozentual ausgedrückt. Folglich ist die Typisierbarkeit der Prozentsatz an verschiedenen Stämmen, die durch ein klares und positives Resultat bestimmt sind, und die Reproduzierbarkeit gibt den Prozentsatz an Stämmen an, die bei wiederholter Testung dasselbe Resultat erbringen. Die Diskriminationsfähigkeit besteht in der Eigenschaft, nicht miteinander verwandte Stämme eindeutig zu differenzieren. HUNTER und GASTON (1988) verwendeten zur besseren Diskriminierung von Typisierungsmethoden den Diskriminierungsindex (*D*) basierend auf der Wahrscheinlichkeit, mit der zwei miteinander nicht verwandte Stämme dem gleichen Typ zugeschrieben werden. Diese Wahrscheinlichkeit basiert auf dem Simpson's-Index der Verschiedenheit, um die Diskriminationsstärke von Typisierungsmethoden zu bestimmen (SIMPSON, 1949).

Im Idealfall beträgt der Diskriminierungsindex  $>0,90$ , um Typisierungsmethoden mit einem statistisch sicheren Vertrauensbereich zu interpretieren (HUNTER und GASTON, 1988). In diesen Untersuchungen erwiesen sich die genotypischen Methoden als besser diskriminierend im Vergleich zu den phänotypischen Methoden. Die Diskriminierungsindices für die RAPD und PFGE lagen bei  $>0,90$  und erwiesen sich somit als die Typisierungsmethoden mit der höchsten Diskriminationsstärke zur Differenzierung von *Enterobacter sakazakii*, gefolgt von der Biotypisierung.

Das Ziel dieser Untersuchungen war eine Evaluierung der Fragmentmuster zweier verschiedener molekularer Typisierungsmethoden, die beide Vorzüge in Hinblick auf Stabilität und Typisierungsfähigkeit von *E. sakazakii*-Isolaten erbrachten. Es konnte gezeigt werden, dass RAPD wie auch PFGE als reproduzierbare Fingerprints von *E. sakazakii*-Isolaten genutzt werden können und dass bei allen Isolaten sowohl ein Unterschied im Bandenmuster wie auch in der Bandenintensität zu erkennen war. Die auf einer PCR basierende RAPD ist schnell und im Gegensatz zur PFGE ohne größeren Arbeitsaufwand durchzuführen, besitzt aber eine geringere Reproduzierbarkeit. Eine gute Korrelation konnte zwischen den erzielten Ergebnissen in der PFGE und RAPD-M13Core sowie zwischen RAPD-T3B und PFGE beobachtet werden. Dabei zeigten die PFGE und die RAPD eine ähnliche hohe diskriminatorische Stärke. Dem gegenüber eignet sich die Biotypisierung zur Differenzierung von Stämmen der gleichen Spezies aufgrund unstabiler Eigenschaften durch verschiedene technische Faktoren und Umweltfaktoren nicht für epidemiologische Studien und zur Verfolgung von Kontaminationswegen.

#### **4.3 Vergleich klassisch mikrobiologischer Methoden mit alternativen Verfahren zum Nachweis von *Enterobacter sakazakii***

Die Methoden für den Nachweis von *E. sakazakii* sind nach dem Prinzip einer qualitativen Diagnostik aufgebaut. Dies beinhaltet in der Regel eine vorausgehende Voranreicherung, die folgende Ausbringung der Kultur in/auf Selektivnährmedien/-böden und letztlich die biochemische Überprüfung der Kolonien. International wurde bis vor kurzer Zeit kein einheitliches Standardverfahren für den Nachweis von *E. sakazakii* verwendet (FDA, 2002; MUYTJENS *et al.*, 1988; NAZAROWEC-WHITE und FARBER, 1997b; KANDHAI, 2004b). Mittlerweile gibt es in Europa ein standardisiertes Verfahren der internationalen Organisation zur Standardisierung (ISO).

In den bisher bekannten klassischen Nachweisverfahren für *E. sakazakii* (FDA, 2002; MUYTJENS *et al.*, 1988; NAZAROWEC-WHITE und FARBER 1997a; KANDHAI *et al.*, 2004) dient die Gelbpigmentierung der Kolonien in erster Linie nach der Selektivanreicherung als Selektionsmerkmal zur weiteren Isolierung.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigen, dass die Intensität der Gelbfärbung aber von der Inkubationsdauer und vom Bakterienstamm abhängig ist. Durch diese schwankende Gelbintensität war eine eingeschränkte Sensitivität der herkömmlichen Methoden zu befürchten. Um dies zu umgehen, wurde in der vorliegenden Vergleichsuntersuchung eine Methode (CLF-Methode), die ein breiteres biochemisches Profil zur primären Selektion nutzt, eingesetzt und mit den klassischen Methoden (FDA-Methode und ISO/TS 22964) verglichen. Im Rahmen dieser Untersuchung wurden insgesamt 101 Milchpulverproben mikrobiologisch auf das Vorkommen von *E. sakazakii* untersucht. Die Gesamtanzahl der positiven Proben in der ISO-Methode war höher (n=12) im Vergleich zu der CLF- (n=8) und der FDA-Methode (n=10). Die erhoffte höhere Spezifität und Sensitivität konnte für die CLF-Methode nicht gezeigt werden. Die Gelbpigmentierung erwies sich als nicht geeignetes und ausreichendes sensitives Selektionskriterium sowohl in der FDA- als auch in der CLF-Methode. Die ISO-Methode hingegen erhöhte die Selektivität durch den Einsatz des mLST als Selektivanreicherung in Kombination mit einer erhöhten Temperatur von 44°C und einer Isolierung auf dem chromogenen Nährboden. Folglich erwies sich die ISO-Methode in dieser Vergleichsuntersuchung als beste Nachweismethode. Die Nutzung chromogener Nährmedien (z.B. ESIA) verbessert die Methode und verringert den Arbeitsaufwand signifikant. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde die mLST Methode als Grundlage zur Entwicklung einer Standard (ISO) Methode gewählt (ISO/TS 22964 IDF/RM 210).

#### **4.3.1 Nachweis von *Enterobacter sakazakii* in Poolproben nach dem Foster-Stichprobenplan**

Für Säuglingsanfangsnahrung sind mikrobiologische Standards und somit Grenzwerte für *Enterobacteriaceae* (Indikatorkeime), Salmonellen und *E. sakazakii* vorgesehen (VO/EG Nr. 2073/2005). Anhand dieser Werte soll eine Beurteilung der Produkte vorgenommen werden. Bei einer Überschreitung der vorgegebenen Werte für *E. sakazakii* ist dies ein unzureichendes Ergebnis und zieht somit einen Ausschluss des betroffenen Produktes vom Verkehr mit sich. Die *Enterobacteriaceae* hingegen werden als Indikatorkeime („Prozeßhygienekriterium“) betrachtet, und im positiven Fall wird auf Verbesserungen der Produktionshygiene abgezielt. Voraussetzung für eine aussagekräftige Beurteilung der qualitätsbestimmenden Merkmale eines Lebensmittels sind die in den Rechtsverordnungen festgelegten Stichprobenpläne (Stufenpläne) und Entscheidungskriterien zur Beurteilung. Die Untersuchung auf Salmonellen wird nach einem Zweiklassenplan durchgeführt, das heißt es werden zwei Klassen („akzeptabel“ und „nicht akzeptabel“) unterschieden. Werden aus einer oder mehreren Proben Salmonelle(n) nachgewiesen, ist das Ergebnis der untersuchten Charge nicht ausreichend.

Bezüglich der Salmonellen wird in Säuglingsanfangsnahrung eine „Nulltoleranz“ gefordert, welche aber keine absolute Fehlerfreiheit der gesamten Charge garantiert. Selbst wenn in einem Stichprobenkontingent keine Salmonellen nachgewiesen werden, können diese Keime durchaus in der Charge (Grundgesamtheit) vorkommen (RIEMELT *et al.*, 2003; HILDEBRANDT und BÖHMNER, 1996). Die Genauigkeit und die Sicherheit eines Stichprobenplanes hängen vom Stichprobenumfang ab.

Aufgrund der heterogenen Verteilung von *E. sakazakii* besteht bei diesem Keim die Möglichkeit, ähnlich wie bei den Salmonellen, ungleichmäßig verteilt in Nestern aufzutreten und sich so der Stichprobenentnahme zu entziehen. Zur verbesserten Kontrolle der Säuglingsnahrung und Sicherstellung ihrer Qualität wurde bereits erfolgreich der Stichprobenplan für *Salmonella* nach FOSTER (1971) eingesetzt, bei dem eine Abwesenheit von *Salmonella* in 25g in einem Umfang von 60 Proben ( $n=60 \times 25g$ ,  $c=0$ ) empfohlen wird. Ein auf einem Stichprobenplan basierendes Freigabeschema kann nie eine 100%ige Sicherheit (Nulltoleranz) garantieren. Der Foster-Plan akzeptiert ein Restrisiko in der Größenordnung von ca. 1 Salmonelle pro 27kg.

In konventionellen kultivierungsabhängigen Methoden werden Bakterien nur in Probenmengen von bis zu 100g nachgewiesen. Durch den Foster-Plan besteht die Möglichkeit, Bakterien in großen Probenmengen ( $60 \times 25g = 1500g$ ) nachzuweisen. Bisher gilt diese Methode nur für den Nachweis von *Salmonella*. In den vorliegenden Untersuchungen wurde dieses Stichproben-Schema auch für den Nachweis von *E. sakazakii* umgesetzt. Bei dieser Methode erfolgt die Voranreicherung einer Poolprobe (1500g) aus Säuglingsnahrung in gepuffertem Leitungswasser (BTW) in einem 15-Liter-Gefäß bei Raumtemperatur. Anschließend erfolgte nach einer Abnahme eines Aliquots von 1 Liter eine Inkubation bei 37°C. Die selektive Anreicherung erfolgt mit Lauryl Sulfate Tryptone Bouillon mit extra Salz und Vancomycin (mLST). Für die Isolation wurde aus der mLST-Bouillon auf TSA und chromogenen Nährmedien (ESIA, DFI) ausgestrichen. In diesen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass sich die Methode auch für den Nachweis von *E. sakazakii* eignet. Untersuchungen zum Nachweis von *E. sakazakii* in diesem Probenumfang wurden bisher nicht von anderen Arbeitsgruppen durchgeführt bzw. präsentiert.

*E. sakazakii* im Produktionsumfeld gehört mittlerweile zur Hausflora, führt jedoch in nur wenigen Fällen zu einer Kontamination der Produkte mit einem geringen Kontaminationslevel. Allerdings ist *E. sakazakii* aufgrund des ubiquitären Vorkommens in der Verarbeitungsumgebung schwieriger zu bekämpfen als *Salmonella*. Effektive Kontrollmaßnahmen für Salmonellen im Produktionsumfeld von Säuglingsmilchpulver herstellenden Betrieben sind bereits etabliert.

### 4.3.2 Ferrioxamin-abhängiger Nachweis

Das Ferrioxamin E ist ein Trihydroxamat-Siderophor, welches bei der Antibiotikaproduktion aus *Streptomyces pilosum* als Nebenprodukt anfällt und Eisen bindet. Obwohl viele Salmonellen kein Ferrioxamin E bilden, besitzen sie dennoch im Gegensatz zu *Escherichia coli*, *Shigella* spp. und der Proteus-Morganella-Gruppe ein Aufnahme- und Verwertungssystem für Ferrioxamin E. Seitdem Ferrioxamine als potenzielle Wachstumsfaktoren für die gängigen *Salmonella enterica*-Serotypen bekannt sind, werden diese als Supplement in den gängigen Anreicherungen und selektiven Nachweisen eingesetzt, um die Schnelligkeit und Sensitivität des Nachweises des Genus *Salmonella* in Lebensmitteln zu erhöhen (KINGSLEY *et al.*, 1995; REISSBRODT, 1994; PLESS und REISSBRODT, 1995).

Das Ferrioxamin E kann demnach als Supplement für Anreicherungsmedien wie gepuffertem Peptonwasser (BPW) zur Anreicherung, Aktivierung und Wiederbelebung von gestressten Bakterien als Verursacher von Lebensmittelvergiftungen verwendet werden. In verschiedenen Untersuchungen konnte Ferrioxamin E bereits erfolgreich zum verbesserten Nachweis und zu einer Reaktivierung geschädigter Salmonellen beitragen (KINGSLEY *et al.*, 1995; REISSBRODT, 1994; PLESS und REISSBRODT, 1995; REISSBRODT *et al.*, 2000). Entsprechend der Angaben der ISO-Normen (ISO/TS 22964) für *Enterobacter sakazakii* wurden in diesen Untersuchungen zur Überprüfung einer fördernden Wirkung durch Ferrioxamin E gepuffertes Peptonwasser (BPW) als Voranreicherungsmedium gewählt. Ein deutlich positiver Effekt wurde beim Nachweis von *E. sakazakii* mit Ferrioxamin E eher in einem natürlich kontaminierten Produkt ohne Hitzestress als mit Hitzestress festgestellt. Aufgrund einer natürlichen Kontamination der Säuglingsnahrung ist der Erreger höchstwahrscheinlich bereits im Produktionsprozess durch Trockenheit und Hitze subletal geschädigt. Das Ferrioxamin E wirkt demnach fördernd auf das Wachstum des Erregers durch Aufhebung des Eisenmangelzustands, der sehr wahrscheinlich durch den Produktionsprozess ausgelöst wird.

Bei der künstlichen Kontamination eines Milchprodukts mit einem Referenzstamm (*E. sakazakii* DSM 4485) konnte keine positive Wirkung durch einen Zusatz von Ferrioxamin E erzielt werden. Die Verwertung des Siderophores Ferrioxamin E wird offenbar im Wesentlichen eher durch eine produktionsbedingte subletale Schädigung des *E. sakazakii* als durch eine künstlich hervorgerufene Schädigung in Anspruch genommen.

### 4.3.3 Nachweis von *E. sakazakii* mit biochemischen Identifizierungssystemen

Für eine genauere Identifizierung von *E. sakazakii* stehen mehrere kommerzielle Verfahren, die zahlreiche biochemische Reaktionen beinhalten, zur Verfügung. Die Identifizierung von *E. sakazakii* erfolgte bereits in verschiedenen Untersuchungen mit diesen biochemischen Testsystemen (BIERING *et al.*, 1989; KANDHAI *et al.*, 2004b, MONROE und TIFT, 1979; MUYTJENS *et al.*, 1983; NAZAROWEC-WHITE und FARBER, 1999; SIMMONS *et al.*, 1989; WILLIS und ROBINSON, 1988).

IVERSEN und FORSYTH (2004e) identifizierten mit dem API 20E drei Stämme als *E. cloacae*, *Enterobacter amnigenus*, und *Enterobacter cloacae/gergoviae*, während diese mit dem API 32E als *E. sakazakii* identifiziert wurden. Die falsch negativen Ergebnisse im API 20E könnten auf die engen phänotypischen Ähnlichkeiten zwischen *E. sakazakii* und *E. cloacae* zurückzuführen sein. Bisweilen konnte festgestellt werden, dass es durchaus *E. sakazakii*-Stämme gibt, die Sorbitol verwerten können, aber nicht in der Lage sind, ein gelbes Pigment zu bilden (HEUVELINK *et al.*, 2001; GURTLER *et al.*, 2005). Die Ergebnisse von IVERSEN und FORSYTH (2004e) konnten in der vorliegenden Arbeit nicht nachvollzogen werden. Dennoch konnte im Vergleich zwischen den Identifizierungssystemen API 32E, API 20E und BBL Crystal diskrepante Ergebnisse gesehen werden. Alle zuvor mit einer spezifischen PCR nachgewiesenen Isolate konnten sowohl im API 32E als auch im API 20E zu 100% (n=19) erkannt werden, lediglich 68% (n=13) der Stämme wurden im BBL Crystal korrekt als *E. sakazakii* bestimmt. Die sechs falsch-negativen Stämme wurden im BBLCrystal als *Enterobacter cancerogenus* und *Pantoea agglomerans* identifiziert. Auch die falsch negativen Ergebnisse im BBL Crystal können auf die engen phänotypischen Ähnlichkeiten zwischen *E. sakazakii* und *Enterobacter cancerogenes* und *Pantoea agglomerans* zurückzuführen sein. Weiterhin spielt die unklare taxonomische Einordnung insbesondere bei *Enterobacter* und *Pantoea* eine einschlägige Rolle (JANDA und ABBOTT, 1998). Zur Verifizierung eines biochemischen und eines molekularbiologischen Bestätigungssystems für *E. sakazakii* wurden in diesen Untersuchungen 94 *E. sakazakii*- und 32 *Enterobacteriaceae*-Stämme eingesetzt. Setzt man das Identifizierungssystem API 32E als Standard, werden die als *E. sakazakii* identifizierten Stämme in den verwendeten spezifischen Nachweissystemen zu 100% erkannt. Es ist durchaus im Sinne eines Screeningsystems, dass eine möglichst hohe Zahl von *E. sakazakii* verdächtigen Stämmen erfasst wird. Verfahren zur Verifikation der Ergebnisse sind nötig, da die kommerziellen Identifizierungskits sich als nicht ausreichend erwiesen, um Diskrepanzen auszuräumen.

#### 4.3.4 Nachweis von *E. sakazakii* mittels FISH-Technologie

Durch den Einsatz der *in situ* Detektion von *E. sakazakii* mit einer fluoreszenzmarkierten Gensonde konnten von 102 Isolaten übereinstimmend 101 Isolate als *E. sakazakii* positiv bestätigt werden. Lediglich ein zuvor mit dem API 32E falsch-positiv als *E. sakazakii* identifiziertes Isolat konnte mit dem VIT-System als richtig-negativ erkannt werden. Mittels 16S rDNA-Sequenzierung konnte gezeigt werden, dass es sich bei dem Isolat (135) um einen Stamm handelt, der 99,2% Ähnlichkeit zu *Enterobacter asburiae* aufweist. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch LEHNER *et al.* (2006). In dessen Studien konnten 75 verdächtige *E. sakazakii*-Isolate und 23 *Enterobacteriaceae*-Isolate ohne falsch-positive Ergebnisse bestätigt werden.

Der Testkit VIT-*E. sakazakii* erwies sich als absolut zuverlässig und hebt sich durch seine Sensitivität von anderen Nachweissystemen ab. Der geringe Anteil falsch-positiver Befunde bei den vergleichend untersuchten Verfahren, die als Screeningsysteme eingesetzt werden, ist durchaus akzeptabel. Der VIT-*E. sakazakii* bietet eine Möglichkeit zur Abklärung fraglicher Befunde. Die vergleichenden Untersuchungen kultivierungsabhängiger Nachweismethoden mit dem VIT-*E. sakazakii* erwiesen sich unter anderem durch höchste Spezifität und außerordentliche Schnelligkeit als geeignetes Bestätigungsverfahren für die *E. sakazakii*-Analytik.

#### 4.4 Spezielle Eigenschaften

##### Thermophiles Wachstum

Das thermotolerante Wachstum von *E. sakazakii* war bereits Gegenstand verschiedener Studien. FARMER *et al.* (1980) konnten in ihren Untersuchungen für 100% der (57) *E. sakazakii*-Stämme ein Wachstum bei 25°C, 36°C und 45°C und für 87% (50) ein Wachstum bei 47°C nachweisen. Allerdings wies keiner der untersuchten Stämme bei 4°C und 50°C Wachstum auf. In diesen Untersuchungen konnten diese Ergebnisse teilweise bestätigt werden. Bei allen untersuchten Stämme (n=30) konnte ein Wachstum bei 30-42°C nachgewiesen werden, während ein Teil der Isolate (n=2) bei 44°C kein Wachstum aufzeigte. Bei einer Temperatur von 55°C war bei keinem in dieser Untersuchung einbezogenen Isolate ein Wachstum zu verzeichnen. Ein ähnliches Bild konnte ebenfalls bei niedrigeren Temperaturen beobachtet werden. IVERSEN *et al.* (2004b) beschrieben für einige *E. sakazakii*-Stämme ein Wachstum bei 5°C. Keines der in diesen Untersuchungen eingebundenen Isolate (n=9) war in der Lage, bei 4°C und 10°C ein signifikantes Wachstum aufzuzeigen.

### **Trockenresistenz**

Das Wachstum bei niedrigen Temperaturen ist aus Sicht einer Risikoabschätzung von Interesse. Die Gefahr einer inadäquaten Zubereitung und Handhabung von rekonstituierter Säuglingsmilchnahrung wird durch die Fähigkeit dieser Spezies, bei Kühlschranktemperaturen zu wachsen, weiter verstärkt. Eines der häufigsten falschen Zubereitungen und Handhabungen ist die verlängerte Lagerungszeit, welche die Vermehrung einer Einzelzelle bis zur Infektionsdosis wesentlich fördert, und dies nicht nur während der Lagerung bei Umgebungstemperaturen und erhöhten Temperaturen, sondern ebenfalls bei Kühlschranktemperaturen. Ebenfalls problematisch bezüglich der Risikoabschätzung ist die Eigenschaft des *E. sakazakii*, in trockenem Umfeld zu überleben und sich folglich über Milchpulver und Staub verbreitet. Besonders die Resistenz gegen osmotischen Stress und Trockenheit sichert Bakterien eine hohe Überlebensfähigkeit in der Umwelt (KEMPF und BREMER, 1998). Generell schützen sich Bakterien selbst gegen die Erhöhung der Osmolarität durch eine schnelle intrazelluläre Akkumulation von Ionen, beispielsweise Kalium. In dieser Langzeitstudie zur Trockenresistenz verschiedener *E. sakazakii*-Isolate in Säuglingsnahrung auf Trockenmilchbasis ( $a_w$ -Wert 0,2) bei 20°C konnte gezeigt werden, dass die Widerstandsfähigkeit gegenüber osmotischen Stressfaktoren bei den untersuchten *E. sakazakii*-Isolaten deutlich höher ist als bei den mitgeführten *Enterobacteriaceae*-Kontrollen. Aber auch die eingesetzten *E. sakazakii*-Isolate zeigen untereinander erhebliche Unterschiede in ihrer Widerstandsfähigkeit. Die Ergebnisse der Untersuchung über 61 Wochen mit einer Abnahme von  $10^7$  KBE pro g auf  $10^2$  KBE pro g zeigen eine ähnliche Tendenz wie bei BREEUWER *et al.* (2003), die von einer Reduktion von  $10^7$  auf  $10^5$  in 40 Tagen berichten. Besonders bemerkenswert ist hier der sehr lange Zeitraum, über den *E. sakazakii* unter trockenen Bedingungen lebensfähig bleibt. Diese hohe Resistenz gegen Trockenheit führt zu einer „Anreicherung“ im Produktionsumfeld von Milchpulver. Demzufolge kann sich *E. sakazakii* als ein Teil der Hausflora in allen Arten von Trockenproduktionen, wie Stärke und Milchpulver adaptieren. Durch den Produktionsstaub besteht somit die Möglichkeit, das Produktionsumfeld, die Rohstoffe und ebenfalls das Endprodukt mit diesem Bakterium zu kontaminieren.

### **Resistenz gegen osmotische Beanspruchung**

Ein weiteres Charakteristikum von *E. sakazakii* stellt sein Wachstumsverhalten in Anwesenheit von hohen Salzgehalten dar. Ein erhöhter Salzgehalt übt auf Mikroorganismen eine selektive Wirkung aus. In Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration können Salzgehalte konservieren, d. h. das Bakterienwachstum vollständig unterdrücken, oder selektiv wirken, indem nur das Wachstum bestimmter Spezies unterdrückt wird.

Bei Salzkonzentrationen von 1 bis 2% gedeihen die meisten Erreger von Lebensmittelinfektionen und -intoxikationen gut.

In vielen Methoden zum Nachweis von coliformen Keimen wird die Lauryl-Sulfat-Tryptose Bouillon (LST) als „semi-selektive“ Anreicherung genutzt (IDF, 1998; ISO, 1991). Für eine verbesserte und gesteigerte Selektivität gegenüber *E. sakazakii* wurde diese Selektiv-anreicherung durch die Erhöhung der Natriumchlorid (NaCl)-Konzentration von 29 g und dem Zusatz des Antibiotikum Vancomycin modifiziert (KHANDAI *et al.*, 2004b). Der Zusatz von NaCl basiert auf einer Arbeit von BREEUWER *et al.* (2003) in der gezeigt werden konnte, dass *E. sakazakii* eine höhere Toleranz gegenüber osmotischem Stress zeigte als andere *Enterobacteriaceae* wie *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* und *Citrobacter freundii*. Das Antibiotikum Vancomycin wurde zusätzlich zur Unterdrückung des Wachstums von grampositiver Begleitflora, wie *Bacillus* spp. und Lactobacillen eingesetzt (GIRAFFA und SISTO, 1997; MANIE *et al.*, 1998).

In der vorliegenden Arbeit wurden die Wachstumseigenschaften verschiedener Enterobakterien in der Selektiv-Anreicherungs-Bouillon mLST aus der ISO-Methode ISO/TS 22964 mit erhöhten Salzgehalten bei 37°C überprüft. Die mLST-Bouillon mit 3,4% (w/v) NaCl im Vergleich zu einer 5%igen (w/v) NaCl-Konzentration ausgehend von der original LST-Bouillon (0,5% w/v), verschafft *E. sakazakii* gegenüber anderen Koliformen einen Wachstumsvorteil. Alle in diesen Untersuchungen eingesetzten *E. sakazakii*-Stämme konnten bei NaCl-Konzentrationen von 4,0 % (w/v) detektiert werden. Lediglich das Wachstum eines *E. sakazakii*-Stammes (NCC 70) konnte ebenfalls in höheren NaCl-Konzentrationen von 4,5 und 5 % (w/v) nachgewiesen werden. Die mitgeführten *Enterobacteriaceae* - Kontrollen *Pantoea* spp., *Leclercia adecarboxylata* und *Citrobacter freundii* konnten bereits bei NaCl-Konzentrationen von 4,0 % (w/v) nicht mehr detektiert werden. Hingegen konnten *Klebsiella pneumoniae* sowie *Enterobacter cloacae* bei NaCl-Konzentrationen von 4,0 % (w/v) und letzterer ebenfalls bei 4,5% (w/v) detektiert werden. KANDHAI *et al.* (2004b) konnten in ihren Untersuchungen feststellen, dass alle untersuchten *E. sakazakii*-Stämme (n=15) in der Lage waren, bei einer Temperatur von 37°C und bei weitaus höheren NaCl-Konzentrationen von bis zu 1M in mLST zuwachsen. Diese Ergebnisse konnten in den hier vorliegenden Untersuchungen nicht bestätigt werden. Die mitgeführten *Enterobacteriaceae*-Spezies erwiesen sich - wie auch in diesen Untersuchungen - dem osmotischen Stress gegenüber als sehr labil und konnten zu 89% durch den hohen NaCl-Gehalt in mLST unterdrückt werden. Die restlichen 11% der Spezies *Escherichia hermannii*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella oxotoca* und *Klebsiella pneumoniae* besitzen keine  $\alpha$ -Glucosidase-Aktivität und sind somit auf den chromogenen Nährmedien von *E. sakazakii* unterscheidbar. Eine Kombination der Salzkonzentrationen mit einer erhöhten Inkubationstemperatur von 44°C erhöht die Selektivität für *E. sakazakii*.

### **Biofilmbildung durch *E. sakazakii***

Die Biofilmbildung in Lebensmittel herstellenden Betrieben ist von besonderer Bedeutung, da die Biofilme eine permanente Quelle für mikrobielle Kontaminationen sind und als Ursache für Lebensmittelkontaminationen und die Übertragung von Krankheiten gelten. In diesen Untersuchungen sollte das Potenzial von *E. sakazakii*-Isolaten verschiedener Herkunft zur Biofilmbildung und zur Adhärenz an hydrophoben und hydrophilen Oberflächen gezeigt werden.

Die bakterielle Zellulose spielt eine strukturelle Rolle und verleiht in einem natürlichen Habitat einen mechanischen, chemischen und biologischen Schutz oder erleichtert die für eine Infektion notwendige Zelladhärenz (ROSS *et al.*, 1991). Die Präsenz der Zellulose kann durch die Bindung von Calcofluor (CF) an 1,4 und 1,3  $\beta$ -Glukane und anschließender Fluoreszenz bei Bestrahlung mit UV-Licht der Wellenlänge  $\lambda=366$  nm bei den zu testenden Stämmen nachgewiesen werden. Calcofluor wurde gewählt, da zuvor erfolgreich in Untersuchungen sowohl mit *Salmonella Enteritidis* (SOLANO *et al.*, 2002) als auch mit *E. sakazakii* das Vorhandensein von Zellulose nachgewiesen werden konnte (ZOGAJ *et al.*, 2003). In der vorliegenden Arbeit konnte bei 90% (n=37) von 41 untersuchten *E. sakazakii*-Isolaten bei Temperaturen von 28°C und 37°C eine Präsenz der Zellulose nachgewiesen werden. Hingegen zeigten Untersuchungen von LEHNER *et al.* (2006), dass bei nur 14% von 56 untersuchten *E. sakazakii* Isolaten eine Präsenz der Zellulose bei beiden Temperaturen nachzuweisen war. Der Grund für die abweichenden Ergebnisse könnte in der unterschiedlichen Herkunft der Isolate liegen.

Einen Hinweis auf eine Produktion der extrazellulären Matrixkomponente Curli-Fimbrien gibt der Farbstoff Kongorot (CR) (RÖMLING *et al.* 1998a). In den vorliegenden Untersuchungen konnte bei 18 (46%) bei 28°C und sieben (18%) bei 37°C von insgesamt 39 *E. sakazakii* Isolate die Fähigkeit, CR zu absorbieren, nachgewiesen werden. Insgesamt waren sieben Isolate in der Lage, bei beiden Temperaturen CR zu absorbieren.

Folglich ist die Expression von Zellulose und Curli-Fimbrien komplex und muss - bezogen auf die Mikronische des Bakteriums - eingehend in weiteren Studien untersucht werden. Die Fähigkeit von *E. sakazakii*, Zellulose und Curli-Fimbrien zu produzieren, könnte eine ähnlich wie bei den Spezies mit Biofilm bezogenen Infektionen eine signifikante Rolle spielen (ZOGAJ *et al.*, 2003). Die Unterschiede in den Ergebnissen lassen auf eine Ursprungsheterologie der Isolate deuten. Weitergehende Untersuchungen sind hier notwendig.

Ein Anstieg der mikrobiologischen Kolonisation steht mit steigender Unebenheit der Oberfläche im Zusammenhang. Ebenfalls adhäreren Mikroorganismen eher an hydrophoben Oberflächen wie Teflon und Plastik als an hydrophilem Material wie Glas und Metall (FLETCHER & LOEB, 1979; PRINGLE und FLETCHER, 1983; CHARACKLIS *et al.*, 1990;

BENDINGER *et al.*, 1993). LEHNER *et al.* (2005) untersuchten 56 *E. sakazakii*-Isolate und konnten, vergleichbar mit der vorangegangenen Hypothese, bei 42,8% der Isolate eine Adhärenz an Glas und bei 58,9% der Isolate eine Adhärenz an Polystyrol-Mikrotiterplatten-Wells nachweisen. In diesen Untersuchungen konnten diese Ergebnisse, mit einer 82%igen Adhärenz an Glas und einer 17%igen Adhärenz an Polystyrol-Mikrotiterplatten-Wells nicht bestätigt werden. Die hier eingesetzten Isolate stammten vorrangig aus dem Produktionsumfeld. Die Autoren konnten bei ihren Untersuchungen ebenfalls bei 20 (36%) der untersuchten Isolate in Luria-Bertani Bouillon und bei 44 (79%) der untersuchten Isolate in Brain-Heart-Infusion Bouillon eine Pellikelbildung nachweisen. In den vorliegenden Untersuchungen konnte in modifizierter Lauryl-Sulfat-Bouillon bei 22 (54%) der untersuchten Isolate eine Pellikelbildung beobachtet werden. Diese Unterschiede in der Häufigkeit der Pellikelbildung könnten an der unterschiedlichen Herkunft der Stämme liegen. Des Weiteren könnte es durch die unterschiedliche Zusammensetzung der eingesetzten Nährmedien zu unterschiedlicher Expression der Pellikelbildung kommen, sodass ein direkter Vergleich mit den hier verwendeten Medien nicht durchführbar ist.

FARMER *et al.*, (1980) beschrieben im Weiteren eine Sedimentbildung, bestehend aus Zellaggregaten, in Trypton Soya Bouillon (TSB) bei allen 57 untersuchten *E. sakazakii*-Stämmen. Vergleichbare Ergebnisse sind in der vorliegenden Untersuchung mit einer Aggregatbildung in TSB für 29 (70%) der untersuchten *E. sakazakii*-Isolate zu verzeichnen.

#### **4.5 *Enterobacter sakazakii* im Umfeld**

Die gängigen Pasteurisierungsverfahren während des Herstellungsprozesses von Trockenmilchnahrung überleben *Salmonella* und *E. sakazakii* nicht. Jedoch kann es bei der Handhabung und Abfüllung zu einer Rekontamination des Säuglingsnahrungspulvers kommen. Aufgrund des ubiquitären Vorkommens von *E. sakazakii* dürfte der Keim in der Verarbeitungsumgebung schwieriger zu bekämpfen sein als *Salmonella*. Folglich sind mikrobiologische Umgebungskontrollen im Verarbeitungsbereich zur Überwachung der Wirksamkeit der Hygienemaßnahmen notwendig (EFSA, 2004). In den vorliegenden Untersuchungen wurde zur Kontrolle des Produktionsumfelds eines Betriebs eine Probennahme aus den kritischen Zonen, dem Sprühturm und der Abfüllanlage, durchgeführt. In diesen Zonen wurden Proben von Böden, Abflüssen, Staubsaugern und Schuhsohlen entnommen. Bei den Tupferproben von einer Fläche bis zu 25 cm<sup>2</sup> waren alle 25 getesteten Flächen *E. sakazakii* - negativ. Mit zunehmender Probennahmefläche konnte eine Zunahme der *E. sakazakii* - positiven Ergebnisse mit 5,6% (100 cm<sup>2</sup>) und 25,4% (1 m<sup>2</sup>) verzeichnet werden.

Zur Untersuchung der 1 m<sup>2</sup>-Fläche kam ein steriles Tuch, die sogenannte SodiBox, zur Anwendung und wurde mit steigendem Nachweis von *E. sakazakii* als geeignet befunden. Die Untersuchungen von anfallenden Pulverabfällen in Staubsaugern waren in 37% positiv, und ebenso waren 25% der Tupferproben von Schuhsohlen positiv für *E. sakazakii*. Alle untersuchten Luftproben im Produktionsraum waren negativ. Das ubiquitäre Vorkommen von *E. sakazakii* im Produktionsumfeld konnten mit diesen Ergebnissen bestätigt werden. Auf Grundlage dieser Ergebnisse kann geschlossen werden, dass durch das Vorhandensein von *E. sakazakii* im Produktionsumfeld eine Kontamination der Produkte aus der Umgebung der Produktionslinien sehr wahrscheinlich ist. Eine primäre Ursache für die Kontamination von Säuglingsnahrung kann in der Anlieferung und Verarbeitung von natürlichen Rohstoffen gesehen werden. Folglich kann der Eintrag des Kontaminanten in den gesamten Verarbeitungsprozess über Rohstoffe erfolgen.

### **Identifizierung kritischer Rohstoffe**

Eine kleine Anzahl an *Enterobacteriaceae* ist üblicherweise immer in Rohmilch, Getreide, Mehl und anderen Rohstoffen enthalten (JAY, 1991; SHAPTON und SHAPTON, 1993). Durch einen Erhitzungsschritt können diese aber eliminiert werden. Eine Anwesenheit in hitzebehandelten Produkten lassen eine Rekontamination oder sonstige Prozessprobleme vermuten. Rohstoffe wie Getreide und Mehl müssen bei hohen Kontaminationsleveln auf *Enterobacteriaceae* kontrolliert werden.

Die Zutaten in Trockenmischungsprozessen repräsentieren eine potenzielle Kontaminationsquelle für Säuglingsnahrung auf Trockenmilchpulverbasis. Rohstoffe die keinem weiteren Inaktivierungsschritt nach Zugabe unterliegen, müssen die gleichen mikrobiologischen Kriterien wie das Endprodukt erfüllen. Seitdem für all diese Zutaten ein Erhitzungsschritt während des Produktionsprozesses empfohlen wird, ist die Präsenz der *Enterobacteriaceae* einschließlich *E. sakazakii* auf eine Rekontamination während weiterer Prozessschritte und beim Umgang auf Lieferantenebene zurückzuführen (FAO/WHO, 2006).

Berichten der FAO/WHO (2004) zufolge sind einige Zutaten wahrscheinlich häufiger kontaminiert als andere, wobei die Stärke als der häufigste mit *E. sakazakii* kontaminierte Rohstoff eingestuft wurde.

In den vorliegenden Untersuchungen konnten die Verdickungsmittel Stärke (4-37%) und Johannisbrotkernmehl (15%), die Mono- und Diglyceride (66%) und der als Quellstoff eingesetzte Reisfilm (50%) und die Sojafaser (8%) aufgrund ihrer Kontaminationshäufigkeit mit *E. sakazakii* als kritische Rohstoffe eingestuft werden.

Folglich ist die Akzeptanz der Zutaten auf Grundlage einer einfachen Untersuchung nicht sinnvoll, um die Qualität zu sichern. Für die Hersteller von Säuglingsnahrung ist es wichtig, eng mit den Rohstofflieferanten zusammenzuarbeiten, um die gewünschten Spezifikationen

zu kommunizieren und um spezielle Wünsche zur Sicherstellung der Qualität zu äußern und zu gewährleisten. Um die Anwesenheit von *E. sakazakii* in der Verarbeitungsumgebung auf ein Mindestmaß zu verringern, müssen strenge Hygienemaßnahmen einschließlich der Zutrittskontrolle des Personals, der Trennung von Nass- und Trockenverfahren, sowie der Vermeidung der Kondensation und des Eindringens von Wasser in Trockenbereiche gewährleistet werden (EFSA, 2004a).

#### **4.6 *Enterobacteriaceae* und *Enterobacter sakazakii* als Marker mikrobiologischer Qualität von Säuglingsnahrung**

Mikrobiologische Kriterien werden nur in Bereichen etabliert, in denen dieses notwendig oder sich als effektiv und praktisch erweist (MOSSEL, 1995). Die Notwendigkeit ist gegeben, wenn von speziellen Organismen eine Gesundheitsgefährdung in speziellen Lebensmitteln ausgeht oder wenn Umweltkeimen, den sogenannten Markerorganismen, eine sichere Funktion zugesprochen werden kann. Aufgrund der Umständlichkeit, auf alle pathogenen Keime zu untersuchen wurde in der Lebensmittelmikrobiologie die Nutzung der Indikatorkeime eingeführt (DRION und MOSSEL, 1972; MOSSEL, 1982).

*Enterobacteriaceae* im Umfeld werden als Hygieneindikatoren verwendet und sollen ein Abbild über die Produktionsstätte vermitteln. Weiterhin geben sie Aufschluss über Veränderungen und Abweichungen in der hygienischen Produktionsweise. Eine stärkere Kontrolle und Bekämpfung sollte vorwiegend auf *Enterobacteriaceae* und coliforme Keime und nicht auf *E. sakazakii* ausgerichtet sein (BfR, 2003). Nach der Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 der Europäischen Union wird als Maßnahme im Fall unbefriedigender Ergebnisse eine Verbesserung in der Herstellungshygiene zur Minimierung der Kontamination vorgeschrieben. In dem Fall, dass in einer Probeneinheit *Enterobacteriaceae* nachgewiesen werden, ist die Partie auf *E. sakazakii* und *Salmonella* zu untersuchen.

Zur Ermittlung des *status quo* der Belastung von Säuglingsanfangsnahrung mit *Enterobacteriaceae* und *E. sakazakii* wurden in diesen Untersuchungen insgesamt 269 Proben Säuglingsanfangsnahrung auf Trockenmilchpulverbasis aus zwei Betrieben untersucht und weiterhin das Verhältnis zwischen *E. sakazakii* und *Enterobacteriaceae* näher betrachtet. Der ermittelte Epsilon-Faktor (MOSSEL & STRUIJK, 1995), der das Verhältnis von Kolonie bildenden Einheiten (KbE) des Indikators *Enterobacteriaceae* zu den KbEs des pathogenen Erregers *E. sakazakii* beschreibt, liegt für Betrieb 1 bei 1,3 KbE : 0,5 KbE pro 100g und für Betrieb 2 bei 2,1 KbE : 0,6 KbE pro 100g. Das Epsilon-Faktor-Konzept dient als Entscheidungsgrundlage, um eine direkte Testung auf *E. sakazakii* zu verfolgen oder einzustellen.

Dieses Konzept stößt in diesem Fall aber an seine Grenzen, da das Verhältnis für die *Enterobacteriaceae* wesentlich höher sein muss als für *E. sakazakii*. Nur dann kann ein numerischer Wert ermittelt werden unterhalb dessen die Kontamination mit dem korrelierenden Pathogenen (hier *E. sakazakii*) sicher ausgeschlossen werden kann.

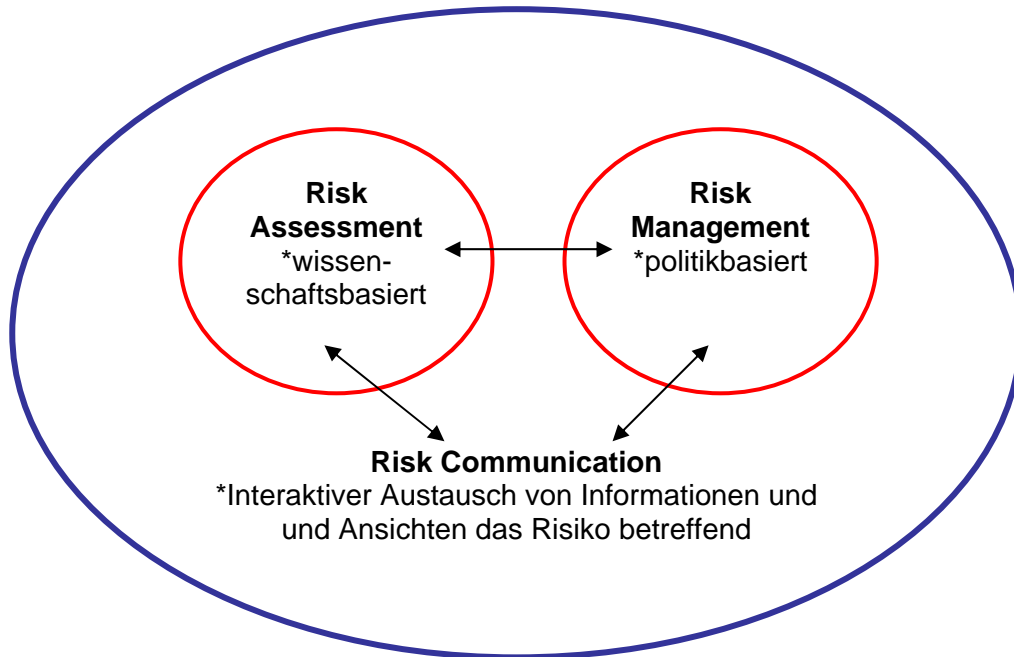
Weitergehend wurde für den *E. sakazakii*-Nachweis das Verhältnis zwischen *E. sakazakii*-Methode und *Enterobacteriaceae*-Methode näher betrachtet. Für Betrieb 1 konnte ähnlich wie für Betrieb 2 für den *E. sakazakii*-Nachweis ein Verhältnis von *Enterobacteriaceae*-positiven zu *E. sakazakii*-positiven von 100% : 25% bzw. 100% : 11% ermittelt werden. Die *Enterobacteriaceae*-Methode spiegelt somit die vorliegende *E. sakazakii*-Situation nicht wieder, denn nur 11-25% der in der *Enterobacteriaceae*-Methode positiv erkannten Proben sind auch tatsächlich in der *E. sakazakii*-Methode positiv. Eine gesicherte Aussage über *E. sakazakii* kann durch die *Enterobacteriaceae*-Methode und demnach mit den *Enterobacteriaceae* als Hygieneindikator nicht erbracht werden, da nur ein Viertel bzw. ein Neuntel der Proben tatsächlich mit *E. sakazakii* kontaminiert war.

Bei einem Vergleich des Keimspektrums und der Identifizierung mittels API 32E konnten mit der *Enterobacteriaceae*-Methode 75% von den in der *E. sakazakii*-Methode identifizierten *E. sakazakii*-Stämme ebenfalls detektiert und identifiziert werden.

#### **4.7 Risikoanalyse von *Enterobacter sakazakii* in Säuglingsnahrung**

Der Prozess einer Risikobewertung besteht nach dem CODEX ALIMENTARIUS (2007) aus der Risikoabschätzung (Risk Assessment), dem Risikomanagement (Risk Management) und der Risikovermittlung (Risk Communication) (Abb. 43).

Eine Risikoanalyse für das Vorkommen von *Enterobacter sakazakii* in Säuglingsnahrung im Sinne des CODEX ALIMENTARIUS (2007) ist nach den in der Literatur beschriebenen Daten und auf der Grundlage der in dieser Arbeit erhobenen Daten nicht möglich, da die vorhandenen Daten zur Quantifizierung des Risikos nicht ausreichend sind. Für dieses Verfahren sind eine Vielzahl an Daten und hinreichende statistische Auswertungen erforderlich. Die fehlenden Daten wurden in der Risikoanalyse der FAO/WHO (2006) durch hypothetische Daten ersetzt. Dessen ungeachtet sollen hier zur Verdeutlichung der Vorgehensweise einer Risikoanalyse die grundlegenden Faktoren nach dem Codex Alimentarius-Richtlinie ihre Anwendung finden.



**Abbildung 43:** Zusammenhang der Komponenten einer Risikoanalyse (FAO/WHO, 1995)

### Risk Assessment

Das Risk Assessment basiert auf einem vierstufigen Prozess mit (1) Identifizierung der Gefahren (Hazard Identification), (2) Charakterisierung der Gefahr (Hazard Characterization), (3) Bestimmung/Berechnung der möglichen Belastung des Konsumenten (Exposure Assessment) und (4) Charakterisierung des Risikos (Risk Characterization).

Definitionsgemäß wird als 'Hazard' ein biologisches, chemisches oder physikalisches Agens bezeichnet, welches gesundheitsgefährdend ist und in bestimmten Lebensmittel vorkommt (CODEX ALIMENTARIUS, 2007). Neugeborene und Säuglinge (<28 Tage) unter medizinischer Behandlung, vor allem Frühgeburten mit geringem Geburtsgewicht (<2500g), stellen die höchste Risikogruppe für eine *E. sakazaki* - Infektion dar (LAI, 2001; FAO/WHO, 2004; GURTLER *et al.*, 2005). *Enterobacter sakazakii* ist als Kontaminant von Säuglingsnahrung und folglich als Infektionserreger und Verursacher von nosokomialen Infektionen wie der nekrotisierenden Enteritis, Meningitis und Septikämien bei Frühgeborenen und immungeschwächten Säuglingen bekannt (LAI, 2001, NAZAROWEC-WHITE und FARBER, 1997c). In dieser Arbeit wurden zur Definition der Risikogruppe keine Erkenntnisse ermittelt. Ferner ist es wichtig zu erwähnen, dass neben Säuglingsnahrung auf Trockenmilchbasis in der Literatur ebenfalls andere Quellen für eine potenzielle Ursache für *E. sakazakii* - Infektionen bei Säuglingen beschrieben werden. Jedoch wurde zu diesen Infektionsquellen kein epidemiologischer Zusammenhang hergestellt (FAO/WHO, 2006).

Beispielsweise wurde in einem Fall ein Frühgeborenes mit einer *E. sakazakii* - Infektion nur gestillt und zusätzlich mit steriler Milchfertiernahrung gefüttert (STOLL *et al.*, 2004). In einem anderen Fall wurde Stärke zur sterilen Milchfertiernahrung zugefügt (FDA, 2004), und in einem weiteren Fall wurde ein 14 Tage alter Säugling nur gestillt und starb aufgrund der Resistenz des *E. sakazakii* gegenüber Ampicillin und Ceftazidime an der Infektion (BARREIRA *et al.*, 2003). Neueste Untersuchungen haben gezeigt, dass *E. sakazakii* sehr gut in Muttermilch wächst (LENATI *et al.*, 2005).

Die FAO/WHO (2006) definierte drei Komponenten als Gefahr bezüglich *E. sakazakii*, die sich

- auf die Höhe der Initialkeimzahl bei der Zubereitung der Nahrung,
- auf den Konsum an Säuglingsnahrung (bezogen auf eine Million Säuglinge pro Tag) und
- auf die Kontamination mit *E. sakazakii* durch Präparation, Lagerung und Verfütterungspraktiken, beziehen.

Folglich können diese definierten Gefahren nur über die minimale Infektionsdosis charakterisiert werden. Zur minimalen infektiösen Dosis gibt es bisher keine gesicherten epidemiologischen Studien (LEHNER und STEPHAN, 2004). Die Dosis-Wirkungs-Beziehung kann wie im Falle anderer Mikroorganismen je nach Merkmalen und physiologischem Zustand des Keims, des Wirts sowie der Lebensmittelmatrix schwanken. Gesicherte Daten bezüglich der Infektionsdosis wurden in dieser Arbeit nicht ermittelt. Für die Bestimmung der wahrscheinlichen Aufnahmemenge von *E. sakazakii* über Säuglingsnahrung können die bekannten Inzidenz-Daten genutzt werden. MUYTJENS *et al.* (1988) konnten zeigen, dass in 14% der untersuchten Proben hinsichtlich der mikrobiologischen Kriterien der Wert von 1 KbE/g nicht überschritten wurde. NAZAROWEC-WHITE und FARBER (1997c) konnten in 6,6% der Säuglingsnahrungen *E. sakazakii* in einer Keimzahl bis zu 0,36 KbE/100g nachweisen. Auch die FDA (2003) wiesen in ihren Untersuchungen in 22,7% der Säuglingsnahrungen *E. sakazakii* mit Keimzahlen von 0,36 KbE/100g nach. In diesen Untersuchungen waren 3% der Säuglingsnahrungen mit *E. sakazakii* kontaminiert und enthielten 0,3-0,92 KbE/100g bei einer getesteten Probenmenge von 333g. Auch aufgrund der geringen Keimzahl kann die absehbare Vermehrungsrate von *E. sakazakii* in der fertig zubereiteten Säuglingsnahrung durch eine inadäquate Handhabung auf die minimale Infektionsdosis ansteigen. Die wahrscheinliche Aufnahmemenge ist zum Zeitpunkt des Verzehrs abhängig vom Level der Kontamination der Säuglingsnahrung und vor allem von den Konditionen, unter denen das Zubereiten und die Lagerung der rekonstituierten Milchnahrung stattfinden. Ein wesentliches Problem stellen bakterielle Biofilme ebenfalls in Lebensmittelverarbeitungsanlagen und in Babyfläschchen dar. Eine Manifestierung auf verschiedenen Oberflächen wie Silikon, Latex, Polycarbonat-Fläschchen und Edelstahl konnten bereits IVERSEN *et al.* (2004b) in ihren Untersuchungen nachweisen.

Auch in den vorliegenden Untersuchungen konnte eine Tendenz verschiedener *E. sakazakii*-Stämme zur Adhärenz an Glas und Polystyrol gesehen werden. Dies lässt den Schluss zu, dass die Biofilmbildung beispielsweise in Babyfläschchen aus Glas oder Polystyrol bei der Definition potenzieller Kontaminationsquellen in Erwägung gezogen werden muss. Für gesicherte Aussagen sind weitere Untersuchungen notwendig. Die Kontamination des Milchpulvers wird sich während der Lagerung nur geringfügig ändern, da in diesen Untersuchungen gezeigt werden konnte, dass sich *E. sakazakii* aufgrund der im Milchpulver geringen Wasseraktivität und der niedrigen Lagerungstemperaturen zwar nicht vermehrt, aber auch über einen längeren Zeitraum von bis zu 20 Monaten überleben kann. Zudem konnte in diesen Untersuchungen eine hohe osmotische Toleranz gegenüber 4%igen NaCl-Konzentrationen nachgewiesen werden. Weiterhin konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass *E. sakazakii*-Stämme bei Temperaturen von 4°C-10°C kein signifikantes Wachstum aufweisen. Dagegen wurden thermophil Eigenschaften, die *E. sakazakii* befähigen, Temperaturen von 48°C zu überleben, beobachtet. All diese Eigenschaften verschaffen dem Keim Selektionsvorteile und führen dazu, dass er viele Produktionsprozesse übersteht. Einer Eliminierung ist demnach gezielt nachzugehen. Zur Charakterisierung des Risikos muss eine Abschätzung erfolgen, mit welcher Häufigkeit und Schwere gesundheitsgefährdende Effekte vor allem bei den betroffenen Gruppen auftreten können. Im Verlaufe der letzten 40 Jahre konnten bis zu 40 Erkrankungsausbrüche mit 60 bis 80 betroffenen Säuglingen registriert werden (Kap. 2.3.2, Tab. 2).

### **Risk Management**

Unter Berücksichtigung der Ergebnisse des Risk Assessments werden im Risk Management verschiedene Vorgehensweisen abgewogen und bei Notwendigkeit auch Überwachungsmöglichkeiten und regulatorische Maßnahmen ausgewählt und durchgeführt. Der erste Schritt im Risikomanagement eines Lebensmittelsicherheitsproblems ist die sorgfältige Ausarbeitung eines Risikoprofils. Ein Risikoprofil muss dem Risikomanager soviel wie möglich an Informationen zukommen lassen, damit dieser Kontrollstrategien entwickeln und entsprechende Maßnahmen einleiten kann.

Mit der Erstellung eines Risikoprofils wird der Versuch unternommen, eine Einordnung von *E. sakazakii* in Säuglingsmilchpulver als Krankheitserreger entsprechend dem potenziellen Risiko für den Menschen zu ermöglichen. So hat der Risikomanager ein Maß für die Dringlichkeit, ein Risiko für den Verbraucher zu minimieren. Das Risikoprofil ist für das Risikomanagement ein wichtiges Werkzeug, nicht nur um die zu ergreifenden Maßnahmen nach Dringlichkeit einzuordnen, sondern auch um Maßnahmen hoher Effizienz an kritischen Punkten des Herstellungs-, Distributions- und Zubereitungsprozesses treffen zu können. Die Kontamination von Säuglingsmilchpulver mit *E. sakazakii* entsteht vorwiegend im

Herstellungsprozess. Technologisch sind sporadische und geringe Kontaminationen derzeit nicht vermeidbar. Auch Umgangsempfehlungen für Säuglingsnahrung sind bei nicht ausreichender Sensibilisierung der Bevölkerung kein wirksamer Ansatz zum Schutz des Verbrauchers. In Fällen, in denen eine inadäquate Handhabung des Produktes deutlich zur Steigerung des Risikos beitragen kann, empfehlen die Risikobewerter den Risikomanagern, den Gehalt pathogener Keime in einem Lebensmittel so weit zu minimieren, wie dies „vernünftigerweise“ möglich ist. Dieser Ansatz wird als ALARA-Prinzip (as low as reasonably achievable) bezeichnet, bei dem die Abwägung von ökonomischem Aufwand und vertretbarem Risiko die Grundlage ist. Grundsätzlich sollten Risikobewerter den Risikomanagern zur Anwendung des ALARA-Prinzips raten. Der Gehalt an *E. sakazakii* in Säuglingsnahrung soll danach so weit verringert werden, wie dies mit vertretbarem (technologischen) Aufwand möglich ist. Neben dem ALARA-Prinzip werden als weitere Risikomanagement-Strategien Optionen zur besseren Kontrolle der Gefahr bis auf „einen akzeptablen Schutzlevel“ evaluiert und verglichen. ALOP (Appropriate Level of Protection) ist das Ausmaß des Risikos, das eine Gesellschaft willens ist zu akzeptieren mit der Prämisse der Minimierungsmaxime.

Im Risikomanagement nach IVERSEN und FORSYTHE (2003) sind fünf prinzipielle Vorsorgemaßnahmen zur Überwachung von *E. sakazakii* in Säuglingsnahrung während des Herstellungsprozesses notwendig.

**(1) Kontrolle von minimalen Kontaminationsleveln der Rohstoffe in den einzelnen Rezepturen.** Die FAO/WHO (2004) führt Stärke als den meist kontaminierten Rohstoff auf und demzufolge ist dieser aufgrund des vermehrten Einsatzes bei der Herstellung von Säuglingsnahrung als kritisch einzustufen. Bei einem Screening der eingesetzten Rohstoffe zur Herstellung von Säuglingsnahrung sind in den vorliegenden Untersuchungen vor allem Stärke und Johannesbrotkernmehl, die Mono- und Diglyceride und als Quellstoff eingesetzter Reisfilm und Sojafaser aufgrund ihrer Kontaminationshäufigkeit mit *E. sakazakii* auffällig geworden und können folglich als kritische Rohstoffe betrachtet werden. Die Stärke stellt häufig bei der Herstellung von Pulvernahrung ein Problem dar, da die Zugabe in der Regel erst nach dem Erhitzungsverfahren erfolgen kann. Eine Kategorisierung der Rohstoffe ist im Rahmen eines HACCP (Hazard Critical Control Point) - Konzepts möglich, indem die Rohstoffe nach hohem und niedrigem Risiko eingeschätzt werden. Demnach bestände ein erhöhtes Risiko bei Produkten mit hohem Stärke-, Johannesbrotkernmehl-, Reismehl- und Sojafasergehalt. Eine intensivere Kontrolle der Rohstoffe und Vorgaben zur Qualität vom Hersteller an den Rohstofflieferanten könnte das Risiko, den Erreger in den Verarbeitungsprozess und somit in das Endprodukt einzutragen, wesentlich eindämmen.

Weiterhin erwies sich die ISO-Methode (ISO/TS 22964) zum Nachweis von gestresstem *E. sakazakii* in den verschiedenen Rohstoffen als geeignet.

**(2) Reduzierung der Level während der Hitzebehandlung von Rohmilch und ähnlichen Produkten.** Unter dem Aspekt einer möglichst geringen Nährstoffreduzierung wird für die Herstellung von Säuglingsnahrungsmitteln vorzugsweise kurzzeiterhitzte Milch (Low-heat Pulver) verwendet. Durch Sprüh- und Walzentrocknung wird flüssigen Ausgangsprodukten das Wasser entzogen und auf diese Weise werden beispielsweise Milchpulvererzeugnisse haltbar gemacht. Ein verbleibender Restwassergehalt von 2,5-5 % ist für das Wachstum von Mikroorganismen nicht ausreichend. In der Sprühtrocknungsanlage wird Luft im Temperaturbereich von 150-250°C eingesetzt. Da der größte Teil der Energie zur Verdampfung des Wassers benötigt wird, wird die Milch selbst nur auf 70-80°C erwärmt. Demzufolge ist eine vollkommene Keimabtötung nicht gewährleistet (RIEMELT *et al.*, 2003). Während eine Pasteurisation durchaus ausreichend ist, um pathogene Keime abzutöten, liegen Berichte vor, dass *E. sakazakii* resistenter gegenüber Hitzestress ist als andere *Enterobacteriaceae* (BREEUWER *et al.*, 2003; NAZAROWEC-WHITE und FARBER, 1997a). Weitere Daten zur Hitzebehandlung von Rohmilch und anderen Produkten konnten in der vorliegenden Arbeit nicht ermittelt werden. Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Kontaminationen mit *E. sakazakii* auf der Ebene der Zwischenprodukte („Basepowder“) weitaus geringer sind als im späteren Endprodukt. Die Basepowder sind in den Rohstoffuntersuchungen nicht auffällig geworden. Die durchlaufenen Hitzebehandlungen sind also sehr effektiv gegenüber *E. sakazakii*. Das Kontaminationsrisiko ergibt sich aus Kontaminationen durch trocken zugemischte Rohstoffe und aus dem Produktionsumfeld während des Misch- und Abpackungsprozesses.

**(3) Eine Erhöhung des Kontaminationslevels ist durch Verhinderung von Kontaminationen im Vorverarbeitungsprozess zu vermeiden.** Die Anwesenheit von *E. sakazakii* in der Verarbeitungsumgebung kann durch strenge Hygienemaßnahmen, einschließlich der Zutrittskontrolle des Personals, der Trennung von Nass- und Trockenverfahren sowie der Vermeidung der Kondensation und des Eindringens von Wasser in Trockenbereiche auf ein Mindestmaß verringert werden (EFSA, 2004). Einen Überblick über die Kontaminationen mit *E. sakazakii* im Produktionsumfeld geben die in den vorliegenden Untersuchungen ermittelten Daten. Durch das Umfeldmonitoring in den kritischen Zonen, dem Sprühturm und der Abfüllanlage, konnte gezeigt werden, dass die getestete Produktionsluft den Keim nicht enthält. Bei den Untersuchungen der Bodenflächen konnte mit Vergrößerung der getesteten Fläche zunehmend eher eine Kontamination mit *E. sakazakii* (25,4%) nachgewiesen werden.

Weiterhin wurde bei Überprüfung des Staubsaugerinhalt (37%) als auch der Schuhsohlen (25%) einzelner Mitarbeiter immer wieder eine Kontamination mit *E. sakazakii* nachgewiesen. Eine erfolgreiche Reduzierung dieses Erregers im Produktionsumfeld kann nur durch eine Minimierung der Kontamination in der kritischen Zone, welche sich in der unmittelbaren Nähe der Produktionslinie befindet, erfolgen. Dieses bedarf aber ähnlich wie bei den Salmonellen einer Guten Hygiene Praxis (GHP), welche hauptsächlich auf einer Segregation der Produktionsbereiche basiert. Die kritische Zone muss durch bauliche Maßnahmen, Hygiene-Schleusen für Personal und Equipment und Luftfilteranlagen deutlich von dem Rest der Produktionsstätte abgegrenzt werden (FAO/WHO, 2006).

**(4) Anwendung mikrobiologischer Kriterien.** Nach der Gesetzgebung der Europäischen Union in der Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 vom 15. November 2005 über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel darf *E. sakazakii* in getrockneter Säuglingsanfangsnahrung in 10 g ( $n=30$ ,  $c=0$ ,  $m/M= \text{neg./10g}$ ) nicht nachweisbar sein. MUYTJENS *et al.* (1988) haben in 53% der untersuchten Säuglingsnahrungen *Enterobacteriaceae* und in 14% *E. sakazakii* nachgewiesen. NAZAROWEC-WHITE und FARBER (1997c) konnten in 6,6% der untersuchten Proben *E. sakazakii* in einer Keimzahl bis zu 0,36 KbE/100g nachweisen. In den vorliegenden Untersuchungen lag die Kontaminationsrate in Trockenmilchpulver für *Enterobacteriaceae* bei 16,7 % und für *E. sakazakii* bei 2,97 %, die Höhe der Belastung bei 0,3-21 KbE/100g (*Enterobacteriaceae*) bzw. bei 0,3-0,92 KbE/100g (*E. sakazakii*) Milchpulver. Aufgrund der Daten in der Literatur und der in dieser Arbeit ermittelten Daten ist die Anzahl kontaminierter Proben und der Kontaminationslevel für *E. sakazakii* sehr niedrig, überschreiten aber die strengen Anforderungen der Europäischen Union für *E. sakazakii*. Das Verhältnis positiver Proben von *Enterobacteriaceae* zu *E. sakazakii* konnte in diesen Untersuchungen für zwei Betriebe mit 5,6:1 (Betrieb 1 mit 4,1 zu 1 und Betrieb 2 mit 2,9 zu 1) ermittelt werden. Eine Kontrolle von *E. sakazakii* ist durch die *Enterobacteriaceae* als Hygieneindikator alleine nicht möglich, da die Verhältnisse zu verschieden sind.

**(5) Bereitstellung angemessener Informationen und Zubereitungsanleitungen.** Die Säuglingsnahrung, auch als Anfangsmilch bezeichnet, ist zur Verabreichung an Säuglinge, Neugeborene und sogar Frühgeborene im Alter von 0-6 Monate(n) vorgesehen. Seitens des Herstellers werden hohe Anforderungen an die Produktion und Überwachung des Produktes gestellt. Weiterhin ist es erforderlich die Rekonstituierung der Trockenmilch unter einwandfreien hygienischen Bedingungen durchzuführen, um eine Rekontamination zu vermeiden. Eine Vermehrung Koliformer Keime, zu denen auch *E. sakazakii* gehört, kann durch eine einwandfreie Handhabung und Lagerung der gefertigten Nahrung verhindert werden. Aufgrund der sehr kurzen Generationszeiten (40 min) bei Raumtemperatur

(NAZAROWEC-WHITE und FARBER, 1997b) führt eine ungekühlte Lagerung rekonstituierter Säuglingsmilch zu einer schnellen Vermehrung möglicherweise vorhandener Keime. Entsprechend sind Empfehlungen auf den Verpackungen deutlich sichtbar anzubringen. Die FDA gab bereits im Jahre 2002, aber auch die Deutsche Gesellschaft für Kinder- und Jugendmedizin (DGKJ, 2006) zur Infektionsvorbeugung Hinweise zur Zubereitung und Handhabung von Säuglingsnahrungen an. Angaben auf der Verpackung, wie „Säuglingsnahrung in Pulverform immer frisch herstellen, abgekochtes Wasser verwenden, angerührte Nahrung sofort auf Trinktemperatur abkühlen und verfüttern und Nahrungsreste nicht wieder verwenden“, sind unerlässlich um vorbeugend eine Infektion mit *E. sakazakii* zu umgehen. Über die Berücksichtigung der o. g. Gesichtspunkte hinaus sollte für in Kliniken betreute Neu- und Frühgeborene und vor allem für die bevorzugte Verwendung von sterilen, trinkfertig portionierten Flüssignahrungen erwogen werden.

### **Risk Communication**

Die Risikovermittlung beinhaltet einen interaktiven Austausch von Informationen und Meinungen zum Risiko und zum Risikomanagement zwischen Risikobewerter, Risikomanager, Verbraucher und weitere Personenkreise.

Die Hersteller von Säuglingsnahrung sind sehr sensibilisiert und das Risikobewusstsein ist meistens gut ausgeprägt. Insbesondere werden von den Herstellern vor allem bei Rohstoffen in den Spezifikationen Grenzwerte für *E. sakazakii* angegeben. Aufgrund der ubiquitären Verbreitung des *E. sakazakii* und der Tatsache, dass es sich bei der Säuglingsmilchnahrung nicht um ein steriles Produkt handelt, wird es sehr schwierig sein, das Vorkommen von *E. sakazakii* vollkommen zu vermeiden. Deshalb ist es erforderlich, auch die Konsumenten und die Krankenhäuser zu sensibilisieren und zu schulen.

Diese Arbeit kann primär nur einen Beitrag zur Risikobewertung und Risikomanagement im Sinne des CODEX ALIMENTARIUS (2007) liefern. Weiterhin kann eine Risikoeinschätzung vorgenommen werden, um auf mögliche Risiken hinzuweisen, die jedoch nicht eindeutig quantifizierbar sind. Hier liegt ein Risiko vor, da der pathogene Erreger *E. sakazakii* sowohl in Rohstoffen zur Verarbeitung von Säuglingsnahrung als auch in der für den Endverbraucher bestimmten Säuglingsnahrung auf Trockenmilchpulverbasis vorkommt. Ferner ist eine Vermehrung von *E. sakazakii* bis zu einer Größenordnung wahrscheinlich, die als Infektionsdosis ausreicht. Weiterhin muss mit einer Falschbehandlung der Produkte im Haushalt gerechnet werden sowie damit, dass Risikogruppen, z. B. Neugeborene (< 28 Tage), Frühgeborene, Säuglinge mit geringem Geburtsgewicht und immungeschwächte Säuglinge zum Konsumentenkreis zählen.

Durch das im Rahmen dieser Arbeit erstellte Risikoprofil für die Matrix/Erreger-Kombination Milchpulver/*E. sakazakii* konnten folgende Datenlücken geschlossen werden:

- Kontaminationsquellen (z. B. Rohstoffe)
- Umfeldkontrollen und Umfeldpräsenz
- Spezifische Nachweissysteme
- Persistenz im Produkt und im Umfeld
- Studien zur Wachstumskinetik

Folgende Datenlücken konnten identifiziert bzw. nicht geschlossen werden:

- Angaben zur minimalen Infektionsdosis (MID)
- Erkenntnisse zu den Virulenzfaktoren
- Regionale und ethnische Unterschiede beim Vorkommen von *E. sakazakii* Infektionen assoziiert mit Säuglingsnahrung
- Daten zur Prädisposition
- Daten zur weltweiten Verbreitung von *E. sakazakii* - Infektionen

Für eine vollständige Risikoabschätzung von *E. sakazakii* in Säuglingsnahrung auf Trockenmilchpulverbasis sind weitere Forschungsaktivitäten bezüglich der genannten Datenlücken unumgänglich.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Bakterielle Infektionen durch *Enterobacter (E.) sakazakii* bei Säuglingen, die durch Verunreinigungen in Säuglingsmilchpulvernahrung verursacht wurden, sind seltene jedoch gravierende Erkrankungen mit potenziell tödlichem Ausgang. Neben den Salmonellen ist dieser der einzige Keim, bei dem ein Kausalzusammenhang zwischen der Erkrankung von Säuglingen und der Kontamination von Säuglingsmilchpulvernahrung nachgewiesen werden konnte. Entsprechend der durch die CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION vorgegebenen Grundelemente des Risikoprofils wurde in diesen Untersuchungen die Matrix/Erreger-Kombination von „*E. sakazakii* in Säuglingsnahrung“ eingehend mit Hilfe von bereits vorhandenen Literaturdaten untersucht. Dabei lag der Fokus der Arbeit auf Elementen des Risikoprofils, die eine Eliminierung oder Minimierung der Gefährdung bereits im Produktionsprozess zum Ziel haben. Außerdem wurde der Evaluierung der Methoden zur Qualitätskontrolle besondere Beachtung geschenkt.

Das Ziel dieses Risikoprofils liegt in der Bereitstellung von Hintergrundinformationen, basierend auf dem aktuellen Wissensstand der Literatur und eigenen Untersuchungen. Die Ergebnisse der hier vorgenommenen Erhebung lassen sich wie folgt zusammenfassen: Infektionen mit *E. sakazakii* werden häufig durch die Kontamination von Säuglingsmilchpulver verursacht und führen zu Septikämien, nekrotisierenden Enterocolitiden und vor allem zu Meningitiden. Hierbei sind stets Neu- (< 28 Tage) und insbesondere Frühgeborene und immungeschwächte Säuglinge betroffen. Weltweit konnten bisher bis zu 40 Erkrankungsausbrüche mit 60 bis 80 betroffenen Säuglingen registriert werden. Ungefähr ein Drittel dieser Erkrankungen konnte mit Säuglingsnahrung assoziiert werden.

Der Großteil dieser Infektionen ist jedoch auf Kontaminationen durch das Produktionsumfeld sowie auf einzelne Rohstoffe zurückzuführen. Einige Schlüsseleigenschaften des Keims sind nach wie vor ungeklärt, wie z. B. die Virulenzfaktoren. Andere Eigenschaften wie Trockenresistenz und Biofilmbildung konnten durch eigene Untersuchungen charakterisiert werden. Als problematisch erwies sich insbesondere die hohe Trockenresistenz des Bakteriums, da diese Rekontaminationen des Endprodukts aus dem Produktionsumfeld bedingen. Dazu wurden detaillierte Untersuchungen zum Vorkommen von *E. sakazakii* im Produktionsumfeld und Rohstoffen durchgeführt. Die Untersuchungen zur Trockenresistenz haben gezeigt, dass sich die Keimzahl in mit *E. sakazakii* versetztem Milchpulver nach Trocknung und Lagerung in 14 Wochen um nur drei Zehnerpotenzen verringerte und auch noch nach 61 Wochen zu detektieren war. Die Beseitigung einer *E. sakazakii*-Kontamination wird durch diese

besondere Widerstandsfähigkeit des Keimes erschwert. Ein fortgesetzter Eintrag des Bakteriums über pflanzliche Rohstoffe konnte durch die Identifizierung kritischer Rohstoffe als zweite Kontaminationsquelle, neben der Präsenz des Bakteriums im Produktionsumfeld, festgestellt werden.

Bezüglich der Strategien der Gefahrenkontrolle wurden einerseits Methoden der Qualitätskontrolle eingehend untersucht und außerdem Versuche zu Wachstumskinetiken vor dem Hintergrund der aktuellen Zubereitungs- und Anwendungsempfehlungen durchgeführt. Die Einhaltung der empfohlenen Richtlinien für die Zubereitung, Handhabung, Lagerung und Anwendung von Säuglingsanfangsnahrungen kann das Risiko nahezu eliminieren. Dennoch wird für besonders gefährdete Säuglinge, Neu- (< 28 Tage) und Frühgeborene und immungeschwächte Säuglinge angeregt, nur handelsübliche sterile Flüssignahrung zu verabreichen.

Die Qualitätskontrollmaßnahmen sind ein wichtiges Element des Risikomanagements. Ihre Effektivität ist in besonderem Maße von der Leistungsfähigkeit der angewandten Methoden abhängig. Darum wurden verschiedene kultivierungsabhängige, biochemische und molekularbiologische Methoden getestet. Als besonders effektiv erwiesen sich die chromogenen Nährmedien sowie die spezifischen PCR-Nachweissysteme, während sich die kultivierungsabhängige Detektion durch Gelbfärbung der Kolonien und die Überprüfung des biochemischen Leistungsspektrums als ungenügend erwiesen. Mit den erarbeiteten molekularbiologischen Methoden lässt sich eine sichere Identifizierung innerhalb kürzester Zeit (3 Tage) gewährleisten. Die Methoden sind für den Routinebetrieb einer industriellen Produktion standardisierbar und auch unter diesen Bedingungen von hoher Reproduzierbarkeit.

Eine schnelle, sensitive und spezifische Methode zur Detektion und Identifikation dieses opportunistischen Erregers ist für die Lokalisierung der Infektionsquelle von Bedeutung. An die Identifizierung schlossen sich Typisierungsverfahren zur weitergehenden Charakterisierung von *E. sakazakii*-Isolaten unterschiedlicher Herkunft (Rohstoffe, Umfeld, Endprodukte) an. Aufgrund von phänotypischen Eigenschaften und durch die spezifische PCR konnten fast alle Isolate der Spezies *E. sakazakii* zugeordnet werden. Eine abschließende molekulare Charakterisierung erfolgte für eine Auswahl an *E. sakazakii*-Isolaten durch die Makrorestriktion der chromosomalen DNA und anschließender Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE), um die Kontaminationsquellen und Kontaminationswege zu identifizieren und um die Eignung der Methoden zur Rückverfolgung von Kontaminationen zu prüfen. Dabei konnten 37 Restriktionsmuster (P1-P37) unterschieden werden. Hinsichtlich der Restriktionsmuster in der PFGE wiesen die Isolate aus dem gleichen Herkunftsort

überwiegend jeweils ein einheitliches Restriktionsmuster auf. In mehreren Fällen waren jedoch bereits deutliche Unterschiede im Restriktionsmuster selbst für Isolate aus einem Herkunftsort festzustellen. Die größte genotypische Vielfalt wurde mit siebzehn unterschiedlichen Restriktionsmustern aus einem Herkunftsort festgestellt. Dies deutet darauf hin, dass die Kontaminationsquellen von Säuglingsnahrung mit *E. sakazakii* sehr vielfältig und damit wahrscheinlich nicht einer einzigen Quelle zuzuordnen sind. Eine weitere molekulare Charakterisierung der Isolate war durch die Randomly Amplified Polymorphic DNA Methode (RAPD) möglich. Die Ergebnisse der RAPD zeigten ähnliche Muster von verwandten Isolaten wie die PFGE, dabei zeigten beide Methoden eine ähnliche hohe diskriminatorische Stärke auf.

Für eine ausreichende Sicherung des Gesundheitsschutzes des Verbrauchers und die Gewährleistung der Produktqualität konnte die Evaluierung des Risikos für das Vorkommen von *E. sakazakii* in Säuglingsnahrung anhand der ermittelten Daten und der Literaturangaben erfolgen. Folglich bestätigt dies die Festlegung des Grenzwertes von 0 KbE/30x10 g durch die Europäische Union (VO/EG Nr. 2073/2005), nachdem in 30 Proben zu je 10 g Trockenmilchnahrung kein *E. sakazakii* nachweisbar sein darf. Als Ergebnis dieser Arbeit ist festzustellen, dass zur Kontrolle dieses Grenzwertes ein breites Spektrum kultivierungsabhängiger und molekularbiologischer Methoden vorliegt.

Dennoch besteht vor dem Hintergrund der ergriffenen Produktionshygienemaßnahmen durch die Produzenten bei der Säuglingsnahrung auf Milchpulverbasis ein mikrobiologisches Restrisiko, da es sich hier nicht um ein steriles, sondern um ein keimarmes Produkt handelt. Sofern aber das Säuglingsmilchpulver hygienisch einwandfrei zubereitet und mit diesem auch hygienisch umgegangen wird, ist das Risiko einer *E. sakazakii*-Infektion bei Säuglingen nahezu ausgeschlossen. Zur Infektionsvorbeugung sind Hinweise zur Zubereitung, Handhabung und Lagerung von Säuglingsnahrungen im Sinne einer Guten-Hygiene-Praxis immer zu berücksichtigen. Angaben auf der Verpackung, wie „Säuglingsnahrung in Pulverform immer frisch herstellen, abgekochtes Wasser verwenden, angerührte Nahrung sofort auf Trinktemperatur abkühlen und verfüttern und Nahrungsreste nicht wieder verwenden“, sind unerlässlich, um einer Infektion mit *E. sakazakii* vorzubeugen. Eine Vermehrung von *E. sakazakii* in Säuglingsnahrung nach einer inadäquaten Handhabung (z. B. Herstellung auf Vorrat, Lagerung zubereiteter Säuglingsnahrung) durch den Verbraucher muss als eines der Hauptrisiken gelten. Eine Sensibilisierung der Verbraucher und des Klinikpersonals ist notwendig, um darauf aufmerksam zu machen, dass es sich bei der Säuglingsnahrung nicht um ein steriles, sondern um ein keimarmes Produkt handelt.

## 6 SUMMARY

### ***Enterobacter sakazakii* - Risk profile and investigations of the pathogen detection in infant food**

*Enterobacter (E.) sakazakii* is a rare cause of invasive infection with high death rates in neonates. The fatal infection is associated with the presence of the organism in commercial powdered formula fed to the infant. Contamination of powdered infant formula with *E. sakazakii* and with Salmonella has been proved as the cause of infection in infants, sometimes with serious sequel of death. This thesis investigated the food/hazard combination of *E. sakazakii* in infant milk formula in accordance with the basic elements of a risk profile given by the CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. It focused on the risk factors and how they could be eliminated or minimised already in the process of production.

The risk profile aims to summarise the recent knowledge based on literature data and own investigations. The evaluation results can be summarised as follows: Infections with *E. sakazakii* are often caused by the contamination of infant milk formula and lead to septicaemias, necrotizing enterocolitis and meningitis. The most vulnerable group are newborn (<28 days), particularly preterm and immunocompromised infants. Up to 40 outbreaks with 60 to 80 affected infants could be registered worldwide. About one third of these illnesses could be associated with baby food.

There are two main routes by which *E. sakazakii* can enter reconstituted infant formula: a) *through intrinsic contamination* - either through contaminated ingredients added after drying or from the processing environment after drying and before packing or b) *through external contamination* of the formula during reconstitution and handling e.g. through poorly cleaned utensils. In addition, pathogen properties contribute to its infectious accessibility. Although, some of the *E. sakazakii* key properties such as the virulence factors are still unclear, others like resistance to drying stress and biofilm formation are well defined by own investigations. The later might be implicated in the recontamination of the end product.

A long term study on the dry resistance has shown that the initial amount of *E. sakazakii* in dry infant formula has dropped within 14 weeks only by 3 logs and has been still detectable after 61 weeks. This higher resistance against dryness makes it more difficult to control the problems of contaminations with *E. sakazakii*. A continuous entry of the bacterium by raw materials has been seen by the identification of critical raw materials as the second contamination source beside the presence of the bacterium in the production environment.

With regard to the hazard strategies, the quality control methods were investigated. Additionally, the study of growth kinetics of *E. sakazakii* in infant formula was carried out to assess the recommended guidelines for the preparation, use, storage and application of starter formula which can nearly eliminate the risk. However, for high-risk infants like neonates (<28 days) particularly preterm and immunocompromised it is recommended to use sterile ready to use formula only.

The quality control measures are important elements in the risk management. Their effectiveness depends on the quality of methods being used. Thus, conventional, biochemical and molecular methods were performed for the sake of comparison. While, the chromogenic media and the specific PCR methods were defined as highly effective methods, the conventional method with a selection procedure based on yellow pigmentation and biochemical reactions was found unreliable. A safe and fast (3 days) detection should be guaranteed by the developed molecular methods. The methods should be used as standardised methods with a high reproducibility in the industrial routine lab.

A quick, sensitive and specific method for the detection and identification of this opportunistic infant pathogenic bacterium is very important for the localisation of the infection. Both identification and typing methods for the characterisation of *E. sakazakii* isolates of different sources (raw material, environment, and end product) were investigated. All investigated isolates were identified as *E. sakazakii* by using phenotypical characteristics and specific PCR methods.

Furthermore, *E. sakazakii* isolates were investigated by macrorestriction analysis of their chromosomal DNA followed by pulse field gelelectrophoresis (PFGE) to identify the source and the way of contamination and prove this method to trace back the contamination route. The restriction patterns obtained by pulsed-field gel electrophoresis displayed identical or almost identical patterns for the cultures of various sources. In addition, a total of 37 distinct patterns (P1-P37) were observed. With reference to the restriction patterns obtained by pulsed field gel electrophoresis, identical patterns for strains of the same source were realised. Nevertheless, in several cases clear differences were distinguished in the restriction pattern for isolates from the same source. The largest genotypical variety was detected for seventeen different restriction patterns from the same source. This implies that the sources of contamination with *E. sakazakii* in infant food are very various and it is of high probability that the contaminations are to be assigned to not only one source. Further molecular characterisations of the isolates were possible by the Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD). The results of the RAPD revealed similar patterns as in the PFGE for related isolates. Both methods showed a similar high discriminatory power.

An evaluation of *E. sakazakii* contamination risk in infant milk powder based on literature data and own investigations confirms the safety limit of absence of *E. sakazakii* in 30x10g set by the European directive (VO/EG No. 2073/2005). Upon the investigation results, the availability of a wide range of conventional microbiological and molecular methods can be effectively used and are reliable.

Nevertheless, powdered infant milk formula is in terms of the manufacturer hygiene measures not a sterile product but is at risk of being contaminated. Concerning the preparation and handling of the infant milk formula under good hygiene conditions, there should be no risk for infants to get an infection with *E. sakazakii*. To prevent infections, general information about the use and storage of powdered infant formula has to be taken into consideration of a good hygiene practice. There is a general need for the labelling of the product with “prepare reconstituted formula freshly, cooling before reconstituted formula is fed. Remnants of feed should be discarded and not used as part of the following feed”. A risk increase caused by mishandling of the reconstituted formula by the consumer can not be excluded. The fact that powdered infant formula is not a sterile product requires more attention of the user in domestic and hospital environment for the right way of preparation and use of infant milk formula. Over and above, risk management strategies have to be developed in order to address the presence of *E. sakazakii* in this product.

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

**ADAMSON, D.H. UND ROGERS, J.R. (1981).** *Enterobacter sakazakii* meningitis with sepsis. *Clin. Microbiol. Newsl.*, **3**, 19-20.

**AES LABORATORIES (2005).**  
<http://www.aeschemunex.com/Pages/Food.html#chromogenicmedia>

**ALDOVÁ, E., HAUSNER, O. UND POSTUPA, R. (1983).** Tween-esterase activity in *Enterobacter sakazakii*. *Zbl. Bakt. Hyg.*, **A256**, 103-108.

**AMANN, R. I., BINDER, B. J., OLSON, R. J., CHISHOLM, S. W., DEVEREUX, R. UND STAHL, D. A. (1990).** Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl Environ Microbiol.*, **56**, 1919-925.

**AMANN, R. I., LUDWIG, W. UND SCHLEIFER, K. H. (1995).** Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev.*, **59** (1), 143-169.

**ARSENI, A., MALAMOU-LADAS, E., KOUTSIA, C., XANTHOU, M., TRIKKA, E., (1987).** Outbreak of colonization of neonates with *Enterobacter sakazakii*. *J. Hosp. Infect.*, **9**, 143– 150.

**BABALOLA, O. O., OSIR, E. O. UND SANNI, A. I. (2002).** Characterization of potential ethylene-producing rhizosphere bacteria of *Striga*-infested maize and sorghum. *African Journal of Biotechnology*, **1** (2), 67-69.

**BAR-OZ, B., PREMINGER, A., PELEG, O., BLOCK, C. AND ARAD, I. (2001).** *Enterobacter sakazakii* infection in the newborn. *Acta Paediatr.*, **90**, 356-358.

**BARRA CARACCILO, A., GRENNI, P., CUPO, C. UND ROSSETTI, S. (2005).** *In situ* analysis of native microbial communities in complex samples with high particulate loads. *FEMS Microbiology Letters*, **253**, 55–58.

**BARREIRA, E. R., COSTA DE SOUZA, D., DE FREITAS GOIS, P. UND FERNANDES, J. C. (2003).** Meningite por *Enterobacter sakazakii* eem recém-nascido: relato de caso. *Pediatria*, **25**, 65-70.

**BAUDART, J., OLAIZOLA, A. COALLIER, J., GAUTHIER, V. UND LAURENT, P. (2005).** Assessment of a new technique combining a viability test, whole-cell hybridization and laser scanning cytometry for the direct counting of viable *Enterobacteriaceae* cells in drinking water. *FEMS Microbiol Lett.*, **243** (2), 405-409.

- BAUMGART, J. (1993).** Mikrobiologische Untersuchung von Lebensmitteln. 3. Aufl. Hamburg, Behr's Verlag.
- BENDINGER, B., RIJNAARTS, H. H. M., ALTENDORF, K. UND ZEHNDER, A. J. B. 1993.** Physicochemical cell-surface and adhesive properties of coryneform bacteria related to the presence and chain-length of mycolic acids. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 3973–3977.
- BENTER, T., PAPADOPOULOS, S., PAPE, M., MANNS, M. UND POLIWADA, H. (1995).** Optimization and reproducibility of random amplified DNA in human. *Anal. Biochem.*, **230**, 92-100.
- BfR (2003).** Bundesinstitut für Risikobewertung. Sachverständigenrat "Enterobacter sakazakii in Säuglingsnahrung auf Trockenmilchbasis. 21. Januar 2003. Persönliche Mitteilung.
- BIERING, G., KARLSSON, S., CLARK, N.V. C., JONSDOTTIR, K. E., LUDVIGSSON, P. UND STEINGRIMSSON, O. (1989).** Three cases of neonatal meningitis caused by *Enterobacter sakazakii* in powdered milk. *J Clin Microbiol.*, **27** (9), 2054-2056
- BLOCK, C., PELEG, O., MINSTER, N., BAR-OZ, B., SIMHON, A., ARAD, I., UND SHAPIRO, M. (2002).** Cluster of neonatal infections in Jerusalem due to unusual biochemical variant of *Enterobacter sakazakii*. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, **21**(8), 613-616.
- BLUM, V., ANDRISKE, M., KREUZBERG, K., PAASSEN, U., SCHREIBMAN, M. P. UND VOESTE, D. (1998).** Novel laboratory approaches to multi-purpose aquatic bioregenerative closed-loop food production systems. *Acta Astronaut.*, **42**, 25 – 35.
- BOUKHALFA H. UND CRUMBLISS A. L. (2002).** Chemical aspects of siderophore mediated iron transport. *BioMetals* **15**, 325–339.
- BRADSHAW, J.G., PEELER, J.T., CORWIN, J.J., BARNETT, J.E., TWEDT R.M. (1987).** Thermal resistance of disease associated *S. typhimurium* in milk. *J. Food Protection*, **50**, 95-96.
- BREEUWER, P., LARDEAU, A., PETERZ, M., UND JOOSTEN, H.M. (2003).** Desiccation and heat tolerance of *Enterobacter sakazakii*. *Journal of Applied Microbiology*, **95**, 967-973.
- BRENNER, D. J. (1974).** DNA reassociation for the clinical differentiation of enteric bacteria. *Public Helth Lab.* **32**, 118-130.

- BRENNER, D. J., FARMER, J.J., HICKMAN, F. W., ASBURY, M. A., STEIGERWALT, A. G. (1977).** Taxonomic and Nomenclature Changes in Enterobacteriaceae. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA.
- BROSIUS, J., DULL, T. L., SLEETER, D. D., NOLLER, H. F. (1981).** Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*. *J. Molec. Biol.*, **148**, 107-127.
- BUCHANAN, R. (2003).** Resistance – Thermal and Other. Presentation to the United States Food and Drug Administration Food Advisory Committee, 18-19 March 2003. [http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/03/slides/3939s1\\_Buchanan\\_files/frame.htm](http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/03/slides/3939s1_Buchanan_files/frame.htm); Stand 2. November 2004.
- BURDETTE, J.H., UND SANTOS, C. (2000).** *Enterobacter sakazakii* brain abscess in the neonate: the importance of neuroradiologic imaging. *Pediatr. Radiol.*, **30**, 33– 34.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, CDC (2002).** *E. sakazakii* Infections Associated with use of Powdered Infant Formulas - Tennessee, 2001 (Morbidity and Mortality Weekly Report; April 12, 2002).
- CHARACKLIS, W. G. UND MARSHALL, K. C. (1990).** Biofilms - a basic for an interdisciplinary approach. In: W. G. Characklis and K. C. Marshall (ed.), Biofilms, John Wiley AND Sons Inc., New York, 3-15.
- CHARACKLIS, W. G., MCFETERS, G. A. UND MARSHALL, K. C. (1990).** Physiological ecology of biofilms,. In: W. G. Characklis and K. C. Marshall (ed.), Biofilms. John Wiley AND Sons Inc, New York, 341-394
- CVUA (2004).** CHEMISCHES UND VETERINÄRUNTERUCHUNGSAMT KARLSRUHE. Aktuelles aus dem Bereich der Lebensmittelmikrobiologie: *Enterobacter sakazakii* in Trockenmilch-Säuglingsnahrung. Jahresbericht 2002, **3**, 68.
- CHEN, K. H. UND CHEN, T. A. (1995).** A novel method for cloning DNA of plant-pathogenic mycoplasmalike organisms. *Can. J. Microbiol.*, **41**, 753–757.
- CHU, G., VOLLRATH, D. und DAVIS, R. W. (1986).** Separation of large DNA molecules by contour-clamped homogenous electric field. *Science*, **234**, 1582-1585
- CLARK, N.C., HILL, B.C., O'HARA, C.M., STEINGRIMSSON, O., COOKSEY, R.C., (1990).** Epidemiologic typing of *Enterobacter sakazakii* in two neonatal nosocomial outbreaks. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, **13**, 467–472.

- CLAROS, M. SCHÖNIAN, G., GRÄSER, Y., MONTAG, TH., RODLOFF, A.C., CITRON, D.M. UND GOLDSTEIN, E.J.C. (1995).** Identification and strain differentiation of `Bacteroides fragilis group`species and *Prevotella bibiy* by PCR Fingerprinting. *Anaerobe* 1, 209-217.
- CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION (2006).** Joint FAO/WHO Food Standards Programme, Codex Committee on Food Hygiene. Proposed Draft Code of Hygienic Practice for Powdered Formulae for Infants and Young Children at Step3. CX/FH 06/38/7. Secretariat of the Joint FAO/WHO Food Standards Programme. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION (2007).** Joint FAO/WHO Food Standards Programme, Codex Committee on Food Hygiene. Draft Principles and Guidelines for the Conduct of Microbiological Risk Management (MRM). Alinorm 07/30/13. Secretariat of the Joint FAO/WHO Food Standards Programme. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- COIGNARD, B. UND VAILLANT, V. (2006).** Infections à *Enterobacter sakazakii* associées à la consommation d'une préparation en poudre pour nourrissons. France, octobre à décembre 2004. Rapport d'investigation. Editions InVS, Saint-Maurice, France,88. [http://www.invs.sante.fr/display/?doc=publications/2006/infections\\_e\\_sakazakii/index.html](http://www.invs.sante.fr/display/?doc=publications/2006/infections_e_sakazakii/index.html)
- COLLINSON, S. K., PARKER, J. M., HODGES, R. S. UND KAY, W. W. (1999).** Structural predictions of AgfA, the insoluble fimbrial subunit of *Salmonella* thin aggregative fimbriae. *J. Mol. Biol.*, **290**, 741–756.
- COSTERTON, J. W., CHENG, K. J., GEESEY, G. G., LADD, T. I., NICKEL, J. C., DASGUPTA, M. UND MARRIE, T. J. (1987).** Bacterial biofilms in nature and disease. *Ann. Rev. Microbiol.*, **41**, 435-464.
- COSTERTON, J. W., STEWART, P. S. UND GREENBERG, E. P. (1999).** Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, **284**, 1318–1322.
- DARVEAU, R. P., TANNER, A., PAGE, R. C. (1997).** The microbial challenge in eriodontitis. *Periodontol. 2000*, **14**, 12-32.
- DEBAST, S. B., MELCHERS, W. J. VOSS, A. HOOGKAMP-KORSTANJE, J. A. UND MEIS, J. F. (1995).** Epidemiological survey of an outbreak of multi-resistant *Serratia marcescens* by PCR-fingerprinting. *Infection*, **23**, 267–271.
- DELONG, E. F., WICKHAM, G. S. UND PACE, N. R. (1989).** Phylogenetic strains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells. *Science*, **243** (4896), 1360-1363.
- DGHM (2006).** Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie. Mikrobiologische Richt- und Warnwerte. [www.lm-mibi.uni-bonn.de/DGHM.html](http://www.lm-mibi.uni-bonn.de/DGHM.html) Stand: Mai 2006.

- DGKJ (2005).** Deutschen Gesellschaft für Kinderheilkunde und Jugendmedizin. Hinweise zur Zubereitung und Handhabung von Säuglingsnahrungen. <http://www.dgkj.de/453.html>
- DGKJ (2006).** Deutschen Gesellschaft für Kinderheilkunde und Jugendmedizin. Gesunde Ernährung für mein Baby. [http://www.dgkj.de/fileadmin/user\\_upload/images/fuer\\_eltern/DGKJ\\_Elterninfo\\_Babyern\\_ahrung.pdf](http://www.dgkj.de/fileadmin/user_upload/images/fuer_eltern/DGKJ_Elterninfo_Babyern_ahrung.pdf)
- DIÄT-VERORDNUNG (2005).** Verordnung über diätetische Lebensmittel. Bekanntmachung der Neufassung der Diätverordnung vom 28.04.2005 (BGBl S. 1161) §14 Abs. 2 (GKZ und Kolibakterien).
- DIXON, J. J, BURD, D.A. UND ROBERTS, D. G. (1997).** Severe burns resulting from an exploding teat on a bottle of infant formula milk heated in a microwave oven. *Burns*. **23** (3), 268-269.
- DRION, E. F UND MOSSEL, D. A. A. (1972).** Mathematical-ecological aspects of the examinations for *Enterobacteriaceae* of foods processed for safety. *J. Applied Bacteriol.*, **35**, 233-239.
- DRION, E. F UND MOSSEL, D. A. A. (1977).** The reliability of the examination of Foods, processed for safety, for enteric pathogens and *Enterobacteriaceae*: a mathematical and ecological study. *J. Hyg. Camb.*, **78**, 301-324.
- DRUDY, D., O´ROURKE, M., MURPHY, M., MULLANE, N. R., O´MAHONY, R., KELLY, L., FISCHER, M., SANJAQ, S., SHANNON, P., WALL, P., O´MAHONY, M., WHITE, P. UND FANNING, S. (2006).** Characterization of a collection of *Enterobacter sakazakii* isolates from environmental and food sources. *International Journal of Food Microbiology*, **110**, 127-134.
- EDELSON-MAMMEL, S.G., UND BUCHANAN, R.L. (2004).** Thermal inactivation of *Enterobacter sakazakii* in rehydrated infant formula. *Journal of Food Protection*, **67**, 60-63.
- EFSA (2004).** European Food Safety Authority. Microbiological risks in infant formulae and follow-on formulae. *The EFSA Journal*, **113**, 1-35.
- EFSA (2004a).** European Food Safety Authority. Gutachten des Wissenschaftlichen Gremiums für Biologische Gefahren auf Ersuchen der Kommission über die mikrobiologischen Risiken in Säuglingsanfangsnahrung und Folgenahrung. (Frage Nr. EFSA-Q-2003-111). <http://www.efsa.eu.int>
- EHRlich, G. D., STOODLEY, P., KATHJU, S., ZHAO, Y., MCLEOD, B. R., BALABAN, N., HU, F. Z., SOTERANOS, N. G., COSTERTON, J. W., STEWART, P. S., POST, C.**

- UND LIN, Q. (2005).** Engineering Approaches for the Detection and Control of Orthopaedic Biofilm Infections. *Clin Orthop Relat Res.*, **437**, 59–66.
- EISENACH, K. (1992).** Chromosomal restriction fragment analysis by pulsed field gel electrophoresis. In: **ISENBERG, H.** (ed.): *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 10.5.c.1-10.5.c.11.
- EISENSTEIN, B. I. UND G. W. JONES. (1988).** The spectrum of infections and pathogenic mechanisms of *Escherichia coli*. *Adv. Intern. Med.*, **33**, 231–252.
- ELLIOT, T. S., MOSS, H. A., TEBBS, S. E., WILSON, I. C., BONSER, R. S., GRAHAM, T. R., BURKE, L. P. AND FAROQUI, M. H. (1997).** Novel approach to investigate a source of microbial contamination of central venous catheters. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **16**. 210-213.
- EUROPÄISCHES ARZNEIBUCH (1997).** Prüfung auf mikrobielle Verunreinigung bei nicht sterilen Produkten: Nachweis bestimmter Mikroorganismen. 3. Ausgabe.
- EUROPÄISCHE KOMMISSION (2005).** Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 der Kommission vom 15. November 2005 über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel. *Amtsblatt der Europäischen Union*, **L338**,1-26.
- EUROPÄISCHE KOMMISSION (2006).** Richtlinie 2006/141/EG der Kommission vom 22. Dezember 2006 über Säuglingsanfangsnahrung und Folgenahrung und zur Änderung der Richtlinie 1999/21/EG. *Amtsblatt der Europäischen Union*, **L401**,1-33.
- FANG, Q. (2002).** Beschleunigter Nachweis von Salmonellen in Lebensmitteln durch Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) mit 23S rRNA Sonden. Inaugural-Dissertation aus dem Institut für Allgemeine Hygiene und Umwelthygiene der Universität Tübingen.
- FAO/WHO (1995).** Application of Risk Analysis to Food Standard Issues. Reprort of the Joint FAO/WHO Expert Consultation. 13-17 March 1995. Geneva, Switzerland.
- FAO/WHO (2004).** *Enterobacter sakazakii* and other microorganisms in powdered infant formula. Microbiological Risk assessment Series, Meeting Report No. 6. <http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/mra6/en/>. Stand: 1. Oktober 2004.
- FAO/WHO (2006).** *Enterobacter sakazakii* and Salmonella in powdered infant formula. Microbiological Risk assessment Series, Meeting Report No. 10. (<http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/mra10/en/>). Stand: 14. Februar 2007.
- FARBER, J. M. (1996).** An introduction to the hows and whys of molecular typing. *J. Food Prot.*, **59**, 1091-1101.

- FARBER, J. M. (2004).** *Enterobacter sakazakii*-new foods for thought? *The Lancet*, **363**, 5-6.
- FARMER, J. J., HICKMAN, W., BRENNER, D. J., (1977).** Abstr. Annu. Mtg. Am Soc. Microbiol. C 154, 61.
- FARMER, J. J., ASBURY, M. A., HICKMAN, F. W., BRENNER, D. J., AND THE ENTEROBACTERIACEAE STUDY GROUP. (1980).** *Enterobacter sakazakii*, A new species of "Enterobacteriaceae" isolated from clinical specimens. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **30**, 569-584
- FDA (2002).** Food and Drug Administration. Isolation and enumeration of *Enterobacter sakazakii* from dehydrated powder infant formula. <http://www.cfsan.fda.gov/~comm/mmesakaz.html>; Stand 10. März 2003.
- FDA (2003).** Food and Drug Administration. FDA field survey of powdered formula manufacturing. [http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/03/slides/3939s1\\_Zink.ppt](http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/03/slides/3939s1_Zink.ppt). Stand 27 April 2006.
- FDA/CFSAN (2003).** Food And Drug Administration /Contaminants and Natural Toxicants Subcommittee meeting. Center for Food Safety and Applied Nutrition, Food and Drug Administration, College Park, Md. [www.fda.gov/OHRMS/DOCKETS/ac/03/transcripts/3939t1.doc](http://www.fda.gov/OHRMS/DOCKETS/ac/03/transcripts/3939t1.doc) ; Stand 27. Januar 2004.
- FLETCHER, M. UND LOEB, G. I. (1979).** Influence of substratum characteristics on the attachment of a marine pseudomonad to solid surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.*, **37**, 67-72.
- FORSYTHE, S. J. (2005).** *Enterobacter sakazakii* and other bacteria in powdered infant milk formula. *Maternal and Child Nutrition* **1**, 44-50.
- FOSTER, E. M. (1971).** The control of Salmonellae in processed foods: a classification system and sampling plan. *Journal of the AOAC*, **54 (2)**, 259-266.
- FRANKE-WHITTLE, I. H., KLAMMER, S. H., MAYRHOFER, S. UND INSAM H. (2006).** Comparison of different labelling methods for the production of labelled target DNA for microarray. *Journal of Microbiological Methods*, **65**, 117-126.
- FSAI (2005).** Food safety authority Ireland. *Enterobacter sakazakii*: an emerging public health risk. [www.fsai.ie/news/newsletter/nl\\_05/newsletter\\_513.pdf](http://www.fsai.ie/news/newsletter/nl_05/newsletter_513.pdf)
- GAKUYA, F. M., KYULE, M. N., GATHURA, P. B., KARIUKI, S. (2001).** Antimicrobial resistance of bacterial organisms isolated from rats. *East Afr. Med. J.*, **78**, 646– 649.

- GALLAGHER, P.G. UND BALL, W.S., (1991).** Cerebral infarctions due to CNS infection with *Enterobacter sakazakii*. *Pediatr. Radiol.*, **21**, 135– 136.
- GERSTEL, U. UND RÖMLING, U. (2001).** Oxygen tension and nutrient starvation are major signals that regulate *agfD* promoter activity and expression of the multicellular morphotype in *Salmonella* Typhimurium. *Environmental Microbiology.*, **3**, 638-648.
- GIOVANNONI, S. J., DELONG, E. F., OLSEN, G. J. UND PACE, N. R. (1988).** Phylogenetic Group-Specific Oligodeoxynucleotide Probes for Identification of Single Microbial Cells. *Journal of Bacteriology*, **170** (2), 720-726.
- GIRAFFA, G. UND SISTO, F. (1997).** Susceptibility to vancomycin of enterococci isolated from dairy products. *L. Appl. Microbiol.*, **25**, 335-338.
- GOEHRING, R. UND DUENSING, T. (1990).** Rapid field inversion gel electrophoresis in combination with an rRNA gene probe in the epidemiological evaluation of Staphylococci. *J. Clin. Microbiol.*, **28**, 426-429.
- GOUBY, A., CARLES-NURY, M. J., BOUZIGES, N., BOURG, G. MESNARD, R. UND BOUVET, P. (1992).** Use of pulsed-field gel electrophoresis for investigation of hospital outbreaks of *Acinetobacter baumannii*. *J. Clin. Microbiol.*, **30**, 1588-1591 .
- GRANT, K. A. UND KROLL, R. G. (1993).** Molecular biology techniques for the rapid detection and characterization of foodborne bacteria. *Food Sci. Technol. Today*, **7**, 80-88.
- GROTHUES, D. UND TÜMMLER, B. (1991).** New approaches in genome analysis by pulsed-field gel electrophoresis application to the analysis of *Pseudomonas* species. *Mol. Microbiol.* **5**, 2763-2776.
- GUILLAUME-GENTIL, O., SONNARD, V., KHANDAI, M. C., MARUGG, J. D. UND JOOSTEN, H. (2005).** A simple and rapid cultural method for detection of *Enterobacter sakazakii* in environmental samples. *J. Food Prot*, **68**, 64-69.
- GURTLER, J. B. UND BEUCHAT. L. R. (2005).** Performance of Media for Recovering Stressed Cells of *Enterobacter sakazakii* as Determined Using Spiral Plating and Ecometric Techniques. *Appl. Environ. Microbiol.*, **71** (12), 7661-7669.
- GURTLER, J. B., KORNACKI, J. L. UND BEUCHAT, L. R. (2005).** Review-Enterobacter sakazakii: A coliform of increased concern to infant health. *International Journal of Food Microbiology*, **104**, 1-34.
- HARRIS, L. S. UND ORIEL, P. J. (1989).** Heteropolysaccharide produced by *Enterobacter sakazakii*. *US Patent.* **4**, 806 636.

- HARRIS, R.D. (1989).** Kraft builds safety into next generation refrigerated foods. *Food Process.*, **50**, 111-114.
- HASSAN, A. A., ABDULMAWJOOD, A., YILDIRIM, Ö., FINK, K., LÄMMLER, C. UND SCHLENSTEDT, R. (2000).** Identification of streptococci isolated from various sources by determination of *cfb* gene and other CAMP-factor genes. *Can J Microbiol*, **46**, 946-951.
- HASSAN, A. A., AKINEDEN, O., KRESS, C., ESTUNINGSIH, S., SCHNEIDER, E. UND USLEBER, E. (2007).** Characterization of the gene encoding the 16S rRNA of *Enterobacter sakazakii* and development of a species specific PCR method. *Int. J. Food Microbiol.*, doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2006.12.011
- HASSAN, A. A., SANJAQ, S., AKINEDEN, Ö., KRESS, C., SCHNEIDER, E. UND USLEBER E. (2005).** Vergleich kultureller, biochemischer und molekularbiologischer Methoden zur Identifizierung von *Enterobacter sakazakii*. In: 46. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft e.V. (DVG), vom 26.09.-30.09.2005 in Garmisch-Patenkirchen.
- HEUVELINK, A. E., AHMED, M., KODDE, F. D., ZWARTKUIS-NAHUIS, J. T. M. UND DE BOER, E. (2001).** *Enterobacter sakazakii* in melkpoeder. Keuringsdienst van waren oost. Projectnummer OT 0110.
- HEUVELINK, A. E., MOES, H., TILBURG, J. J. H. C. UND DE BOER, E. (2004).** *Enterobacter sakazakii* in poedervormige producten. Keuringsdienst van waren oost. Projectnummer OT03H006.
- HILDEBRANDT, G. UND BÖHMER, L. (1996).** Stichprobenpläne zur Beurteilung der Salmonellenkontamination. *Fleischwirtschaft*, **76**, 600-605.
- HIMELRIGHT, I., HARRIS, E., LORCH, V., ANDERSON, M., JONES, T., CRAIG, A., KUEHNERT, M., FORSTER, T., ARDUINO, M., JENSEN, B. AND JERNIGAN, D. (2002).** *Enterobacter sakazakii* infections associated with the use of powdered infant formula- Tennessee. *Morb Mortal Wkly Rep.* 51, 297-299.
- HOLLAND, P. M., ABRAMSON, R. D., WATSON, R. UND GELFAND, D. H. (1991).** Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 357-362.
- HOLT, J.G., KRIEG, N.R., SNEATH, P., STALEY, J.T., WILLIAMS, S.T., WILLIAMS UND WILKINS (1994).** Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9<sup>th</sup> Edition.
- HSING-CHEN, C. UND WU, S. D. (1992).** Agar medium for enumeration of faecal coliforms. *J. Food Sci.*, **57**, 1454– 1457.

- HUNTER, P. R. UND GASTON, M. A. (1988).** Numerical Index of the Discriminatory Ability of Typing Systems: an Application of Simpson's Index of Diversity. *Journal of Clinical Microbiology*, **26** (11), 2465-2466.
- ICMSF (2002).** **International Commission for Microbiological Specifications for Foods.** Microorganisms in food 7: Microbiological testing in food safety management. Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- IDF (1998).** International Dairy Federation 73B:1998. Enumeration of coliforms-colony count technique and most probable number technique at 30°. International Dairy Federation, Geneva, Switzerland.
- ISO (1991).** International Standard Organisation 4381:1991. Microbiology- General guidance for the enumeration of coliforms - most probable number technique. International Standard Organisation, Geneva, Switzerland.
- ISO/TS 22964.** IDF/RM 210 TECHNICAL SPECIFICATION. Working document for ISO/TC/SC9/*Enterobacter sakazakii* ad'hoc group. Milk and milk products - Detection of *Enterobacter sakazakii*.
- IVERSEN, C. UND FORSYTHE, S.J. (2003).** Risk profile of *Enterobacter sakazakii*, an emergent pathogen associated with infant milk formula. *Trends in Food Science and Technology*, **14**, 443-454.
- IVERSEN, C. (2006).** Persönliche Mitteilung.
- IVERSEN, C., DRUGGAN, P. UND FORSYTHE, S.J. (2004a).** A Selective Differential Medium for *Enterobacter sakazakii*. *Int. J. Food Microbiology*, **96**, 133-139.
- IVERSEN, C., LANE, M. UND FORSYTHE, S. J. (2004b).** The growth profile, thermotolerance and biofilm formation of *Enterobacter sakazakii* grown in infant formula milk. *Lett Appl Microbiol.*, **38**, 378-382.
- IVERSEN, C., LAZAR ADLER, N., HARGREAVES, A. UND FORSYTHE, S.J. (2004C).** Virulence factors of *Enterobacter sakazakii*. 104<sup>th</sup> ASM General Meeting, New Orleans, LA.
- IVERSEN, C., WADDINGTON, M., ON, S. L. UND FORSYTHE, S.J. (2004d).** Identification and phylogeny of *Enterobacter sakazakii* relative to *Enterobacter* and *Citrobacter* Species. *J Clin Microbiol*, **42**, 5368-70.
- IVERSEN, C. UND FORSYTHE, S. J. (2004e).** Isolation of *Enterobacter sakazakii* and other Enterobacteriaceae from powdered infant formula milk and related products. *Food Microbiol.*, **21**, 771-776.

- IVERSEN, C., WADDINGTON, M., FARMER, J. J. UND FORSYTHE, S. J. (2006).** The biochemical differentiation of *Enterobacter sakazakii* genotypes. *BMC Microbiology*, **6**, 28.
- IZARD, D., RICHARD, C. UND LECLERC, H. (1983).** DNA relatedness between *Enterobacter sakazakii* and other members of the genus *Enterobacter*. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)* **134A**, 241-245.
- JAMES, G. A., KORBER, D. R., CALDWELL, D. E. UND COSTERTON, J. W. (1995).** Digital image analysis of growth and starvation responses of a surface-colonizing *Acinetobacter* sp. *J. Bacteriol.*, **177**, 907-915.
- JANDA, J.M. UND ABBOTT, S. L. (1998).** The genus *Enterobacter*. *The Enterobacteria*. Lippincott-Raven, New York, 148-177.
- JASPER, A.H., MUYTJENS, H.L. UND KOLLEE, L.A. (1990).** Neonatal meningitis caused by *Enterobacter sakazakii*: milk powder is not sterile and bacteria like milk too! *Tijdschri Kindergeneeskd*, **58**, 151-5.
- JAY, J. M. (1991).** *Modern Food Microbiology*. New York, Van Nostrand Reinhold. New York.
- JOHN, M., SKRABE, H. UND DELLWEG, H. (1969).** Use of polyacrylamide gel columns for the separation of nucleotides. *FEBS Letters*, **5** (3), 185-186.
- JOKER, R.N., NORHOLM, T. UND SIBONI, K.E. (1965).** A case of neonatal meningitis caused by a yellow *Enterobacter*. *Danish Med. Bull.* **12**, 128-130.
- JORDAN, J. Z. (1998).** Genomic DNA digestion and ribotyping. In: WOODFORD, N., and JOHNSON, A. P. (eds.). *Molecular bacteriology: protocols and clinical applications*. Humana Press. Totowa, New Jersey, USA. 17-19.
- JURETSCHKO, S., LOY, A., LEHNER, A. UND WAGNER, M. (2002).** The microbial community composition of a nitrifying-denitrifying activated sludge from an industrial sewage treatment plant analysed by the full-cycle rRNA approach. *Syst Appl Microbiol*, **25**, 84-99.
- KANDHAI M.C., REIJ M. W., GORRIS, L.G.M., GUILLAUME-GENTIL, O. UND VAN SCHOTHORST, M. (2004a).** Occurrence of *Enterobacter sakazakii* in food production environments and households. *The Lancet* **363**, 39-40.
- KANDHAI M.C., REIJ M. W., VAN PUYVELDE, K., GUILLAUME-GENTIL, O., BEUMER, R. R. UND VAN SCHOTHORST, M. (2004b).** A new protocol for the detection of *Enterobacter sakazakii* applied to environmental samples. *Journal of Food Protection*, **67**, 1267-1270.

- KELLER, R., PEDROSO, M. Z., RITCHMANN, R. UND SILVA1, R. M. (1998).** Occurrence of Virulence-Associated Properties in *Enterobacter cloacae*. *Infection and Immunity*, **66** (2), 645–649.
- KEMPF, B. UND BREMER, E. (1998).** Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolarity environments. *Archives of Microbiology*, **170**, 319-330.
- KEMPF, V. A. J., MÄNDLE, T., SCHUMACHER, U., SCHAEFER, A., AUTENRIETH, I.B. (2005).** Rapid detection and identification of pathogens in blood cultures by fluorescent in situ hybridization and flow cytometry. *Int J Med Microbiol* , **295**, 47-55.
- KEYSER, M., WITTHUHN, R. C., RONQUEST, L. - C. UND BRITZ, T. J. (2003).** Treatment of winery effluent with upflow anaerobic sludge blanket (USAB) - granular sludges enriched with *Enterobacter sakazakii*. *Biotechnology Letters*, **25**, 1893-1898.
- KINDLE, G., BUSSE, A., KAMPA, D., MEYER-KONIG, U. UND DASCHNER, F. D. (1996).** Killing activity of microwaves in milk. *J Hosp Infect*, **33**, 273-278.
- KING, T. C., SIRDESKMUKH, R. UND SCHLESSINGER, D. (1986).** Nucleolytic processing of ribonucleic acid transcripts in prokaryotes. *Microbiol. Rev.*, **50**, 428-451.
- KINGSLEY, R., RABSCH, W., STEPHENS, P., ROBERTS, M., REISSBRODT, R. UND WILLIAMS, P. H. (1995).** Iron supplying systems of *Salmonella* in diagnostics, epidemiology and infection. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, **11**, 257–264.
- KITAGUCHI, A., YAMAGUCHI, N. UND NASU, M. (2005).** Enumeration of Respiring *Pseudomonas* spp. in Milk within 6 Hours by Fluorescence In Situ Hybridization following Formazan Reduction. *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 2748- 2752.
- KLEIMAN, M.B., ALLEN, S.D., NEAL, P. UND REYNOLDS, J. (1981).** Meningoencephalitis and compartmentalization of the cerebral ventricles caused by *Enterobacter sakazakii*. *J. Clin. Microbiol.*, **14**, 352–354.
- KUHNERT, P., BOERLIN, P. UND FREY, J. (2000).** Target genes for virulence assessment of *Escherichia coli* isolates from water, food and the environment. *FEMS Microbiol. Rev.*, **4**, 107-117.
- KURATA, N., NAKAMURA, K., YAMAMOTO, K., HARUSHIMA, Y., SUE, N., WU, J., ANTONIO, B. A., SHOMURA, A., SHIMIZU, T., LIN, S. Y., INOUE, T., FUKUDA, A., SHIMANO, T., KUBOKI, Y., TOYOMA, T., MIYAMOTO, Y., KIRIHARA, T., HAYASAKA, K., MIYAO, A., MONNA, L., ZHONG, H. S., TAMURA, Y., WANG, Z. X., MOMMA, T., UMEHARA, Y., YANO, M., SASAKI, T. UND MINOBE, Y. (1994).** A300 kilobase interval genetic map of rice including 283 expressed sequences. *Nat. Genet.*, **8**, 365-372.

- KUZINA, L.V., PELOQUIN, J.J., VACEK, D.C. UND MILLER, T.A., (2001).** Isolation and identification of bacteria associated with adult laboratory Mexican fruit flies, *Anastrepha ludens* (Diptera:Tephritidae). *Current Microbiology*, **42**, 290– 294.
- LAI, E., BIRREN, B. W., CLARK, S. M., SIMON, M. I. UND HOOD, L. (1989).** Pulsed Field Electrophoresis. *Biotechniques* **7**, 34-42
- LAI, K. K. (2001).** *Enterobacter sakazakii* infections among neonates, infants, children, and adults. *Medicine*,**80**, 113-122.
- LAWRENCE, L. M., HARVEY, J. UND GILMOUR, A. (1993).** Development of a random amplification of polymorphic DNA typing method for *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 3117–3119.
- LE MAGREX-DEBAR E., LEMOINE J., GELLE M. P., JACQUELIN L. F. UND CHOISY C. (2000).** Evaluation of biohazards in dehydrated biofilms on foodstuff packaging. *Int. J. Food Microbiol.*, **55**, 239 – 243.
- LEBENSMITTEL- UND FUTTERMITTELGESETZBUCH (LFGB) (2006).** Nachweis von coliformen Keimen. § 64 LFGB-01.00-3 1987-03. Fassung vom 26. April 2006.
- LECLERC, H., MOSSEL, D. A. A., EDBERG, S. C. UND STRUIJK. C. B. (2001).** Advances in the bacteriology of the coliform group, Their Suitability as Markers of Microbial Water Safety. *Annual Review of Microbiology*, **55**, 201-234.
- LECLERCQ, A., WANEGUE, C. UND BAYLAC, P. (2002).** Comparison of fecal coliform agar and violet red bile lactose agar for fecal coliform enumeration in foods. *Applied and Environ. Microbiol.*, **68**,1631-1638.
- LEE, L.G., CONNELL, C. R. UND BLOCH, W. (1993).** Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic Acids Res.*, **21**, 3761-3766.
- LEELAYUWAT, C., ROMPHRUK, A. UND LULITANOND, A. S. (2000).** Genotype analysis of *Burkholderia pseudomallei* using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD): indicative of genetic difference amongst environmental and clinical isolates. *Acta Trop.*, **77**, 229-237.
- LEHNER, A. , NITZSCHE, S., BREEUWER, P., DIEP, B., THELEN, K. UND STEPHAN, R. (2006).** Comparison of two chromogenic media and evaluation of two molecular based identification systems for *Enterobacter sakazakii* detection. *BMC Microbiol.*, **23** (6),15.
- LEHNER, A., RIEDEL, K., EBEREL, L., BREEUWER, P., DIEP, B. UND STEPHAN, R. (2005).** Biofilm formation, extracellular polysaccharide production, and cell-to-cell signalling in various *Enterobacter sakazakii* strains: aspects promoting environmental persistence. *J Food Prot.*, **68**, 2287-2294.

- LEHNER, A., TASARA, T. UND STEPHAN, R. (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), 1-7.
- LENATI, R., HEBERT, K., HOUGHTON, L., O'CONNOR, D.L., FARBER J.M. UND PAGOTTO, F. (2005).** The survival and growth of *E. sakazakii* in human breast milk and powdered infant formula. *Journal of Food Protection*, **68** (Sup. A), 83.
- LESLIE, S.B., ISRAELI, E., LIGHTHART, B., CROWE, J.H. UND CROWE, L.M. (1995).** Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61** (10), 3592-3597.
- LEUSCHNER, R. G. K. UND BEW, J. (2004).** A medium for the presumptive detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula: Interlaboratory Study. *Journal of AOAC International*, **87** (3), 604-613.
- LIAO, D. (2000).** Gene conversion drives within genic sequences: concerted evolution of ribosomal RNA genes in bacteria and archaea. *J. Mol. Evol.*, **51**, 305–317.
- LIU, Y., CAI, X., ZHANG, X., GAO, Q., YANG, X., ZHENG, Z., LUO, M. UND X. HUANG (2005).** Real time PCR using TaqMan and SYBR Green for detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula. *Journal of Microbiological Methods*.
- LOC-CORRILLO, C., WADDINGTON, M., LU, X., UND FORSYTHE, S., (2004).** Phylogenetic relationship of *Enterobacter sakazakii* and related organisms. Abstract P-005, 104th Gen. Mtg., *Am. Soc. Microbiol.*, 23-27 May, New Orleans, LA, USA.
- LUCAS, A. UND COLE, T. J. (1990).** Breast milk and neonatal necrotizing enterocolitis. *Lancet*, **363**, 39-40.
- LUDWIG, W., STRUNK, O., WESTRAM, R., RICHTER, L., MEIER, H., YADHUKUMAR, BUCHNER, A., LAI, T., STEPPI, S., JOBB, G., FÖRSTER, W., BRETTSCHE, I., GERBER, S., GINHART, A. W., GROSS, O., GRUMANN, S., HERMANN, S., JOST, R., KÖNIG, A., LISS, T., LÜSSMANN, R., MAY, M., NONHOFF, B., REICHEL, B., STREHLOW, R., STAMATAKIS, A., STUCKMANN, N., VILBIG, A., LENKE, M., LUDWIG, T., BODE, A. UND SCHLEIFER, K.-H. (2004).** ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Research*, **32** (4 ), 1363-1371.
- MALORNY, B. UND WAGNER, M. (2005).** Detection of *Enterobacter sakazakii* Strains by Real-Time PCR. *Journal of Food Protection*, (**68**) 8, 1623-1627.
- MALORNY, B., PACASSONI, E., FACH, P., BUNGE, C. MARTIN, A. UND HEMUTH, R. (2004).** Diagnostic rea-time PCR for the detection of *Salmonella* in food. *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**, 7046-7052.

- MANAFI, M. UND LANG, L. (2005).** Comparison of Three Chromogenic Media for Detection of *Enterobacter sakazakii*; a Preliminary Study. P-056. American Society of Microbiology (ASM), Atlanta.
- MANIE, T., KHAN, S., BRÖZEL, V. S., VEITH, W. J. UND GOUWS, P. A. (1998).** Antimicrobial resistance of bacteria isolated from slaughtered and retail chickens in South Africa. *L. Appl. Microbiol.*, **26**, 253-258.
- MARCUS S.L., BRUMELL, J. H., PFEIFER, C. G. UND FINLAY, B. B. (2000).** Salmonella pathogenicity islands: virulence in small packages. *Microbes. Infect.*, **2** (2), 145-156.
- MASLOW, J. N., SLUTSKY, A. M. UND R. D. ARBEIT (1993).** Application of pulsed-field gel electrophoresis to molecular epidemiology, p. 563-572. In D. H. Persing, T. K. Smith, F. C. Tenover, and T. J. White (ed.), *Diagnostic molecular microbiology: principles and applications*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- MEYER, A. H. (1998).** Lebensmittelrecht - Leitfaden für Studium und Praxis. 1. Aufl., Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart.
- MCCLELLAND, M., JONES, R., PATEL, Y. UND NELSON, M. (1987).** Restriction endonucleases for pulsed field mapping of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research*, **15**, 5985-6005.
- MCLAUGHLIN-BORLACE, L., STAPLETON, F., MATHESON, M. UND DART, J. K. (1998).** Bacterial biofilm on contact lenses and lens storage cases in wearers with microbial keratitis. *J. Appl. Microbiol.*, **84**, 827-838.
- METZ, M., LINDE, H.-J., LEHN, N. UND EHRET, W. (1996).** Die Pulsfeld-Gelelektrophorese zur epidemiologischen Analyse pathogener Keime. *Biospektrum*, **5**, 53-54.
- MONNA, L., MIYAO, A., ZHONG, H. S., SASAKI, T. UND MINOBE. Y. (1995).** Screening of RAPD markers linked to the photoperiod-sensitive gene in rice chromosome 6 using bulked segregant analysis. *DNA Res.*, **2**, 101-106.
- MONROE, P. W. UND TIFT, W.L. (1979).** Bacteremia associated with *Enterobacter sakazakii* (yellow, pigmented *Enterobacter cloacae*). *J. Clin. Microbiol.*, **10**, 850-851.
- MOSSEL, D. A. A. UND STRUIJK, C. B. (1995).** Escherichia coli, other Enterobacteriaceae and additional indicators as markers of microbiological quality of food: advantages and limitations. *Microbiologia.*, **11** (1), 75-90.
- MOSSEL, D. A.A. (1982).** Marker (index and indicator) organisms in food and drinking water. Semantics, ecology, taxonomy, and enumeration. *Antonie van Leeuwenhoek*, **48**, 609-611.

- MOSSEL, D. A.A. (1995).** The alleged 'british attitude' to microbiological standards for foods-not historical founded. *Food Sci Technol, To-day*, **9**, 253.
- MÜHLEMANN, M., AEBI, R., BÜHLMANN, G. UND SCHÄLLIBAUM, M. (2003).** Risikoanalyse und mikrobiologische Risikobeurteilung. *AGRARForschung*, **10 (8)**, 300-305.
- MULLIS, K. B. UND FALOONA, F. A. (1987).** Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.*, **155**, 335-350.
- MURRAY, B. E., SINGH, K. V., HEATH, J. D., SHARMA, B. R. UND WEINSTOCK, G. M. (1990).** Comparison of Genomic DNAs of Different Enterococcal Isolates Using Restriction Endonucleases with Infrequent Recognition Sites. *Journal of Clinical Microbiology*, **28 (9)**, 2059-2063.
- MUYTJENS, H. L. UND KOLEE, L. A. (1990).** *Enterobacter sakazakii* meningitis in neonates, causative role of formula? *Pediatric. Infectious Disease*, **9**, 372-373.
- MUYTJENS, H. L., ROELOFS, W. H. UND JASPAR, G. H. J. (1988).** Quality of powdered substitutes for breast milk with regard to the members of the family of *Enterobacteriaceae*. *J. Clin. Microbiol.*, **26**, 743-746.
- MUYTJENS, H. L., VAN DER ROS-VAN DE REPE, J. UND VAN DRUTEN, H.A. (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)**, 684-686.
- MUYTJENS, H., (1985).** *Enterobacter sakazakii*: identification and clinical significance. *Antonie van Leeuwenhoek*, **51**, 618.
- MUYTJENS, H.L. UND VAN DER ROS-VAN DE REPE, J. (1986).** Comparative *in vitro* susceptibilities of eight *Enterobacter* species, with special reference to *Enterobacter sakazakii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **29 (2)**, 367-370.
- MUYTJENS, H.L., ZANEN, H.C., SONDERKAMP, H.J., KOLEE, L.A., WACHSMUTH, I.K. UND FARMER, J.J. (1983).** Analysis of eight cases of neonatal meningitis and sepsis due to *Enterobacter sakazakii*. *J. Clin. Microbiol.* **18**, 115-120.
- NAQVI, S. H., MAXWELL, M. A. UND DUNKLE, L. M. (1985).** Cefotaxime therapy of neonatal Gram-negative bacillary meningitis. *Pediatr. Infect. Dis.*, **4**, 499- 502.
- NATARO, J. P., KAPER, J. B. (1998).** Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* **(11)**, 142-201.

- NAZAROWEC-WHITE, M. UND FARBER, J.M. (1997a).** Thermal resistance of *Enterobacter sakazakii* in reconstituted dried-infant formula. *Letters in Applied Microbiology*, **24**, 9-13.
- NAZAROWEC-WHITE, M. UND FARBER, J.M. (1997b).** Incidence, survival and growth of *Enterobacter sakazakii* in infant formula. *Journal of Food Protection*, **60**, 226-230.
- NAZAROWEC-WHITE, M. UND FARBER, J.M. (1997c).** *Enterobacter sakazakii*: a review. *Int. J. of Food Microbiol.* **34**, 103-113.
- NAZAROWEC-WHITE, M. UND FARBER, J.M. (1999a).** Phenotypic and genotypic typing of food and clinical isolates of *Enterobacter sakazakii*. *J. Med. Microbiol.* **48**, 559-567.
- NAZAROWEC-WHITE, M., MCKELLAR R. C. UND PIYASENA P. (1999b).** Predictive modelling of *Enterobacter sakazakii* inactivation in bovine milk during high-temperature short-time pasteurisation. *Food Research International*, **32**(5), 375-379.
- NORIEGA, F.R., KOTLOFF, K.L., MARTIN, M.A. UND SCHWALBE, R.S. (1990).** Nosocomial bacteremia caused by *Enterobacter sakazakii* and *Leuconostoc mesenteroides* resulting from extrinsic contamination of infant formula. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, **9**(6), 447-449.
- OH, S-W. UND KANG, D-H. (2004).** Fluorogenic selective and differential medium for isolation of *Enterobacter sakazakii*. *Applied and Environmental Microbiology*, **70** (9), 5692-5694.
- PAGOTTO, F.J., NAZAROWEC-WHITE, M., BIDAVID, S. UND FARBER, J.M. (2003).** *Enterobacter sakazakii*, infectivity and enterotoxin production *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Food Protection*, **66**, 370-375.
- PARDUE, M. L. UND GALL, J. G. (1969).** Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Genetics*, 600-604.
- PARK, S. R., MACKAY, W. G. UND REID, D. C. (2001).** *Helicobacter* sp. recovered from drinking water biofilm sampled from a water distribution system. *Water Res.* **35**: 1624 - 1626.
- PERNTHALER, A UND PERNTHALER, J. (2005).** Simultaneous fluorescence in situ hybridisation of mRNA and rRNA for the detection of gene expression in environmental microbes. *Methods Enzymol.*, **397**, 352-371.
- PLESS, P. UND REISSBRODT, R. (1995).** Selective pre-enrichment of *Salmonella* from eggs by siderophore supplements. *Zbl. Bakt.*, **279**, 344-353.

- PODSCHUN, R. UND ULLMANN, U. (1998).** *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clinical Microbiology Reviews.*, **11** (4), 589-603.
- POSTUPA, R. UND ALDOVA´, E. (1984).** Enterobacter sakazakii: a Tween 80 esterase-positive representative of the genus Enterobacter isolated from powdered milk specimens. *J. Hyg., Epidemiol. Microbiol. Immunol.*, **28**, 435-440.
- PRATT, L. A. UND KOLTER, R. (1998).** Genetic analysis of escherichia coli biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Mol. Microbiol.*, **30** (2), 285-293.
- PRINGLE, J. H. UND FLETCHER, M. (1983).** Influence of substratum wettability on attachment of fresh bacteria to solid surface. *Appl. Environ. Microbiol.*, **45**, 811-817.
- PROUTY, A. M., GUNN, J. S. (2003).** Comparative analysis of Salmonella enterica serovar Typhimurium biofilm formation on gallstones and on glass. *Infect. Immun.*, **71**, 7154-7158.
- PROUTY, A. M., SCHWESINGER, W. H. UND GUNN, J. S. (2002).** Biofilm formation and interaction with the surfaces of gallstones by Salmonella spp. *Infect. Immun.* **70**, 2640-2649.
- RAMESH, N., JOSEPH, S. W., CARR, L. E., DOUGLASS, L. W. UND WHEATON, F. W. (2002).** Evaluation of chemical disinfectants for the elimination of *Salmonella* biofilms from poultry transport containers. *Poult. Sci.*, **81**, 904-910.
- REISSBRODT, R. (1994).** Iron and microorganisms. *Culture*, **15** (2), 5-8.
- REISSBRODT, R., HEIER, H., TSCHÄPE, H., KINGSLEY, R. A. UND WILLIAMS, P. H. (2000).** Resuscitation by Ferrioxamine E of Stressed *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium from Soil and Water Microcosms. *Applied and Environmental Microbiology*, **66** (9) 4128-4130.
- RENNIE, R. P. UND DUNCAN, I. B. R. (1974).** Combined biochemical and serological typing of clinical isolates of *Klebsiella*. *Appl. Microbiol.*, **28**, 534-539.
- RESTAINO, L. (2005).** Use of Chromogenic/Fluorogenic Substrates for Isolating Bacterial Pathogens. R UND F Laboratories, Downers Grove, IL 60115: 7th Annual Conference on Foodborne Pathogen Analysis July 17 -20.
- RHODEHAMEL, E. J. (1992).** FDA's concerns with sous vide processing. *Food Technology*, **6**(12), 72-76.

- RIEMELT, I., BARTEL, B. UND MALCZAN, M. (2003).** Milchwirtschaftliche Mikrobiologie. 2. Aufl., Behr's Verlag, Hamburg.
- RODRIGUEZ-LAZARAO, D. JOFRE, A., AYMERICH, T., HUGAS, M. UND PLA, M. (2004).** Rapid quantitative detection of *Listeria monocytogenes* in meat products by real-time PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**, 6299-6301.
- RÖMLING, U. HEUER, T. UND TÜMMLER, B. (1994).** Bacterial genome analysis by pulsed-field gel electrophoresis techniques In: Chrambac, A. und M.J. Dunn, Advances in Electrophoresis, Vol. VHC, Weinheim, 353-406.
- RÖMLING, U., BIAN, Z., HAMMER, M., SIERRALTA, W. D. UND NORMARK, S. (1998a).** Curli fibers are highly conserved between *Salmonella* Typhimurium and *Escherichia coli* with respect to operon structure and regulation. *J. Bacteriol.*, **180**, 722-731.
- RÖMLING, U., FISLAGE, R. UND TÜMMLER, B. (1995).** Theorie und Anwendung der Makrorestriktionsanalyse für die klonale Analyse von Erregern. *Immun. Infekt.*, **23**, 4-8.
- RÖMLING, U., SIERRALTA, W.D., ERIKSSON, K. UND NORMARK, S. (1998b).** Multicellular and aggregative behaviour of *Salmonella typhimurium* strains is controlled by mutations in the *agfD* promoter. *Mol. Microbiol.*, **28**, 249-264.
- ROSS, P., MAYER, R. UND BENZIMAN, M. (1991).** Cellulose biosynthesis and function in bacteria. *Mol. Microbiol.*, **55**, 35-58.
- RÜSSMANN, H., KEMPF, A. J. K., KOLETZKO, S., HEESEMANN, J. UND AUTENRIETH, I. B. (2001).** Comparison of fluorescent *in situ* hybridization and conventional culture for detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy specimens. *J. Clin Microbiol.*, **39** (1), 304-308.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F. UND MANIATIS, T. (1989).** Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- SANDERS, W. E. JR UND SANDERS, C. C. (1997).** Enterobacter spp., Pathogens poised to flourish at the turn of the century. *Clinical Microbiology Reviews*, **10** (2), 220-241.
- SANDO, W. C, GALLAHER, K. J. UND RODGERS, B. M. (1984).** Risk factors for microwave scald injuries in infants. *J Pediatr.* **105**(6), 864-867.
- SCHEEPE-LEBERKÜHNE, M. UND WAGNER, F. (1986).** Optimization and preliminary characterization of an exopolysaccharide synthesized by *Enterobacter sakazakii*. *Biotechnology Letters*, **8**, 695-700.

- SCHMITZ, F.-J., GEISEL, R., RING, A., WAGNER, S. UND HEINZ, H.P. (1995).** Molekulare Epidemiologie bei nosokomialen Infektionen-Vergleich verschiedener Typisierungsverfahren. *Clin. Lab.*, **41**, 991-1001.
- SCHMITZ, F.J., STEIERT, M., TICHY, H.V., HOFMANN, B., VERHOEF, J., HEINZ, H. P., KOHRER, K. UND JONES, M. E. (1998).** Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from Düsseldorf by six genotypic methods. *J Med Microbiol.* **47**, 341-351.
- SCHWARTZ, D. C. UND CANTOR, C. R. (1984).** Separation of Yeast Chromosome-Sized DNAs by Pulsed Field Gradient Gel Electrophoresis. *Cell.*, **37**, 67-75.
- SCHWARTZ, D. C., SAFFRAN, W., WELSH, J., HAAS, R., GOLDENBERG, M. UND CANTOR, C. R. (1982).** New techniques for purifying large DNAs and studying their properties and packaging. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **47**, 189-195.
- SCHWEIKERT, A., RAU, T., BERKHOLZ, A., ALLERA, A., DAUFELDT, S. UND WILDT, L. (2004).** Association of progesterone receptor polymorphism with recurrent abortions. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, **113**, 67-72.
- SEO, K. H. UND BRACKETT, R. E. (2005).** Rapid, specific, detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula using a real-Time PCR Assay. *J. Food Prot.*, **68**, 59-63.
- SEO, K. H., VALENTINE-BON, I. E. BRACKET, R. E. UND HOLT, P. S. (2004).** Rapid, specific detection of *Salmonella Enteritidis* (SE) in pooled eggs using real time PCR method. *J. Food Prot.*, **67**, 864-869.
- SHAPTON, D. A. UND SHAPTON, N.F. (1993).** Hygienic design. Principles and Practices for the safe processing of food. 95-111. (Eds D. Shapton). Butterworth-Heinemann Ltd., New York.
- SIMMONS, B. P., GELFAND, M. S., HAAS, M., METTS, L. UND FERGUSON, J. (1989).** *Enterobacter sakazakii* infections in neonates associated with intrinsic contamination of a powdered infant formula. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.*, **10**, 398-401.
- SIMPSON, E. H. (1949).** Measurement of diversity. *Nature (London)*, **163**, 688.
- SINGH, P. K., PARSEK, M. R., GREENBERG, E. P. UND WELS, H. M. J. (2002).** A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development. *Nature*, **417**, 552.
- SKLADAL, P., MASCINI, M. UND ZANNONI, G. (1993).** Detection of bacterial contamination in sterile UHT milk as L-lactate biosensor. *Enzyme and Microbial Technology*, **15**, 508-512.

- SOLANO, C., GARCIA, B., VALLE, J., BERASAIN, C., GHIGO, J. M., GAMAZO, C. UND LASA, I. (2002).** Genetic Analysis of Salmonella enteritidis biofilm formation: critical role of cellulose. *Mol. Microbiol.*, **43** (3), 793-808.
- SONG, K. Y., SEO, K. H., THAMMASUVIMOL, G. UND BRACKETT, R. E. (2005).** Development of Selective Media for Detection of *Enterobacter sakazakii* by Using Various Iron Source and alpha-glucosidase Substrates. *Journal of Food Protection*, **68(A)**, 66-192.
- SPIERS, A. J., KAHN, S. G., BOHANNON, J., TRAYSANO, M. UND RAINEY, P. B. (2002).** Adaptive divergence in experimental populations of *Pseudomonas fluorescens*. I. Genetic and phenotypic bases of wrinkly spreader fitness. *Genetics*, **161**, 33-46.
- STEIGERWALT, A. G., FANNING, G. R., FIFE-ASBURY, M. A. UND BRENNER, D. J. (1976).** DNA relatedness among species of *Enterobacter* and *Serratia*. *Can. J. Microbiol.*, **22**, 121-137.
- STOLL, B., HANSEN, N., FANAROFF, A., UND LEMONS, A. (2004).** *Enterobacter sakazakii* is a rare cause of septicaemia or meningitis in VLBW infants. *Journal of Pediatrics*, **144**, 821-823.
- TENOVER, F. C., ARBEIT, R. D., GOERING, R. V., MICKELSEN, P. A., MURRAY, B. E., PERSING, D. H. UND SWAMINATHAN, B. (1995).** Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* (33), 2233-2239.
- TICE, R. R., AGURELL, E., ANDERSON, D., BURLINSON, B., HARTMANN, A., KOBAYASHI, H., MIYAMAE, Y., ROJAS, E., RYU, J.-C. UND SASAKI, Y. F. (2000).** Singel cell gel/Comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **35**, 206-221.
- TOMAYKO, J. F. UND MURRAY, B. E. (1995).** Analysis of *Enterococcus faecalis* isolates from intercontinental sources by multilocus enzyme electrophoresis and pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol.* , **33(11)**, 2903-2907.
- TYLER, K. D., WANG, G., TYLER, S. D. UND JOHNSON W.M. (1997).** Factors affecting reliability and reproducibility of amplification-based DNA fingerprinting of representative bacterial pathogens. *J Clin Microbiol.* 35, 339-346.
- URMENYI, A.M.C. UND FRANKLIN, A.W. (1961).** Neonatal death from pigmented coliform infection. *Lancet*, **1**, 313-315.
- US FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, FDA (2006).** Health professionals letter on *Enterobacter sakazakii* infections associated with use of powdered (dry) infant formulas in neonatal intensive care units. <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/inf-ltr3.html>. Stand: 29 Mai 2006.

- VAN ACKER, J., DE SMET, F., MUYLDERMANS, G., ANNE NAESSENS, A., UND LAUWERS, S. (2001).** Outbreak of necrotizing enterocolitis associated with *Enterobacter sakazakii* in powdered milk formula. *Journal of Clinical Microbiology*, **39**(1), 293-297.
- VAN GARDE, S. J. UND WOODBURN, M. (1987).** Food discard practices of householders. *Journal American Dietetic Association*, **87**, 322-329.
- VERORDNUNG (EG) Nr. 2073/2005** Der Kommission vom 15. November 2005 über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel. *Amtsblatt der Europäischen Union*, **L338**, 1-26.
- VERSALOVIC, J., KOEUTH, T., BRITTON, R., GESZVAIN, K. UND LUPSKI, J. R. (1993).** Conservation and evolution of the rpsU-dnaG-rpoD macromolecular synthesis operon in bacteris. *Molecular Microbiology*, **8** (2), 343-355.
- VISCIDI, R. P. UND YOLKEN, R. G. (1987).** Molecular diagnosis of infectious diseases by nucleic acid hybridization (Review). *Mol. Cell. Probes*, **1**, 3-14.
- VLKOVÁ, E., NEVORAL, J., JENCIKOVA, J., KOPEČNÝ, J., GODEFROOIJ, J., TROJANOVÁ, I. UND RADA, V. (2005).** Detection of infant faecal bifidobacteria by enzymatic methods. *Journal of Microbiological Methods*, **60**, 365– 373.
- WAAR, K., DEGENER, J. E., VAN LUYN, M. J. UND HARMSSEN, H. J. (2005).** Fluorescent in situ hybridization with specific DNA probes offers adequate detection of *Enterococcus faecium* in clinical samples. *J. Med. Microbiol.*, **54** (10), 937-944.
- WAGNER, M., MADERENER, A. UND BRANDL, E. (1996).** Random amplification of polymorphic DNA for tracing and molecular epidemiology of *Listeria* contamination in a chees plant. *J Food Prot*, **59**, 384-389.
- WEIR, E. (2002).** Powdered infant formula and fatal infection with *Enterobacter sakazakii*. *Can. Med. Assoc. J.*, **166**, 1570.
- WELSH, J. UND McCLELLAND (1990).** Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.*, **19**, 6823-6831.
- WHO (2005).** Fourth meeting of executive board, 115<sup>th</sup> session. 18. January 2005. [www.who.int/gb/ebwha/pdf\\_files/EB115-REC2/e/4.pdf](http://www.who.int/gb/ebwha/pdf_files/EB115-REC2/e/4.pdf)
- WICHELHAUS, T. A., SCHÄFER, V. UND BRADE, V. (2000).** Typisierungsverfahren in der Infektionsepidemiologie. *Chemotherapie Journal*, **9** (2), 93-98.

- WILLIAMS, J. G. K., KUBELIK, A. R. LIVAK, K. J. RAFALSKI, J. A. UND TINGLY, S. V. (1990).** DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.*, **18**, 6531–6535.
- WILLIS, J. UND ROBINSON, J. E. (1988).** *Enterobacter sakazakii* meningitis in neonates. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, **7**, 196-199.
- WOESE, C. R. (1987).** Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.*, **51**, 221-271.
- YAMAMOTO, Y., KOHNO, S., KOGA, H., KAKEYA, H., TOMONO, K., KAKU, M., YAMAZAKI, M. UND HARA, K. (1995).** Random amplified polymorphic DNA analysis of clinically and environmentally isolated *Cryptococcus neoformans* in Nagasaki. *J. Clin. Microbiol.*, **33**, 3328–3332.
- ZOGAJ, X., BOKRANZ, W., NIMTZ, M. UND RÖMLING, U. (2003).** Production of cellulose and curli fimbriae by members of the family *Enterobacteriaceae* isolated from the human gastrointestinal tract. *Infect Immun.*, **71**, 4151-4158.

## 8 ANHANG

**Tabelle 39:** MPN-Tabelle für Verdünnungsreihen mit dreifachem Ansatz

Anzahl der positiven Ergebnisse			MPN Nummer in cfu/100g	Kategorie*)	Vertrauensbereich $\geq 95\%$	
3 x 100 g	3 x 10 g	3 x 1 g				
0	0	0	< 0,30	-	0,00	1,10
0	0	1	0,30	3	0,00	1,10
0	1	0	0,30	2	0,00	1,20
0	2	0	0,62	3	0,08	2,00
1	0	0	0,36	1	0,01	2,00
1	0	1	0,72	2	0,08	2,00
1	1	0	0,74	1	0,09	2,20
1	1	1	1,10	3	0,30	3,60
1	2	0	1,10	2	0,30	3,60
1	2	1	1,50	3	0,30	4,30
1	3	0	1,60	3	0,30	4,30
2	0	0	0,92	1	0,01	3,60
2	0	1	1,40	2	0,30	3,60
2	1	0	1,50	1	0,30	4,30
2	1	1	2,00	2	0,30	4,40
2	2	0	2,10	1	0,30	4,60
2	2	1	2,80	3	0,70	11,10
2	3	0	2,90	3	0,70	11,10
3	0	0	2,30	1	0,30	11,10
3	0	1	3,80	1	0,70	12,10
3	0	2	6,40	3	1,30	20,00
3	1	0	4,30	1	0,70	20,00
3	1	1	7,50	1	1,40	23,00
3	1	2	12,00	3	3,00	37,00
3	2	0	9,30	1	1,60	36,00
3	2	1	15,00	1	3,00	44,00
3	2	2	21,00	2	3,00	47,00
3	2	3	29,00	3	7,00	122,00
3	3	0	24,00	1	4,00	122,0
3	3	1	46,00	1	7,00	235,00
3	3	2	110,00	1	20,00	480,00
3	3	3	> 110,00	-		

\*) **Kategorie 1:**

Am wahrscheinlichsten vorkommende Röhrenkombination. Andere Kombinationen werden mit einer Wahrscheinlichkeit von höchstens 5% erhalten.

**Kategorie 2:**

Weniger wahrscheinlich als in Kategorie 1 vorkommende Röhrenkombination. Andere Kombinationen als in Kategorie 1 und 2 werden mit einer Wahrscheinlichkeit von höchstens 15% erhalten.

**Kategorie 3:**

Noch weniger wahrscheinlich als in Kategorie 2 vorkommende Röhrenkombinationen. Andere Kombinationen als in Kategorie 1 bis 3 werden mit einer Wahrscheinlichkeit von höchstens 0,1% erhalten.

**Tabelle 40:** Ergebnisübersicht zu den untersuchten Isolaten (S. 166 f)

Lfd. Nr.	NCC Code	Stamm	Herkunftsort	Quelle	Oxi-dase	Katalase	Gram	Morphologie <sup>1</sup>	Gelbblig-erueierung auf TSA	AP-Profil 20E	AP-Profil 32E	Biotyp	Lac-tose	Sor-bitol	Citrat	Tween	α-glucosi-dase	ESPM	VIT	BAX	PCR-1	PCR-2	PCR-3	qPCR	PFGE	RAPD M13 Core	RAPD T3B	
1	22	<i>Citrobacter freundii</i>	Unbekannt	Unbekannt	-	+	Stab.-																					
2	36	<i>E. sakazakii</i>	Unbekannt	Unbefidisolat	-	+	Stab.-	groß, glänzend	gelb	34276767210	34276767210	4	+	-	+	+								+				
3	37	<i>E. sakazakii</i>	Unbekannt	Unbefidisolat	-	+	Stab.-	klein, glänzend	gelb	34274767210	34274767210	33	+	-	+	+								+				
4	41	<i>E. sakazakii</i>	Unbekannt	Unbekannt	-	+	Stab.-																					
5	43	<i>E. sakazakii</i>	Unbekannt	Unbefidisolat	-	+	Stab.-	groß, glänzend	gelb	34276763210	34276763210	7	+	-	+	+								+				
6	44	<i>E. sakazakii</i>	Unbekannt	Unbefidisolat	-	+	Stab.-	groß, glänzend	gelb	34276767210	34276767210	4	+	-	+	+								+				
7	45	<i>E. sakazakii</i>	Unbekannt	Unbefidisolat	-	+	Stab.-	groß, glänzend	gelb	34276763200	34276763200	30	+	-	+	+								+				
8	49	<i>E. sakazakii</i>	Unbekannt	Unbefidisolat	-	+	Stab.-	groß, glänzend	gelb	34276763251	34276763251	2	+	-	+	+								+	P2	R3	R1	
9	50	<i>E. sakazakii</i>	Unbekannt	Unbekannt	-	+	Stab.-																					
10	51	<i>Pantoea spp</i>	Unbekannt	Unbekannt	-	+	Stab.-																					
11	52	<i>E. sakazakii</i>	Unbekannt	Unbekannt	-	+	Stab.-	groß, glänzend	gelb																			
12	53	<i>E. sakazakii</i>	Unbekannt	Unbekannt	-	+	Stab.-	groß, glänzend	gelb																			
13	54	<i>E. sakazakii</i>	Unbekannt	Unbekannt	-	+	Stab.-	groß, glänzend	gelb																			
14	55	<i>E. sakazakii</i>	Unbekannt	Unbekannt	-	+	Stab.-	groß, glänzend	gelb																			
15	56	<i>E. sakazakii</i>	Unbekannt	Unbekannt	-	+	Stab.-	groß, glänzend	gelb																			
16	57	<i>E. sakazakii</i>	Unbekannt	Unbekannt	-	+	Stab.-	groß, glänzend	gelb	3305373	34276767250	1	+	-	+	+								+	P15	R1	R2	
17	59	<i>E. sakazakii</i>	I	Unbefidisolat	-	+	Stab.-	groß, glänzend	weiß	3305373	34076763210	18	+	-	+	+								+	P16	R1	R2	
18	60	<i>E. sakazakii</i>	I	Unbefidisolat	-	+	Stab.-	groß, glänzend	weiß	3305373	34276767210	4	+	-	+	+								+	P17	R2	R3	
19	61	<i>Pantoea spp</i>	C	Unbekannt	-	+	Stab.-	groß, glänzend	weiß																			
20	62	<i>E. sakazakii</i>	I	Unbefidisolat	-	+	Stab.-	groß, glänzend	weiß	3305373	34276763250	2	+	-	+	+								+	P17	R2	R3	
21	63	<i>E. cloacae</i>	Unbekannt	Unbekannt	-	+	Stab.-	groß, glänzend	weiß																			
22	64	<i>E. sakazakii</i>	C	Unbekannt	-	+	Stab.-	groß, glänzend	weiß																			
23	65	<i>E. cloacae</i>	Unbekannt	Unbekannt	-	+	Stab.-																					
24	67	<i>E. sakazakii</i>	C	Unbekannt	-	+	Stab.-	groß, glänzend	gelb																			
25	68	<i>E. sakazakii</i>	Unbekannt	Unbekannt	-	+	Stab.-	groß, glänzend	gelb																			
26	70	<i>E. sakazakii</i> /ATCC29544	Referenzstamm	Referenzstamm	-	+	Stab.-	groß, glänzend	gelb																			
27	71	<i>E. sakazakii</i>	C	Unbefidisolat	-	+	Stab.-	groß, glänzend	gelb																			
28	72	<i>E. sakazakii</i>	C	Unbefidisolat	-	+	Stab.-	groß, glänzend	gelb																			
29	73	<i>E. sakazakii</i>	C	Unbefidisolat	-	+	Stab.-	groß, glänzend	gelb																			
30	74	<i>E. sakazakii</i>	D	Anfangsnahrung	-	+	Stab.-	groß, glänzend	gelb	34276767250	34276767250	1	+	-	+	+								+				
31	75	<i>E. sakazakii</i>	B	Anfangsnahrung	-	+	Stab.-	groß, glänzend	gelb	34276363040	34276363040	34	+	-	+	+								+				
32	76	<i>E. sakazakii</i>	E	Anfangsnahrung	-	+	Stab.-	groß, glänzend	gelb	34276363010	34276363010	28	+	-	+	+								+				
33	77	<i>E. sakazakii</i>	D	Anfangsnahrung	-	+	Stab.-	groß, glänzend	weiß	3305173	34276363250	10	+	-	+	+								+				
34	78	<i>E. sakazakii</i>	C	Anfangsnahrung	-	+	Stab.-	groß, glänzend	gelb	3305173	34276363250	2	+	-	+	+								+	P4	R10	R4	
35	79	<i>E. sakazakii</i>	C	Anfangsnahrung	-	+	Stab.-	groß, glänzend	gelb	3305373	34276767050	3	+	-	+	+								+	P36	R4	R5	
36	80	<i>E. sakazakii</i>	C	Anfangsnahrung	-	+	Stab.-	groß, glänzend	gelb	3305173	34276767050	3	+	-	+	+								+	P36	R4	R6	
37	81	<i>E. sakazakii</i>	C	Anfangsnahrung	-	+	Stab.-	groß, glänzend	hellgelb	3305173	34276767050	3	+	-	+	+								+	P37	R4	R7	
38	82	<i>E. sakazakii</i>	B	Anfangsnahrung	-	+	Stab.-	groß, glänzend	gelb	3305373	34276767250	1	+	-	+	+								+	P2	R3	R7	
39	83	<i>E. sakazakii</i>	H	Anfangsnahrung	-	+	Stab.-	groß, glänzend	gelb	3305173	34276763250	2	+	-	+	+								+	P18	R12	R8	
40	84	<i>E. sakazakii</i>	I	Anfangsnahrung	-	+	Stab.-	groß, glänzend	hellgelb	3305373	34276367050	6	+	-	+	+								+	P19	R13	R9	
41	85	<i>Pantoea spp 1</i>	D	Anfangsnahrung	-	+	Stab.-																					
42	86	<i>Pantoea spp</i>	J	Anfangsnahrung	-	+	Stab.-																					
43	87	<i>K. pneumoniae</i>	E	Anfangsnahrung	-	+	Stab.-																					
44	88	<i>E. sakazakii</i>	E	Anfangsnahrung	-	+	Stab.-	groß, glänzend	hellgelb	3305173	34276763250	2	+	-	+	+								+	P12	R5	R10	
45	89	<i>E. sakazakii</i>	E	Anfangsnahrung	-	+	Stab.-	klein, glänzend	hellgelb	3305173	34576761250	23	+	-	+	+								+	P1	R4	R11	
46	90	<i>E. sakazakii</i>	E	Anfangsnahrung	-	+	Stab.-	groß, glänzend	weiß	3305173	34276763250	2	+	-	+	+								+	P1	R5	R11	
47	91	<i>E. sakazakii</i>	E	Anfangsnahrung	-	+	Stab.-	klein, glänzend	hellgelb	3305173	37276763050	36	+	-	+	+								+	P1	R5	R11	
48	92	<i>E. sakazakii</i>	E	Anfangsnahrung	-	+	Stab.-	klein, glänzend	hellgelb															+				
49	93	<i>E. sakazakii</i>	E	Anfangsnahrung	-	+	Stab.-	klein, glänzend	hellgelb	3305173	75276763250	27	+	-	+	+								+	P1	R5	R11	
50	94	<i>E. sakazakii</i>	E	Anfangsnahrung	-	+	Stab.-	klein, glänzend	hellgelb	3305173	36276763250	25	+	-	+	+								+	P1	R5	R11	
51	95	<i>E. sakazakii</i>	E	Anfangsnahrung	-	+	Stab.-	klein, glänzend	hellgelb	3305173	34076763040	16	+	-	+	+								+	P1	R5	R11	
52	96	<i>E. sakazakii</i>	E	Anfangsnahrung	-	+	Stab.-	groß, glänzend	hellgelb	3305173	34274763040	21	+	-	+	+								+	P1	R5	R11	
53	97	<i>E. sakazakii</i>	E	Anfangsnahrung	-	+	Stab.-	groß, glänzend	hellgelb	3305173	34274763050	22	+	-	+	+								+	P13	R15	R12	
54	98	<i>E. sakazakii</i>	E	Anfangsnahrung	-	+	Stab.-	groß, glänzend	hellgelb	3305173	34276763040	9	+	-	+	+								+	P1	R16	R13	
55	99	<i>E. sakazakii</i>	E	Anfangsnahrung	-	+	Stab.-	groß, glänzend	hellgelb	3305173	34076763050	17	+	-	+	+								+	P1	R5	R14	











Lfd. Nr.	NCC Code	Stamm	Herkunftsort	Quelle	Oxidase	Katalase	Gram	Morphologie*	Gelbplgml. entt. auf TSA	API-Profil 20E	API-Profil 32E	Biotyp	Lactose	Sorbitol	Citrat	Tween	α-glucosidase	ESIA	DFI	ESPM	VIT	BAX	PCR-1	PCR-2	PCR-3	qPCR	PFGE	RAPD M13 Core	RAPD T3B		
385	943	<i>E. sakazakii</i>	Q	Umfeldisolat	-	+	Stäb. -				34276767250	1					+														
386	944	<i>E. sakazakii</i>	Q	Umfeldisolat	-	+	Stäb. -				34276767250	1					+														
387	945	<i>E. sakazakii</i>	Q	Umfeldisolat	-	+	Stäb. -				34276767250	1					+														
388	946	<i>E. sakazakii</i>	Q	Umfeldisolat	-	+	Stäb. -				34276767050	3					+														
389	947	<i>E. sakazakii</i>	Q	Umfeldisolat	-	+	Stäb. -				34276763210	7					+														

+ positiv; - negativ; s+ schwach positiv;

\* Morphologie der Kolonien auf Trypton Soya Agar

Herkunftsort: Isolate aus Europa (A-E; G-L; N-R) ; Isolate aus Süd-Ost-Asien (M); Isolate aus Asien (S)

PCR-1 nach STEPHAN *et al.* (2005); PCR-2 nach HASSAN *et al.* (2004); PCR-3 nach SEO und BRACKETT *et al.* (2005);

ESIA: Inkubationstemperatur 44°C (Typische Kolonien:blau Kolonien; Untypische Kolonien:rosa Kolonien);

DFI: Inkubationstemperatur 37°C (Typische Kolonien:blau-grüne Kolonien; Untypische Kolonien: weiße, pinkfarbene, gelbe oder schwarzbraune Kolonien);

ESPM: Inkubationstemperatur 37°C (Typische Kolonien: schwarz-blaue Kolonien; Untypische Kolonien: weiße, grüne Kolonien);

α-Glucosidase: Test nach 4 h (positiv: gelb; negativ: klar)

## DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit wurde, in der Abteilung Mikrobiologie der Central Laboratories Friedrichsdorf GmbH, angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Sylvia Schnell vom Institut für Angewandte Mikrobiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen und Herrn Prof. Dr. Walther Heeschen, Fachtierarzt für Pharmakologie und Toxikologie für die Überlassung des sehr interessanten und spannenden Themas, der guten Betreuung, der Hilfsbereitschaft und der fachlichen Beratung während des Schreibens meiner Arbeit. Zudem danke ich Herrn Prof. Clemens Kunz für die Übernahme des Drittgutachtens.

Meinem Mentor Dr. Matthias Fischer, Manager Microbiology CLF GmbH danke ich für die Initiative zum Anstoß dieser Arbeit, sowie den fruchtbaren Diskussionen und Anregungen.

Herrn Dr. Christian Mahr, Managing Director CLF GmbH, danke ich für die jederzeit gewährte freundliche Unterstützung und die Schaffung der notwendigen Freiräume meine Arbeit im CLF durchführen zu können. Darüber hinaus danke ich den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Microbiology Division CLF GmbH.

Prof. Seamus Fanning, Dr. Patrick Wall, Dr. Denise Drudy, Niall Mullane und allen Mitarbeitern des Centre for Food Safety des University College Dublin meinen herzlichsten Dank für Unterstützung und vor allem für die schöne und erfolgreiche Zeit bei der Durchführung meiner Forschungsarbeiten in Dublin.

Professor Usleber, Dr. Ömer Akineden, Dr. Abdulwahed A. Hassan und Claudia Kress vom Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde, Professur für Milchwissenschaften der Justus-Liebig-Universität Giessen, danke ich für die tolle Zusammenarbeit und der gewährten Möglichkeit meine Untersuchungen an dem Institut durchführen zu können.

Insbesondere bedanke ich mich bei Frau Dr. Claudia Benholz und Herrn Dr. Andreas Seidel, für die freundschaftliche Unterstützung bei der Korrektur und für die wertvollen Vorschläge zur Verbesserung des Manuskripts.

Weiterhin danke ich Idriss Ibn Zaid für seine hervorragende Hilfe bei der Bildbearbeitung und Formatierung der Arbeit.

Ganz besonderer Dank gilt meinen lieben Eltern, Geschwistern und meinem Mann Ahmad für ihre Liebe, ihr offenes Ohr, ihre Geduld und ihren unermüdlichen Zuspruch während der ganzen Zeit. Ich bin meiner Familie und meinem Mann zu tiefst verbunden, weil sie mir mit ihrer Liebe und Wärme Rückhalt in jeder Lebenslage gegeben hat.

## **Eidesstattliche Erklärung**

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Gießen, den 11 Juli 2007

.....  
(Suhad Sanjaq)

---

# Lebenslauf

---

## Persönliche Daten

Name	Suhad Sanjaq
Geburtsdatum	05 Januar 1978
Geburtsort	Essen
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	verheiratet

---

## Schulbildung

1984 - 1988	Grundschule Dürerschule in Essen
1988 - 1997	Mädchengymnasium Borbeck in Essen
06/1997	Allgemeine Hochschulreife

---

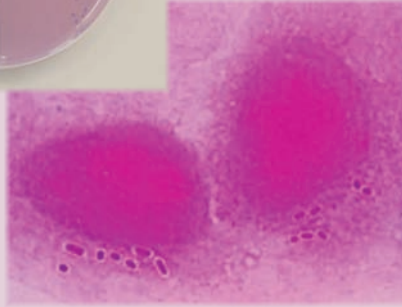
## Studium

10/1997 – 03/2003	<b>Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn</b> Studium der Ernährungs- und Haushaltswissenschaften. Diplomarbeit am Institut für Ernährungs- und Lebensmittelwissenschaften: Lebensmittel-Mikrobiologie und Hygiene in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. J. Krämer. Thema: Zearalenon - Wirkung und Bedeutung auf Mensch und Tier
-------------------	---

---

## Berufliche Tätigkeit

06/2002 - 12/2002	<b>Landwirtschaftliche Untersuchungs- und Forschungsanstalt Bonn (LUFA)</b> Angestellte im Fachbereich Organische Chemie
seit 04/2003	<b>Central Laboratories Friedrichsdorf GmbH (CLF)</b> Wissenschaftliche Mitarbeiterin Microbiology & Biochemistry Division
seit 04/2004	<b>Central Laboratories Friedrichsdorf GmbH (CLF)</b> Promotion mit Anbindung an das Institut für angewandte Mikrobiologie der Justus-Liebig-Universität Giessen in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Sylvia Schnell. Thema: <i>Enterobacter sakazakii</i> - Risikoprofil und Untersuchungen zum Nachweis in Säuglingsnahrungen



édition scientifique  
**VB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5244-7



9 783835 195244 7

