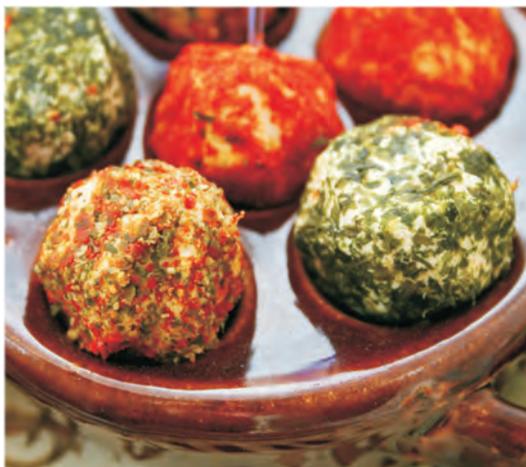


UNTERSUCHUNGEN ZUR MIKROBIOLOGISCHEN QUALITÄT VON FRISCHKÄSE VERSCHIEDENER HERSTELLUNGSWEISEN

VANESSA FRANZEN



INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
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 2009

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.

1st Edition 2009

© 2009 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde
Professur für Milchwissenschaften
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: Prof. Dr. Dr. habil. E. Usleber

Untersuchungen zur mikrobiologischen Qualität von Frischkäse verschiedener Herstellungsweisen

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Vanessa Franzen

Tierärztin aus Bonn

Gießen 2009

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. habil. Georg Baljer

Gutachter: Prof. Dr. Dr. habil. E. Usleber

Prof. Dr. C. Lämmler

Tag der Disputation: 2. April 2009

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG.....	1
2	LITERATURÜBERSICHT.....	2
2.1	Frischkäse.....	2
2.1.1	Allgemeines zu Frischkäse	2
2.1.2	Herstellung von Frischkäse	4
2.1.3	Wirtschaftliche Aspekte	8
2.2	<i>Enterobacteriaceae, Escherichia coli</i> und coliforme Keime	10
2.2.1	<i>Enterobacteriaceae</i> und coliforme Keime	10
2.2.1.1	Systematik	10
2.2.1.2	Allgemeine Charakterisierung.....	11
2.2.1.2.1	Morphologie, kulturelle und biochemische Eigenschaften	11
2.2.1.2.2	Wachstumseigenschaften	11
2.2.1.3	Vorkommen und Bedeutung.....	12
2.2.1.3.1	Vorkommen und Bedeutung in Milch.....	13
2.2.1.3.2	Vorkommen und Bedeutung in Frischkäse	15
2.2.2	<i>Escherichia coli</i>	19
2.2.2.1	Allgemeine Charakterisierung.....	19
2.2.2.1.1	Morphologie, kulturelle und biochemische Eigenschaften	19
2.2.2.1.2	Wachstumseigenschaften	19
2.2.2.1.3	Vorkommen und Bedeutung.....	20
2.2.2.2	<i>E. coli</i> als Krankheitserreger	21
2.2.2.3	Lebensmittelinfektionen durch pathogene <i>E. coli</i> in Milch und Frischkäse	23
2.2.2.4	Vorkommen und Bedeutung von <i>E. coli</i> in Milch und Frischkäse	25
2.2.3	Rechtliche Grundlagen für <i>Enterobacteriaceae</i> , coliforme Keime und <i>E. coli</i> .	29
2.2.4	Nachweis von <i>Enterobacteriaceae</i> , coliformen Keimen und <i>E. coli</i> unter Verwendung von selektiven Nährmedien	32
2.3	<i>Listeria monocytogenes</i>	34
2.3.1	Systematik	34
2.3.2	Allgemeine Charakterisierung.....	34
2.3.2.1	Morphologie, kulturelle und biochemische Eigenschaften	34

2.3.2.2	Vorkommen und Wachstumseigenschaften	35
2.3.3	<i>Listeria monocytogenes</i> als Krankheitserreger.....	36
2.3.4	Listerien in Lebensmitteln	38
2.3.5	Vorkommen und Bedeutung von <i>L. monocytogenes</i> in Milch und Milcherzeugnissen	41
2.3.6	Vorkommen und Bedeutung von <i>L. monocytogenes</i> in Frischkäse.....	43
2.3.7	Rechtliche Grundlagen	48
2.4	<i>Staphylococcus aureus</i>	49
2.4.1	Systematik	49
2.4.2	Allgemeine Charakterisierung.....	49
2.4.2.1	Morphologie, kulturelle und biochemische Eigenschaften	49
2.4.2.2	Vorkommen und Wachstumseigenschaften	50
2.4.2.3	Virulenzfaktoren.....	51
2.4.3	<i>S. aureus</i> als Krankheitserreger.....	53
2.4.4	Vorkommen und Bedeutung von <i>S. aureus</i> in Milch und Frischkäse.....	54
2.4.5	Rechtliche Grundlagen	60
3	MATERIAL UND METHODEN.....	62
3.1	Materialien	62
3.1.1	Probenmaterial.....	62
3.1.2	Nährmedien und Reagenzien.....	65
3.1.3	Laborgeräte und Verbrauchsmaterial	67
3.1.4	Primer	70
3.1.5	Bakterien-Referenzstämme	70
3.2	Methoden.....	71
3.2.1	Probennahme	71
3.2.2	Spezifische Untersuchungsverfahren	72
3.2.3	Qualitativer Nachweis und Identifizierung von <i>Enterobacteriaceae</i>	72
3.2.4	Quantitative Bestimmung von coliformen Keimen bzw. <i>Escherichia coli</i>	75
3.2.5	Qualitativer Nachweis von <i>Listeria monocytogenes</i>	79
3.2.6	Quantitative Bestimmung von Koagulase-positiven Staphylokokken.....	82
3.2.7	Molekularbiologische Charakterisierung der <i>Escherichia coli</i> -Isolate mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)	84
3.2.7.1	Nukleinsäureaufbereitung und -extraktion	84

3.2.7.2	Amplifikation der Nukleinsäuresequenz mittels spezifischer Primer durch die Polymerasekettenreaktion (PCR)	84
3.2.7.3	Nachweis der spezifischen PCR-Produkte	86
4	ERGEBNISSE.....	87
4.1	Übersicht der Untersuchungsergebnisse	87
4.2	Ergebnisse der pH-Wert-Messung.....	88
4.3	Methodenvergleich	89
4.3.1	Verwendung von ECC-Agar als alternatives Selektivnährmedium zum VRBG-Agar zum Nachweis von <i>Enterobacteriaceae</i>	89
4.3.2	Vergleich des Einsatzes von LST-MUG-Bouillon, VRB-MUG-Agar und ECC-Agar zur quantitativen Bestimmung von coliformen Keimen	92
4.3.3	Vergleich des Einsatzes von LST-MUG-Bouillon, VRB-MUG-Agar und ECC-Agar zur quantitativen Bestimmung von <i>E. coli</i>	97
4.3.4	Unterdrückung der Begleitflora bei Einsatz von LST-MUG-Bouillon, VRB-MUG-Agar und ECC-Agar	99
4.3.5	Methodenabhängige Unterschiede bei Voranreicherung und Direktbeimpfung für den Nachweis von <i>Enterobacteriaceae</i>	100
4.4	Qualitativer Nachweis von <i>Enterobacteriaceae</i>	104
4.5	Quantitative Bestimmung von coliformen Keimen bzw. <i>E. coli</i>	106
4.6	Nachweishäufigkeit isolierter <i>Enterobacteriaceae</i>-Spezies	110
4.7	Qualitativer Nachweis von <i>Listeria monocytogenes</i>	115
4.8	Quantitative Bestimmung Koagulase-positiver Staphylokokken	115
4.9	Molekularbiologische Charakterisierung der <i>E. coli</i>-Isolate mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)	116
4.10	Veränderung des Gehalts an <i>Enterobacteriaceae</i> in Frischkäse während einer Lagerung von sieben Tagen	118
5	DISKUSSION.....	120
5.1	Methodische Aspekte beim Nachweis von <i>Enterobacteriaceae</i> in Frischkäse.....	120
5.1.1	ECC-Agar als alternatives Selektivnährmedium zum VRBG-Agar	120

5.1.2	Vergleich des Einsatzes von LST-MUG-Bouillon, VRB-MUG-Agar und ECC-Agar zur quantitativen Bestimmung von coliformen Keimen bzw. <i>E. coli</i>	121
5.1.3	Methodenabhängige Unterschiede bei Voranreicherung und Direktbeimpfung für den Nachweis von <i>Enterobacteriaceae</i>	125
5.2	Mikrobiologische Qualität von Frischkäse	126
5.2.1	<i>Enterobacteriaceae</i> und coliforme Keime	126
5.2.2	<i>Escherichia coli</i>	128
5.2.3	Rechtliche Bewertung der Befunde für <i>Enterobacteriaceae</i>	129
5.2.4	Qualitativer Nachweis von <i>L. monocytogenes</i>	131
5.2.5	Quantitative Bestimmung Koagulase-positiver Staphylokokken.....	133
5.3	Schlussfolgerungen	134
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	136
7	SUMMARY	138
8	LITERATURVERZEICHNIS	140
9	ANHANG.....	168
10	DANKSAGUNG	183

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1:	Typische Zusammensetzung von Magerquark	3
Tabelle 2.2:	Typische Zusammensetzung von Frischkäse unterschiedlichen Fettgehalts.	4
Tabelle 2.3:	Untersuchungen zum Keimgehalt unbehandelter Gewürze (KbE/g) (BUCKENHÜSKES, 2004)	6
Tabelle 2.4:	Milchwirtschaftlich bedeutsame <i>Enterobacteriaceae</i> (RIEMELT <i>et al.</i> , 1996)	10
Tabelle 2.5:	Vorkommen von <i>Enterobacteriaceae</i> bzw. coliformen Keimen in Rohmilch (Bestandsmilch)	14
Tabelle 2.6:	Vorkommen von <i>Enterobacteriaceae</i> bzw. coliformen Keimen in Frischkäse	16
Tabelle 2.7:	Enteropathogene <i>E. coli</i> (ZANGERL, 2006b; KAPER <i>et al.</i> , 2004)	21
Tabelle 2.8:	Lebensmittelinfektionen mit VTEC durch Milch und Frischkäse	24
Tabelle 2.9:	Vorkommen von <i>E. coli</i> bzw. VTEC in Bestandsmilch (Kuhmilch)	26
Tabelle 2.10:	Untersuchungen zum Vorkommen von <i>E. coli</i> und VTEC in Frischkäse ...	27
Tabelle 2.11:	Grenzwerte (KbE/g) für <i>E. coli</i> in Käse gemäß VO (EG) Nr. 2073/2005 (Prozesshygienekriterium)	30
Tabelle 2.12:	Beurteilungskriterien (KbE/g) für <i>E. coli</i> in Frischkäse gemäß den Empfehlungen 2004/24/EG und 2005/175/EG	31
Tabelle 2.13:	Ausbrüche lebensmittelbedingter Listeriosen beim Menschen (McLAUHLIN <i>et al.</i> , 2004; JEMMI und STEPHAN, 2006; SWAMINATHAN und GERNER-SMIDT, 2007)	40
Tabelle 2.14:	Vorkommen von <i>L. monocytogenes</i> in Rohmilch (Kuhmilch)	42
Tabelle 2.15:	Untersuchungen zum Vorkommen von <i>L. monocytogenes</i> in Frischkäse ...	46
Tabelle 2.16:	Wachstum von <i>L. monocytogenes</i> in Frischkäse während der Lagerung (zitiert nach: FDA, 2003)	47
Tabelle 2.17:	Kriterien für <i>L. monocytogenes</i> gemäß VO (EG) Nr. 2073/2005 (Lebensmittelsicherheitskriterium)	48

Tabelle 2.18: Wachstumseigenschaften von <i>S. aureus</i> und Faktoren für die Enterotoxin-Bildung, modifiziert nach TATINI (1973), CROWTHER und HOLBROOK (1980), BAIRD-PARKER (1990), ICMSF (1996) (zitiert nach: SCVPH, 2003a).....	50
Tabelle 2.19: Lebensmittel-Intoxikationen durch Staphylokokken-Enterotoxine in Milch und Milcherzeugnissen (RKI, 1999; DE BUYSER <i>et al.</i> , 2001; SIMEÃO DO CARMO <i>et al.</i> , 2002; ASAO <i>et al.</i> , 2003)	55
Tabelle 2.20: Untersuchungen zum Vorkommen von <i>S. aureus</i> in Rohmilch	57
Tabelle 2.21: Untersuchungen zum Vorkommen von <i>S. aureus</i> in Frischkäse.....	59
Tabelle 2.22: Grenzwerte (KbE/g) für Koagulase-positive Staphylokokken gemäß VO (EG) Nr. 2073/2005 (Prozesshygienekriterium).....	61
Tabelle 3.1: Übersicht zu Vermarktungs- und Angebotsformen sowie zu Herstellungsweisen der untersuchten Frischkäse bzw. Frischkäsezubereitungen.....	63
Tabelle 3.2: Aufführung der verwendeten Bakterien-Referenzstämme (ohne VTEC) ...	70
Tabelle 3.3: Aufführung der verwendeten Bakterien-Referenzstämme für VTEC.....	71
Tabelle 3.4: Auflistung der in Anlehnung angewandten Methoden.....	72
Tabelle 3.5: Reaktionen zur Bestimmung von <i>Listeria spp.</i> gemäß L 00.00-32.....	80
Tabelle 3.6: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes zur Durchführung der PCR	85
Tabelle 3.7: Übersicht der verwendeten Oligonukleotidprimer zur Durchführung der PCR.....	85
Tabelle 3.8: Temperatur-Zeit-Profil zur DNA-Amplifikation.....	86
Tabelle 4.1: Häufigkeit positiver Befunde für die geprüften mikrobiologischen Parameter in Frischkäse, differenziert nach Vermarktungs- und Angebotsform	87
Tabelle 4.2: Vergleich der ermittelten Keimgehalte (KbE/g) für coliforme Keime in Frischkäse (n = 125) unter Verwendung von LST-MUG-Bouillon und VRB-MUG-Agar	93

Tabelle 4.3:	Vergleich der ermittelten Keimgehalte (KbE/g) für coliforme Keime in Frischkäse (n = 125) unter Verwendung von LST-MUG-Bouillon und ECC-Agar	94
Tabelle 4.4:	Vergleich der ermittelten Keimgehalte (KbE/g) für coliforme Keime in Frischkäse (n = 125) unter Verwendung von VRB-MUG-Agar und ECC-Agar.....	95
Tabelle 4.5:	Ermittelte Keimgehalte (KbE/g) für <i>E. coli</i> unter Verwendung von LST-MUG-Bouillon, VRB-MUG-Agar und ECC-Agar	97
Tabelle 4.6:	Übersicht der Begleitflora bei Einsatz von LST-MUG-Bouillon, VRB-MUG-Agar und ECC-Agar zur quantitativen Bestimmung von coliformen Keimen	99
Tabelle 4.7:	Enterobacteriaceen-Begleitflora beim Nachweis von <i>E. coli</i> in Abhängigkeit von den verwendeten Untersuchungsmethoden.....	103
Tabelle 4.8:	Qualitativer Nachweis von <i>Enterobacteriaceae</i> in Frischkäse bzw. Frischkäsezubereitungen in Abhängigkeit von Angebotsform, Herstellungsweise, Vermarktungsform und Hauptzutat	105
Tabelle 4.9:	Nachweishäufigkeit von coliformen Keimen (quantitative Bestimmung) in Frischkäse bzw. Frischkäsezubereitungen in Abhängigkeit von Angebotsform, Herstellungsweise, Vermarktungsform und Hauptzutat	107
Tabelle 4.10:	Absolute und relative Häufigkeit der ermittelten Keimgehalte (KbE/g) für coliforme Keime in Frischkäse bzw. Frischkäsezubereitungen (Nachweisgrenze $3,0 \times 10^0$ KbE/g).....	109
Tabelle 4.11:	Zusammenhang zwischen dem Vorkommen einzelner <i>Enterobacteriaceae</i> -Gattungen in Frischkäse und der Anzahl verschiedener Gattungen je Probe	112
Tabelle 4.12:	Vergesellschaftung von <i>Enterobacteriaceae</i> verschiedener Gattungen in Frischkäse bzw. Frischkäsezubereitungen	113
Tabelle 4.13:	Qualitativer Nachweis von <i>Listeria innocua</i> in drei Frischkäsezubereitungen.....	115

Tabelle 4.14: Ermittelte Keimgehalte (KbE/g) für coliforme Keime und pH-Werte in fünf Frischkäsezubereitungen während einer Lagerungszeit von sieben Tagen.....	118
Tabelle 4.15: Nachgewiesene <i>Enterobacteriaceae</i> -Spezies in fünf Frischkäsezubereitungen während einer Lagerungszeit von sieben Tagen	119
Tabelle 9.1: Einzelergebnisse für die aus Frischkäse isolierten <i>Enterobacteriaceae</i> -Spezies (Qualitative (3.2.3) und quantitative Untersuchung (3.2.4) zusammengefasst)	168
Tabelle 9.2: Einzelergebnisse aus der quantitativen Bestimmung von coliformen Keimen in Frischkäse und Frischkäsezubereitungen.....	176

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der Frischkäse-Herstellung nach STAFF (1998)	7
Abbildung 2.2: Entwicklung des Käsemarktes und Anteil der Frischkäse-Produktion in Deutschland (MILCHINDUSTRIE-VERBAND, 2007)	8
Abbildung 3.1: Übersicht zur Gruppierung der Frischkäse bzw. Frischkäsezubereitungen auf Basis ihrer Hauptzutat	64
Abbildung 3.2: Schematische Darstellung der Untersuchungsschritte zum qualitativen Nachweis und zur Identifizierung von <i>Enterobacteriaceae</i> in Anlehnung an DIN EN ISO 21528-1:2004	74
Abbildung 3.3: Schematische Darstellung der Untersuchungsschritte zur quantitativen Bestimmung von coliformen Keimen bzw. <i>E. coli</i> in Anlehnung an die Methoden L 01.00-54 und L 01.00-3 nach § 64 LFGB	78
Abbildung 3.4: Schematische Darstellung der Untersuchungsschritte zum qualitativen Nachweis von <i>Listeria monocytogenes</i> in Anlehnung an die Methode L 00.00-32 nach § 64 LFGB	81
Abbildung 3.5: Schematische Darstellung der Untersuchungsschritte zur quantitativen Bestimmung von Koagulase-positiven Staphylokokken in Anlehnung an die Methode L 00.00-55 nach § 64 LFGB	83
Abbildung 4.1: Zusammenhang zwischen pH-Wert der Frischkäse(zubereitungen) und der Kontaminationshäufigkeit mit <i>Enterobacteriaceae</i> (qualitativer Nachweis, s 3.2.3) bzw. coliformen Keimen (quantitative Bestimmung, s. 3.2.4)	89
Abbildung 4.2: Vergleich der Nachweishäufigkeit der beim qualitativen Nachweis unter Verwendung von VRBG- bzw. ECC-Agar isolierten <i>Enterobacteriaceae</i> -Spezies.....	90
Abbildung 4.3: Vergleich der Nachweishäufigkeit der bei der quantitativen Bestimmung isolierten Coliformen-Spezies unter Verwendung von LST-MUG-Bouillon, VRB-MUG- bzw. ECC-Agar.....	96

Abbildung 4.4: Ergebnisse nach Voranreicherung und nach direkter Beimpfung der Nährmedien für die Nachweishäufigkeit einzelner <i>Enterobacteriaceae</i> -Spezies.....	102
Abbildung 4.5: Absolute Häufigkeit der Co-Kontamination von Frischkäse mit <i>Enterobacteriaceae</i> -Spezies verschiedener Gattungen.....	111
Abbildung 4.6: Absolute Nachweishäufigkeit verschiedener <i>Enterobacteriaceae</i> -Spezies in Frischkäse bzw. Frischkäsezubereitungen.....	114
Abbildung 4.7: Ergebnis der Amplifikation des <i>stx</i> -Genabschnitts der <i>E. coli</i> -Isolate 1-24	117
Abbildung 4.8: Ergebnis der Amplifikation des <i>stx</i> -Genabschnitts der <i>E. coli</i> -Isolate 25-48	117

Abkürzungsverzeichnis

Aqua dest	Aqua destillata
ASUV	Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren
ATCC	American Type Culture Collection, Manassas, USA
a_w	Activity of water (Wasseraktivität)
Bp	Basenpaar(e)
CAMP	Christie-Atkins-Munch-Petersen
DIN	Deutsches Institut für Normung, Berlin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>et al.</i>	et alii (und Mitarbeiter)
Fa.	Firma
ISO	International Organization for Standardization
KbE	Kolonie bildende Einheit(en)
KOH	Kalilauge
LFGB	Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
mmol/l	Millimol pro Liter
MPN	Most Probable Number
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
PCR	Polymerasekettenreaktion
sp./spp.	Spezies (Singular/Plural)
ssp.	Subspezies
<i>stx</i>	Shigatoxin-Gen
Stx	Shigatoxin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
<i>Taq</i>	Thermus aquaticus
UV	Ultraviolett
VT	Verotoxin
VTEC	Verotoxin-bildende <i>Escherichia coli</i>

1 EINLEITUNG

In den letzten Jahren hat die Käseproduktion in Deutschland kontinuierlich zugenommen. Frischkäse zählt zu den beliebtesten Käseerzeugnissen, rund ein Drittel des gesamten Käsemarktes entfällt auf dieses Produktsegment. Eine besonders große Vielfalt ist durch die Herstellung von Frischkäsezubereitungen unter Verwendung verschiedenster Zutaten (Gewürze, Kräuter, Früchte oder Gemüse) gegeben. Daher können zahlreiche Faktoren zu einer mikrobiellen Kontamination von Frischkäse beitragen.

Ziel dieser Arbeit war es, einen Überblick über die mikrobiologische Beschaffenheit von Frischkäse bzw. Frischkäsezubereitungen insbesondere des regionalen hessischen Marktes zu erhalten. Dazu wurden Frischkäse ökologischer und konventioneller Produktionsweise sowie verschiedener Vermarktungs- und Angebotsformen auf das Vorkommen von *L. monocytogenes* sowie auf das Vorkommen von Hygienemarkern (*Enterobacteriaceae*, coliforme Keime und Koagulase-positive Staphylokokken) untersucht.

Im Hinblick auf die Anforderungen des EU-Lebensmittelhygienerechts (VO (EG) Nr. 2073/2005) und den damit einhergehenden Änderungen im Vergleich zu den bisherigen Regelungen standen der Nachweis von *Enterobacteriaceae* und von coliformen Keimen im Mittelpunkt dieser Arbeit. Hierbei sollte unter anderem überprüft werden welche Unterschiede zwischen diesen beiden Untersuchungsparametern bezüglich der Beurteilung der mikrobiologischen Qualität von Frischkäse bestehen. Zudem sollte die Eignung verschiedener Untersuchungsmethoden unter Einbeziehung alternativer Nährmedien für den Nachweis von *Enterobacteriaceae* bzw. coliformen Keimen geprüft werden.

2 LITERATURÜBERSICHT

2.1 Frischkäse

2.1.1 Allgemeines zu Frischkäse

Käse sind frische oder in verschiedenen Graden der Reife befindliche Erzeugnisse, die aus dickgelegter Käsereimilch hergestellt werden (KÄSEV, § 1). Gemäß Käseverordnung (§ 6) sind Frischkäse solche Käse, die in der fettfreien Käsemasse einen Wassergehalt (Wff) von mehr als 73 % aufweisen. Frischkäsezubereitungen sind Frischkäse, die unter Verwendung von bis zu 30 % Früchten bzw. Fruchterzeugnissen oder Gemüse bzw. Gemüseerzeugnissen oder unter Verwendung von bis zu 15 % anderer Lebensmittel hergestellt werden. Der Gewichtsanteil des Frischkäses muss bei allen Zubereitungen mindestens 50 % betragen (KÄSEV, § 4). Frischkäse wird aus roher oder pasteurisierter Milch hergestellt, die durch natürlich vorkommende Milchsäurebakterien oder wie in den meisten Fällen durch Zugabe von Starterkulturen dickgelegt wird. Der pH-Wert liegt in der Regel bei weniger als 5,0. Frischkäse ist unmittelbar nach der Herstellung ohne Durchlaufen einer Reifeperiode verzehrfertig. Bei gekühlter Lagerung beträgt die Haltbarkeit fünf bis 30 Tage (SCVPH, 2003a). Es können acht verschiedene Fettgehaltsstufen unterschieden werden (KÄSEV, § 5):

- **Magerstufe** mit weniger als 10 % Fett in der Trockenmasse (i. Tr.)
- **Viertelfettstufe** mit mindestens 10 % Fett i. Tr.
- **Halbfettstufe** mit mindestens 20 % Fett i. Tr.
- **Dreiviertelfettstufe** mit mindestens 30 % Fett i. Tr.
- **Fettstufe** mit mindestens 40 % Fett i. Tr.
- **Vollfettstufe** mit mindestens 45 % Fett i. Tr.
- **Rahmstufe** mit mindestens 50 % Fett i. Tr.
- **Doppelrahmstufe** mit mindestens 60 % und höchstens 87 % Fett i. Tr.

Zu den Standard-Frischkäsesorten gehören Speisequark, Schichtkäse, Rahmfrischkäse und Doppelrahmfrischkäse. Sie werden aus (entrahmter) Milch oder Sahne hergestellt. **Speisequark** hat einen milchigweißen bis rahmgelben Farbton (je nach Fettgehalt) und dabei eine gleichmäßig weiche, zart-geschmeidige bis pastenartige Teigbeschaffenheit.

Zugesetzte Sahne ist in der ganzen Teigmasse gleichmäßig verteilt enthalten. Geruch und Geschmack sind leicht rein milchsauer. **Schichtkäse** hat ebenfalls einen milchigweißen bis rahmgelben Farbton. Die Schnittfläche des Teiges ist matt-glänzend und im Inneren sind die verschiedenen Schichten erkennbar, wobei gelbliche Schichten fettreicher sind als hellere Schichten. Der Teig hat eine zart-geschmeidige und formfeste Beschaffenheit und weist nur wenige Bruchlöcher auf. Geruch und Geschmack eines Schichtkäses sind rein milchsauer. **Rahm- und Doppelrahmfrischkäse** haben einen milchigweißen bis schwachgelben Farbton. Der Teig ist pastenartig und streichfähig ohne Lochung. Geruch und Geschmack sind leicht feinsäuerlich (KÄSEV, Anlage 1). „**Cottage Cheese**“ ist ein Frischkäse, der eine körnige Struktur aufweist. Zur Herstellung dieses Käses wird die Gallerte in Würfel geschnitten, nochmals erwärmt und gerührt, bis die Molke ausgetreten ist und sich die gewünschte Korntextur und Festigkeit eingestellt hat. Nach mehreren Waschschritten mit Wasser abnehmender Temperatur werden die Körner mit einem Dressing aus Sahne und Salz vermischt (KESSLER, 1988). Neben den genannten Frischkäsen existiert noch eine Vielzahl weiterer Sorten.

Die typische Zusammensetzung von Frischkäse ist am Beispiel von Magerquark und am Beispiel von streichfähigem Frischkäse in den Tabellen 2.1 und 2.2 zusammengestellt.

Tabelle 2.1: Typische Zusammensetzung von Magerquark

Parameter	Wert	Referenz
	Zusammensetzung	
Trockenmasse	17,5 %	STAFF, 1998
Wassergehalt	82,5 %	STAFF, 1998
Eiweißgehalt absolut	12,5 %	STAFF, 1998
Laktosegehalt absolut	3,5 %	STAFF, 1998
Fettgehalt absolut	0,2 %	STAFF, 1998
Calciumgehalt	0,09-0,11 %	MAIR-WALDBURG, 1974
Kochsalzgehalt	0,06-0,12 %	MAIR-WALDBURG, 1974
pH	4,5	STAFF, 1998
a _w -Wert	0,99	RÜEGG und BLANC, 1977

Tabelle 2.2: Typische Zusammensetzung von Frischkäse unterschiedlichen Fettgehalts

Parameter	Prozentualer Anteil		Referenzen
	leicht	40 % Fett i. Tr.	
Trockenmasse	17 %	26 %	MEUNIER-GODDIK, 2004
Wasser	83 %	74 %	MEUNIER-GODDIK, 2004
Protein	13 %	12 %	MEUNIER-GODDIK, 2004
Laktose	3 %	3 %	MEUNIER-GODDIK, 2004
Fett	0,05 %	10,4 %	MEUNIER-GODDIK, 2004
NaCl	0,5-1 %	0,8-1 %	MEUNIER-GODDIK, 2004
pH	4,55	4.65*	STAFF, 1998
a _w -Wert	0,96-1,00		MARCOS und ESTEBAN, 1982

* für Rahm-Frischkäse

2.1.2 Herstellung von Frischkäse

Derzeit gibt es drei wesentliche Methoden zur kommerziellen Herstellung von Frischkäse (Abbildung 2.1): die konventionelle Methode, die Thermo-Prozess-Methode und die Ultrafiltrationsmethode. Bei allen Methoden wird nach Separation der Magermilch eine Wärmebehandlung durchgeführt, wobei bei der konventionellen Methode für 30 s eine Erhitzung auf 71-74 °C erfolgt und bei den anderen Methoden die Magermilch für 5-6 min auf 85-95 °C erhitzt wird. Letztgenannte Erhitzung führt dazu, dass das Molkenprotein denaturiert und dadurch bei der späteren Separation der Molke im Bruch verbleibt.

Die Zugabe der Starterkulturen erfolgt, wenn die Magermilch auf deren optimale Wachstumstemperatur (28-30 °C) abgekühlt worden ist. Zu den am häufigsten verwendeten mesophilen Milchsäurebakterien zur Frischkäseherstellung gehören *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* var *diacetylactis* und *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris* (STAFF, 1998). Sie führen durch die Produktion von organischen Säuren, vor allem Milchsäure, zu einer raschen Dicklegung der Milch. Neben Milchsäure ist auch die Produktion von Essigsäure, Ethanol, Aromakomponenten, Bacteriocinen, Exopolysacchariden und verschiedenen Enzymen von Bedeutung. Diese verlängern die Haltbarkeit und verbessern die mikrobielle

Sicherheit sowie die Textur des Endproduktes, außerdem tragen sie zu einem guten sensorischen Gesamteindruck bei (LEROY und DE VUYST, 2004). Bezüglich der Produktion von Bacteriocinen sei als Beispiel das Bacteriocin Nisin erwähnt, das von *Lactococcus lactis* produziert wird. Nisin weist ein breites Spektrum antimikrobieller Wirkung auf und hemmt viele grampositive Bakterien. Es ist in der Lage *Listeria spp.* abzutöten und unterdrückt die Sporenbildung von *Clostridium botulinum* (NOUT, 1994). Einige Hersteller verwenden zusätzlich thermophile Milchsäurebakterien, die die zweite Wärmebehandlung überleben und dadurch während der Lagerung des fertigen Produktes das Wachstum anderer Kontaminanten oder pathogener Keime unterdrücken können.

Nach der ersten Säuerungsphase durch die Aktivität der Starterkulturen, kann zusätzlich Lab hinzugegeben werden. Das Lab bewirkt eine Verbesserung der Teigbeschaffenheit. Die verwendeten Mengen der Starterkulturen und des Labs variieren (STAFF, 1998). MAIR-WALDBURG (1974) gibt an, dass 1-2 % Säureweckerzusatz sowie 0,3-0,5 g Lab je 100 l Käsemasse bzw. 1-2 ml einer 1:10 000 konzentrierten Lablösung hinzugegeben werden. Der Fermentationprozess wird beendet, wenn ein pH-Wert von 4,5-4,6 erreicht ist. Der gebildete Bruch wird durch Umrühren zerkleinert. Die weitere Bruchbehandlung hängt von der jeweiligen Methode ab.

Bei der **konventionellen Methode** erfolgt die mechanische Trennung von Bruch und Molke in einem Separator bei 20-28 °C. Frischkäse, die auf konventionellem Wege hergestellt werden, haben ein trockeneres Erscheinungsbild und ergeben einen trockeneren Geschmackseindruck. Sie haben eine struktureichere Teigbeschaffenheit und neigen dazu die Molke wieder abzusondern.

Bei der **Thermo-Prozess-Methode** wird eine zweite Wärmebehandlung durchgeführt, bei der der Bruch für 4-6 min auf 60-64 °C erwärmt wird. Anschließend erfolgt (wie bei der konventionellen Methode) eine mechanische Separation, wobei in diesem Fall Temperaturen von 40-45 °C angewendet werden. Diese Methode erhöht den Käseertrag. Da bei der Thermisierung 50-60 % der Molkenproteine zurück gewonnen werden, wird eine Verbesserung der Teigbeschaffenheit erreicht. Der Frischkäse erhält ein glatteres Erscheinungsbild und eine weichere Konsistenz.

Bei der **Ultrafiltrations-Methode** (oder auch **Membran-Technologie**) wird ebenfalls eine zweite Wärmebehandlung durchgeführt, bei der der Bruch jedoch für 3-5 min auf 50-58 °C erhitzt wird. Im Anschluss erfolgt unter Abkühlung auf 40-45 °C die Ultrafiltration. Der auf diese Weise hergestellte Frischkäse enthält eine höhere Konzentration an Molkenproteinen als diejenigen Käse, die durch die konventionelle Methode oder Thermo-Prozess-Methode hergestellt werden. Das Produkt der Ultrafiltrations-Methode hat einen etwas geringeren Trockenmassegehalt, was zu einer weicheren und lockereren Teigbeschaffenheit, jedoch auch zu einem bittereren Geschmackseindruck führt.

Bezüglich der weiteren Herstellungsschritte entsprechen die genannten Methoden einander. Nachdem die Molke abgetrennt worden ist, verbleibt der Frischkäse, der einen pH-Wert von ca. 4,5 aufweist und visköser als Joghurt ist. Danach erfolgt im Kühltunnel eine meist zweiphasige Kühlung, wodurch der Austritt von Molke verhindert wird. In der ersten Phase wird auf 15-20 °C gekühlt, was der übergangsweisen Lagerung dient. In der zweiten Phase wird auf 5-8 °C gekühlt. Hierbei werden gleichzeitig Rahm, Früchte oder andere Würzmittel untergemischt. In einem letzten Schritt wird der Frischkäse aseptisch abgepackt und ins Kühllager verbracht (STAFF, 1998).

Hinsichtlich der Zugabe von Gewürzen sei auf den möglichen Eintrag von Mikroorganismen hingewiesen, insbesondere falls dies nach der Wärmebehandlung geschieht. Keimgehalte unbehandelter, häufig in Frischkäse enthaltender Gewürze sind in Tabelle 2.3 aufgeführt. Gemäß DGHM (2007) sind z. B. für *E. coli* in Gewürzen, die zur Abgabe an den Verbraucher bestimmt sind, noch Keimgehalte von bis zu 10^3 KbE/g akzeptabel (Richtwert).

Tabelle 2.3: Untersuchungen zum Keimgehalt unbehandelter Gewürze (KbE/g) (BUCKENHÜSKES, 2004)

Gewürz	Gesamtkeimzahl	Coliforme Keime	Schimmel
Basilikum	$2 \times 10^4 - 4 \times 10^5$	$< 10^2$	$< 10^2$
Knoblauch	5×10^4	$< 10^2 - 5 \times 10^2$	$< 10^2 - 5 \times 10^2$
Paprika	$1 \times 10^5 - 5 \times 10^5$	$< 10^2$	$2 \times 10^2 - 5 \times 10^2$
Pfeffer, schwarz	$5 \times 10^5 - 1 \times 10^7$	$1 \times 10^2 - 5 \times 10^4$	$5 \times 10^2 - 2 \times 10^4$
Pfeffer, weiß	$1 \times 10^4 - 5 \times 10^5$	$< 10^2 - 1 \times 10^3$	$< 10^2 - 1 \times 10^5$

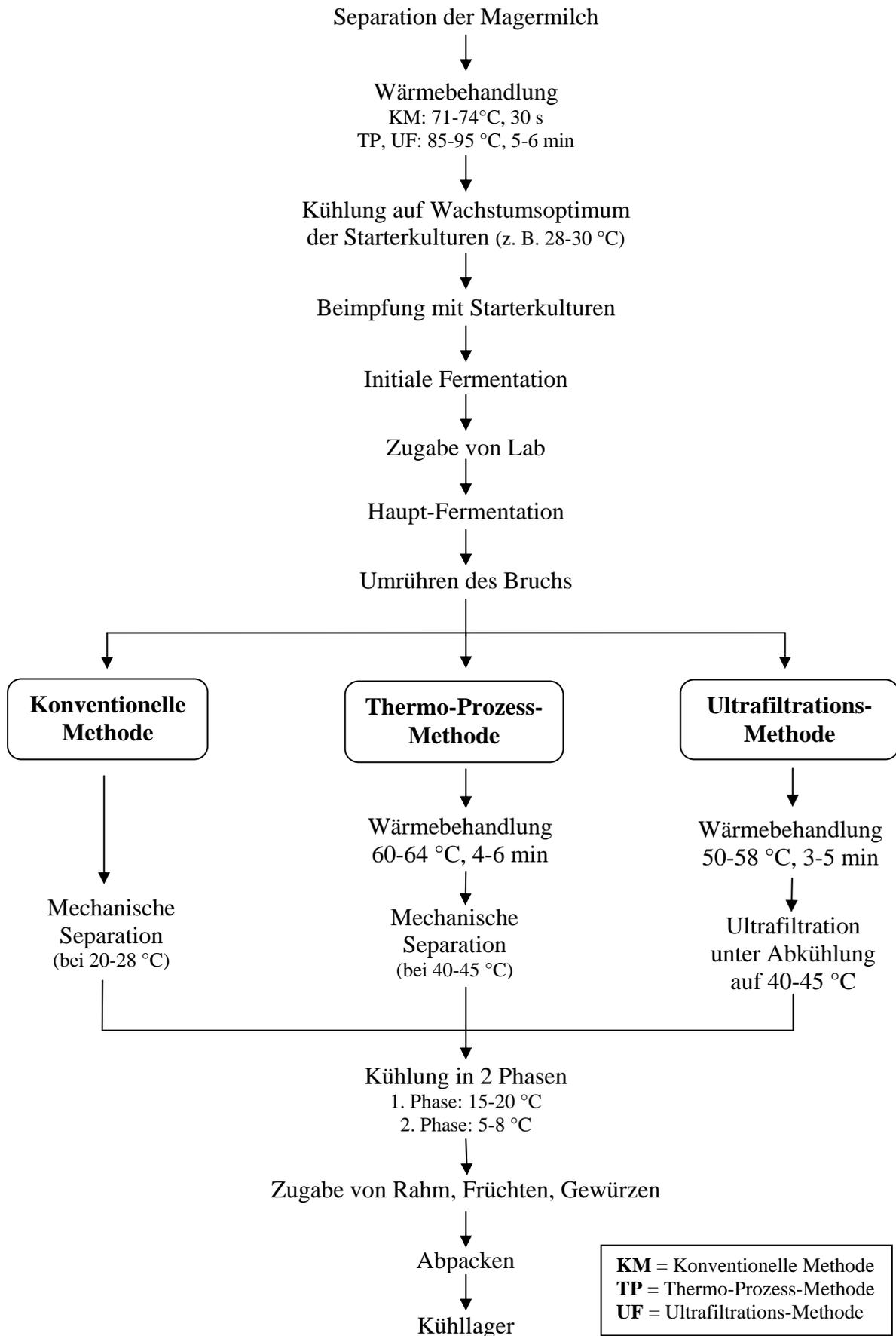
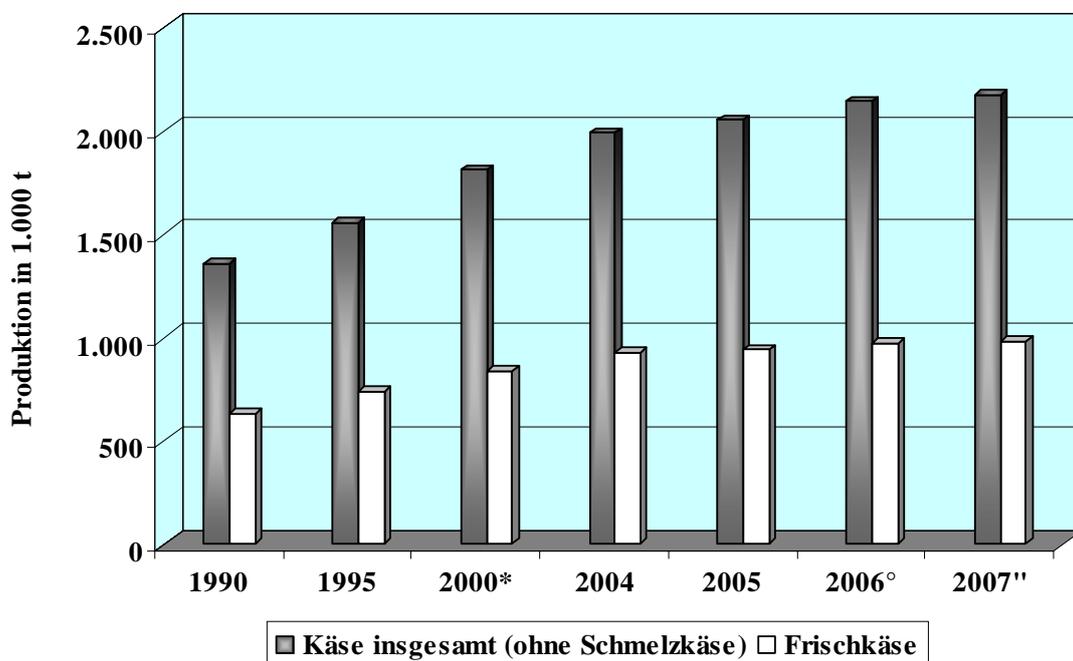


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der Frischkäse-Herstellung nach STAFF (1998)

Abschließend ist zur Herstellung von Frischkäse anzumerken, dass bei den beschriebenen Methoden normalerweise wärmebehandelte Milch verwendet wird. Seit Inkrafttreten der Verordnung zur Durchführung von Vorschriften des gemeinschaftlichen Lebensmittelhygienerechts vom 8. August 2007 ist dies jedoch nicht mehr zwingend notwendig. Das Wärmebehandlungsgebot, das früher für außerhalb der Direktvermarktung angebotene Frischkäse gegolten hat, besteht nicht mehr und somit kann Rohmilch grundsätzlich auch zur kommerziellen Herstellung von Frischkäse verwendet werden. Derzeit spielt dies in der Praxis außerhalb der Direktvermarktung aber noch keine Rolle.

2.1.3 Wirtschaftliche Aspekte

Die Käseproduktion hat in den letzten Jahren kontinuierlich zugenommen und erreichte in Deutschland im Jahr 2007 mit über 2,2 Mrd kg Käse ein neues Rekordergebnis (MILCH & MARKT, 2008a). Eine Übersicht der Entwicklung des Käsemarktes und dem Anteil der Frischkäse-Produktion zeigt Abbildung 2.2.



* seit 2000 enthalten die Produktionszahlen für Frischkäse auch Pasta-Filata-Käse

° vorläufige Produktionszahlen für 2006; '' geschätzte Produktionszahlen für 2007

Abbildung 2.2: Entwicklung des Käsemarktes und Anteil der Frischkäse-Produktion in Deutschland (MILCHINDUSTRIE-VERBAND, 2007)

Der durchschnittliche Pro-Kopf-Verbrauch von Käse durch die deutschen Bundesbürger lag im Jahr 2006 bei 22,5 kg (MILCH & MARKT, 2008b). Die Quark- und Frischkäse-Produktion wird für das Jahr 2007 auf einen neuen Höchstwert von 975.000 t geschätzt. Dies entspricht einem Anteil von etwa 44 % an der gesamten Käseproduktion (MILCHINDUSTRIE-VERBAND, 2007). Im Hinblick auf die Frischkäsesorten sind Zuwachsraten im Rahm- und Doppelrahmfrischkäse-Bereich sowie bei Frischkäse mit der Zugabe von Früchten oder Kräutern und bei Cottage Cheese zu verzeichnen (SENIGE und SIENKIEWICZ, 2002). Der durchschnittliche Pro-Kopf-Verbrauch von Speisequark bzw. Frischkäse in Deutschland lag im Jahr 2006 bei 9,9 kg und damit nur knapp hinter dem dem Verbrauch, den Hart-, Schnitt- und Weichkäse gemeinsam erzielten (10,9 kg) (MILCHINDUSTRIE-VERBAND, 2007). In Deutschland und Frankreich ist der größte Absatz von Frischkäse zu verzeichnen, wobei fettfreie oder fettarme Produkte das größte Verkaufsvolumen aufweisen (STAFF, 1998).

Neben dem direkten Verzehr wird Frischkäse für die Zubereitung eines breiten Spektrums von Speisen verwendet. Dazu zählen Soßen, Dips, Dressings, Desserts, Salate, Kuchen, Soufflés u. v. m. (STAFF, 1998). Bezüglich der bevorzugten Geschmacksrichtungen ergab eine Verbraucher-Analyse der G+J MEDIA SALES (Basis: 64,82 Mio Bundesbürgern ab 14 Jahre) aus dem Jahre 2007, dass 64 % der Bundesbürger Frischkäse pur genießen. Die gewürzten bzw. die mit Kräutern verfeinerten Varianten konsumieren 57 % und körnigen Frischkäse 26 % der Bevölkerung (G+J MEDIA SALES, 2007).

2.2 *Enterobacteriaceae, Escherichia coli* und coliforme Keime

2.2.1 *Enterobacteriaceae* und coliforme Keime

2.2.1.1 Systematik

Die Familie der *Enterobacteriaceae* gehört nach BERGEY'S Manual of Systematic Bacteriology zur Gruppe der fakultativ anaeroben gramnegativen Stäbchen (BRENNER, 1986) und umfasst derzeit etwa 44 verschiedene Gattungen (GARRITY *et al.*, 2004). Zur Gruppe der coliformen Keime werden diejenigen *Enterobacteriaceae* gezählt, die Laktose unter Säure- und/oder Gasbildung abbauen können. Etwas genereller bezeichnet MANAFI (2002) alle *Enterobacteriaceae*, die das *lacZ*-Gen für das Enzym β -Galactosidase besitzen, als Coliforme. Der Begriff „Coliforme“ hat jedoch keine taxonomische Bedeutung. Milchwirtschaftlich bedeutsame *Enterobacteriaceae* und deren Zuordnung zur Gruppe der Coliformen sind in Tabelle 2.4 aufgeführt (RIEMELT *et al.*, 1996; MANAFI, 2002).

Tabelle 2.4: Milchwirtschaftlich bedeutsame *Enterobacteriaceae* (RIEMELT *et al.*, 1996)

Zuordnung	Gattung	Art
Klassische Gruppe der Coliformen	<i>Escherichia</i>	<i>E. coli</i>
	<i>Citrobacter</i>	<i>C. freundii</i>
	<i>Klebsiella</i>	<i>K. oxytoca</i>
		<i>K. pneumoniae</i> ssp. <i>pneumoniae</i>
		<i>E. aerogenes</i>
	Coliform aufgrund des Laktose-spaltungsvermögens, jedoch selten vorkommend	<i>Enterobacter</i>
<i>E. cloacae</i>		
<i>E. sakazakii</i>		
<i>K. ascorbata</i>		
Nur wenige laktosespaltende Stämme können den Coliformen zugeordnet werden	<i>Hafnia</i>	<i>H. alvei</i>
	<i>Serratia</i>	<i>S. liquefaciens</i>
Keine Coliformen	<i>Proteus</i>	<i>P. vulgaris</i>
		<i>P. mirabilis</i>
		<i>P. myxofaciens</i>
	<i>Salmonella</i>	
	<i>Shigella</i>	
	<i>Yersinia</i>	

2.2.1.2 Allgemeine Charakterisierung

2.2.1.2.1 Morphologie, kulturelle und biochemische Eigenschaften

Enterobacteriaceae sind gramnegative, nicht-sporenbildende Stäbchenbakterien und haben eine Größe von 0,3-1,0 µm x 1,0-6,0 µm. Im mikroskopischen Präparat sind sie vorwiegend einzeln angeordnet. Die meisten Vertreter sind aufgrund peritricher Begeißelung beweglich. Sie können bekapselt oder unbekapselt auftreten. Alle Spezies fermentieren Glukose unter Bildung von Säure und in vielen Fällen unter Bildung von Gas. Sie sind Oxidase-negativ und Katalase-positiv und reduzieren mit Ausnahme weniger Spezies Nitrat zu Nitrit. Ihre biochemischen Eigenschaften werden bei der „Bunten Reihe“ zur Differenzierung herangezogen (GILMOUR und ROWE, 1981; GROSS und HOLMES, 1983; BRENNER, 1986). Weiterführend kann eine serologische Charakterisierung anhand der verschiedenen Körper-(O)-, Geißel-(H)-, Kapsel-(K)- und Fimbrien-(F)-Antigene der Bakterien vorgenommen werden (GROSS und HOLMES, 1983).

Auf nicht-selektivem Nähragar bilden *Enterobacteriaceae* durchschnittlich 2-3 mm große, runde, leicht konvexe, teilweise schleimig wachsende, weiße bis weiß-graue Kolonien, die einen glatten Rand und eine glänzende Oberfläche haben (GILMOUR und ROWE, 1981; GROSS und HOLMES, 1983). Die Kolonien von *Enterobacteriaceae*-Spezies verschiedener Gattungen können im Erscheinungsbild sehr variieren. Eine detaillierte Beschreibung der Morphologie sowie der kulturellen und biochemischen Eigenschaften der einzelnen Genera kann den Arbeiten von FARMER III *et al.* (1985), BRENNER (1986) sowie HOLT *et al.* (1994) entnommen werden.

2.2.1.2.2 Wachstumseigenschaften

Enterobacteriaceae wachsen unter aeroben und fakultativ anaeroben Bedingungen (GROSS und HOLMES, 1983). Optimale Wachstumsbedingungen sind bei 30-37 °C gegeben. Einige Spezies weisen jedoch bei 25-30 °C eine höhere metabolische Aktivität auf. Der Temperaturbereich, in dem noch Wachstum möglich ist, liegt bei minimal 3-10 °C und bei maximal 40-45 °C (HOLT *et al.*, 1994; ZANGERL, 2006a). Der minimale a_w -Wert für *Enterobacteriaceae* beträgt 0,95. Das pH-Optimum ist nahe pH 7,0 (pH 6,0-8,0).

Der minimale pH-Wert, bei dem sich die meisten Vertreter noch vermehren, liegt bei pH 4,4-4,5 (KRÄMER, 2002). *Enterobacteriaceae* müssen sowohl in der Umwelt als auch während der Magen-Darm-Passage niedrige pH-Werte überdauern können. Das Wachstumsverhalten im sauren Milieu (pH 2-3), insbesondere das pathogener Vertreter wie *Escherichia*, *Salmonella* und *Shigella*, wurde in zahlreichen Untersuchungen geprüft. Diese ergaben, dass *Enterobacteriaceae* durchaus bei niedrigen pH-Werten überleben können. Bei ihren Überlebensstrategien kann zwischen Säuregewöhnung, Säuretoleranz und Säureresistenz unterschieden werden. Hierzu zählen u. a. induzierbare Mechanismen wie die Synthese von schützenden Proteinen (acid shock proteins) oder die Bindung freier Protonen durch die Decarboxylierung von Glutamat, Arginin und Lysin (GORDEN und SMALL, 1993; LIN *et al.*, 1995; BEARSON *et al.*, 1997).

2.2.1.3 Vorkommen und Bedeutung

Enterobacteriaceae sind ubiquitär verbreitet. Wie auch durch den Namen zum Ausdruck gebracht wird, ist ihr natürlicher Standort der Verdauungstrakt (Darm [gr.] *enteron*) von Mensch und Tier. Daneben können sie im Wasser, im Boden, auf Pflanzen, Früchten und Gemüse gefunden werden (BRENNER, 1986).

In Lebensmitteln kommt den *Enterobacteriaceae* eine summarische Bedeutung als Markerorganismen zu (BECKER und TERPLAN, 1987). Dieser von MOSSEL (1981) geprägte Begriff umfasst deren Index- und Indikatorfunktion. *E. coli*, Coliforme und *Enterobacteriaceae* sind die am häufigsten in Lebensmitteln bestimmten Hygieneindikatoren (SCHMIDT-LORENZ und SPILLMANN, 1988). Indexorganismen zeigen die Anwesenheit pathogener Spezies an und damit eine mögliche Gesundheitsgefährdung für den Menschen. Zu diesen zählt z. B. *E. coli*. Indikatororganismen hingegen zeigen die Wirksamkeit und Einhaltung von Hygienemaßnahmen bei der Gewinnung, Behandlung und Bearbeitung von Lebensmitteln an. Zu diesen gehören *Enterobacteriaceae* bzw. coliforme Keime (BECKER und TERPLAN, 1987; RIEMELT *et al.*, 1996; MANAFI, 2002). Je nach Art der Produkte können die gleichen Organismen einerseits Index-, andererseits Indikatororganismen sein oder sogar beides gleichzeitig. Dies trifft z. B. für *E. coli* zu (SCHMIDT-LORENZ und SPILLMANN, 1988).

Enterobacteriaceae können mit verschiedenen Virulenzfaktoren ausgestattet sein. Durch Fimbrien wird die Adhärenz an Epithelzellen vermittelt. Daneben haben *Enterobacteriaceae* die Fähigkeit zur Invasivität z. B. in Darmepithelien. Kapseln können als Antiphagozytosefaktor wirken (Phagozytenresistenz). Als Endotoxin ist das LipidA aus dem Lipopolysaccharid der Zellwand wirksam. Außerdem können *Enterobacteriaceae* Exotoxine sezernieren. Hierzu zählen (hitzestabile/-labile) Enterotoxine, die zur massiven Wasser-Sekretion in den Darm führen und Zytotoxine, die toxisch auf Endothelien oder Darmepithelien wirken (MIKSITS und HAHN, 2004).

Hinsichtlich ihrer Pathogenität unterscheiden sich die einzelnen *Enterobacteriaceae*-Spezies deutlich. Während *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia pestis* und *Yersinia pseudotuberculosis* den obligat pathogenen Gattungen bzw. Arten zugeordnet werden, gibt es eine Vielzahl fakultativ pathogener Gattungen wie *Escherichia*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Proteus*, *Providencia* und *Edwardsiella* (KRÄMER, 2002). *Enterobacteriaceae* sind für 50 % der nosokomialen Erkrankungen verantwortlich (BRENNER, 1986; HOLT *et al.*, 1994). Zu den verursachten Krankheitserscheinungen gehören neben Durchfall-Erkrankungen extraintestinale Erkrankungen wie Abszesse, Meningitiden, Septikämien sowie Infektionen von Wunden oder des Respirations- und Urogenitaltraktes (FARMER III und KELLY, 1992; HOLT, 1994).

2.2.1.3.1 Vorkommen und Bedeutung in Milch

Enterobacteriaceae gehören zu den häufigsten gramnegativen Kontaminanten von Milch und Milcherzeugnissen. Ihre Anwesenheit ist grundsätzlich unerwünscht (BECKER und TERPLAN, 1987; RIEMELT *et al.*, 1996). Eine Kontamination kann bei der Milchgewinnung über ungenügend gereinigte Euter oder über Melksysteme erfolgen (JAYARAO und WANG, 1999; VAN KESSEL *et al.*, 2004). Wesentlich bedeutsamer ist jedoch die Kontamination bei der Lagerung, dem Transport sowie der Be- und Verarbeitung (BACHMANN und SPAHR, 1995). Einige Untersuchungen zum Vorkommen von *Enterobacteriaceae* bzw. Coliformen in Bestandsmilch sind in Tabelle 2.5 zusammengestellt. Hierbei ergaben zwischen 62 % bis 95 % der untersuchten Proben den Nachweis von *Enterobacteriaceae* bzw. coliformen Keimen.

Tabelle 2.5: Vorkommen von *Enterobacteriaceae* bzw. coliformen Keimen in Rohmilch (Bestandsmilch)

Probenherkunft ¹⁾	Tierart ²⁾	Parameter E/C ³⁾	Probenzahl	Anzahl (%) positiv	KbE/g: Anzahl der Proben ⁴⁾	Referenzen
FR	K	C	69	k.A. ⁵⁾	< 10 ² : 58 Max: 2,2 x 10 ⁴	DESMASURES <i>et al.</i> , 1997
USA	K	C	130	81 (62 %)	< 10 ⁰ -10 ¹ : 57 ≥ 10 ¹ -10 ² : 38 ≥ 10 ² -10 ³ : 28 ≥ 10 ³ -10 ⁴ : 6 > 10 ⁴ -10 ⁵ : 1 Ø 10 ^{3,4} Med: 10 ^{2,3} Max: 10 ^{4,7}	JAYARAO und WANG, 1999
DE	K	C	74	65 (88 %)	> 10 ² : 16 < 1,1 x 10 ⁴ : 70 Max: 1,1 x 10 ⁵	HAHN <i>et al.</i> , 1999a
CH	Z	E	344	212 (62 %)	Ø 10 ^{5,72} Med: 10 ^{1,88} Max: 10 ^{7,64}	MUEHLHERR <i>et al.</i> , 2003
	S	E	63	45 (71 %)	Ø 10 ^{3,93} Med: 10 ^{2,08} Max: 10 ^{5,34}	
BE	K	C	143	k.A.	≤ 10 ² : 96 > 10 ² - ≤ 10 ³ : 39 > 10 ³ - ≤ 10 ⁴ : 8	DE REU <i>et al.</i> , 2004
USA	K	C*	860	818 (95 %)	10 ¹ -10 ² : 344	VAN KESSEL <i>et al.</i> , 2004

¹⁾ FR = Frankreich; USA = Amerika; DE = Deutschland; CH = Schweiz; BE = Belgien

²⁾ K = Kuhmilch; Z = Ziegenmilch; S = Schafmilch

³⁾ E = *Enterobacteriaceae*; C = Coliforme; C* = Fäkal-Coliforme

⁴⁾ bzw. durchschnittlicher (Ø), medianer (Med), maximaler (Max) Keimgehalt in KbE/g

⁵⁾ k.A. = keine Angabe

Der maximale Keimgehalt von *Enterobacteriaceae* bzw. Coliformen in Kuhmilch lag bei 1,1 x 10⁵ KbE/ml. Bei der Mehrzahl der positiven Proben wurde jedoch für *Enterobacteriaceae* bzw. Coliforme ein Keimgehalt von weniger als 10² KbE/g festgestellt. Anzahl und Artenreichtum der *Enterobacteriaceae* nehmen mit steigenden hygienischen Mängeln zu. Dies unterstreicht ihre Bedeutung als Markerorganismen

(RIEMELT *et al.*, 1996; ZANGERL, 2006a). Durch eine ordnungsgemäße Pasteurisation werden alle in der Milch enthaltenen *Enterobacteriaceae* mit Sicherheit abgetötet. Ihr Vorkommen in fertigen Milchprodukten ist somit immer als Folge einer Rekontamination anzusehen (GILMOUR und ROWE, 1981; RIEMELT *et al.*, 1996; ZANGERL, 2006a).

Den Hauptbestandteil der *Enterobacteriaceae*-Flora in Milch und Milcherzeugnissen stellen Coliforme dar, da sie durch die Laktoseverwertung bestens an das Medium Milch adaptiert sind (ZANGERL, 2006a). Untersuchungen von Bestandmilch (JAYARAO und WANG, 1999) und von pasteurisierter Konsummilch (KLEEBERGER, 1979; LINDBERG *et al.*, 1998), bei denen eine Differenzierung der *Enterobacteriaceae*-Isolate durchgeführt wurde, zeigen, dass am häufigsten die Spezies *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae* ssp. *pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, *Hafnia alvei* und *Serratia liquefaciens* vertreten sind (s. a. Tabelle 2.4).

2.2.1.3.2 Vorkommen und Bedeutung in Frischkäse

Verschiedene Untersuchungen zum Vorkommen von *Enterobacteriaceae* bzw. coliformen Keimen in Bestandmilch zeigen, dass die zur Frischkäse-Herstellung verwendete Milch bereits eine gewisse Grundbelastung dieser Keime aufweist. Dies ist besonders bei der Herstellung von Rohmilch-Frischkäsen bedeutsam. Einige Ergebnisse zum Vorkommen von *Enterobacteriaceae* bzw. Coliformen in Frischkäse sind in Tabelle 2.6 aufgeführt. Diese Untersuchungen ergaben, dass Rohmilchfrischkäse eine Kontaminationsrate von bis zu 100 % aufweisen können. Die Wärmebehandlung führt zwar zu einer sicheren Abtötung dieser Keime, aber auch bei aus pasteurisierter Milch hergestellten Frischkäsen wurden häufig *Enterobacteriaceae* bzw. coliforme Keime nachgewiesen. Bei diesen lag jedoch der maximale Keimgehalt bei etwa 10^4 KbE/g und damit auf einem deutlich geringeren Niveau als bei Rohmilch-Frischkäsen, bei denen für *Enterobacteriaceae* bzw. Coliforme sogar Keimgehalte von mehr als 10^7 KbE/g festgestellt wurden. Das Vorkommen von *Enterobacteriaceae* bzw. Coliformen in pasteurisierten Frischkäsen ist meist auf eine Rekontamination zurückzuführen und zeigt hygienische Mängel während der Herstellung und Verarbeitung an. Neben ihrer Bedeutung als potentielle Pathogene, sind *Enterobacteriaceae* auch als Verderbniserreger wichtig (HAHN *et al.*, 1999b, RENYE *et al.*, 2008). Sie sind glyko-, proteo- und lipolytisch aktiv, produzieren aus Aminosäuren

Gase wie Ammoniak, CO₂ oder H₂ und bilden biogene Amine sowie organische Säuren. Dies führt neben einer Minderung der Qualität und der Haltbarkeit auch zu technologischen Schäden und zu Veränderungen in Konsistenz und Geschmack (BECKER und TERPLAN, 1987; RIEMELT *et al.*, 1996; TORNADIJO *et al.*, 2001; ZÁRATE *et al.*, 2002).

Tabelle 2.6: Vorkommen von *Enterobacteriaceae* bzw. coliformen Keimen in Frischkäse

Probenherkunft	Anzahl Proben ¹⁾	Anzahl (%) positiv bzw. KbE/g: Anzahl der Proben (%) ²⁾	Behandlung der Milch ³⁾	Tierart ⁴⁾	Referenzen
Deutschland	35*	31 (89 %) Max: > 10 ⁶	R	K	HAHN <i>et al.</i> , 1999b
Spanien	18**	< 10 ¹ : 4 (22 %) 10 ¹ -10 ² : 4 (22 %) > 10 ² -10 ³ : 6 (33 %) > 10 ³ -10 ⁴ : 3 (17 %) > 10 ⁴ : 1 (6 %)	P	Z	OLARTE <i>et al.</i> , 1999
Österreich	41*	> 10 ¹ : 18 (44 %) Max: 7,0 x 10 ²	P	K	PFLEGER, 2001
Belgien	8*	< 10 ¹ : 6 (75 %) 2,0 x 10 ¹ : 1 (12,5 %) 2,7 x 10 ² : 1 (12,5 %)	R	Z	DE REU <i>et al.</i> , 2002
Belgien	4*	> 10 ⁴ : 1 (25 %)	R	K	DE REU <i>et al.</i> , 2004
Deutschland	44*	11 (25 %) 10 ⁰ -10 ¹ : 3 (7 %) > 10 ¹ -10 ² : 4 (9 %) > 10 ² -10 ³ : 2 (5 %) > 10 ³ -10 ⁴ : 1 (2 %) > 10 ⁴ -10 ⁵ : 1 (2 %)	P, R	Z	OELLIG, 2006
Mexiko	4*	10 ⁶ -10 ⁷ : 1 (25 %) > 10 ⁷ -10 ⁸ : 3 (75 %)	R	K	RENYE <i>et al.</i> , 2008
	2*	10 ^{4,42} : 1 (50 %) 10 ^{4,78} : 1 (50 %)	P	K	

¹⁾ Untersuchung auf das Vorkommen coliformer Keime (*) bzw. *Enterobacteriaceae* (**)

²⁾ bzw. maximaler (Max) Keimgehalt in KbE/g

³⁾ R = Rohmilch; P = pasteurisierte Milch

⁴⁾ K = Kuhmilch; Z = Ziegenmilch

Durch die Art der Bruchgewinnung kann der Keimgehalt beeinflusst werden. Untersuchungen von FERNANDEZ-ALBALAT *et al.* (2003) zeigten, dass traditionell hergestellte Frischkäse um bis zu zwei Zehnerpotenzen höhere *Enterobacteriaceae*-Gehalte aufwiesen als Frischkäse, bei denen der Bruch durch Ultrafiltration gewonnen worden war. Die Autoren vermuteten, dass dies auf die Wärmezufuhr (50 °C) während der Ultrafiltration zurückzuführen war und dass vereinzelt nachweisbare Keime durch Rekontamination bedingt waren.

OLARTE *et al.* (1999) stellten saisonale Unterschiede im *Enterobacteriaceae*-Gehalt von spanischem Ziegen-Frischkäse fest. Hierbei wiesen Frischkäse, die im Sommer untersucht worden waren, einen signifikant höheren *Enterobacteriaceae*-Gehalt auf, als solche die im Frühjahr untersucht worden waren.

Untersuchungen von ZÁRATE *et al.* (2002) zu den vorkommenden *Enterobacteriaceae*-Spezies in spanischem Frischkäse im Verlauf eines Jahres ergaben lediglich für *Serratia marcescens* (6,1 %) saisonale Unterschiede. *Serratia marcescens* wies im Winter eine signifikant höhere Nachweisrate auf, die dem Fünffachen der restlichen Jahreszeiten entsprach. Am häufigsten wurden *Serratia odorifera* (23,9 %) gefolgt von *Klebsiella pneumoniae* ssp. *pneumoniae* (12,3 %), *Citrobacter freundii* (8,9 %), *Enterobacter aerogenes* (6,7 %) und *Enterobacter agglomerans* (6,7 %) isoliert. Potentiell pathogene Keime waren nur in Frischkäsen mit einem pH-Wert von > 5,0 enthalten. Demnach scheint durch einen niedrigen pH-Wert, die mikrobiologische Beschaffenheit verbessert zu werden.

Ähnliche Ergebnisse zur Nachweisrate verschiedener *Enterobacteriaceae*-Spezies in Frischkäse erhielten RENYE *et al.* (2008). Ihre Untersuchungen ergaben am häufigsten den Nachweis von *Klebsiella* spp. (*K. pneumoniae*, *K. ornithinolytica*, *K. oxytoca*, *K. terrigena*), gefolgt von *Enterobacter* spp. (*E. cloacae*, *E. hormaechei*), *Citrobacter freundii* und *Escherichia coli*. Der Vergleich der Isolate aus pasteurisierten und Rohmilch-Frischkäsen ergab, dass nur Rohmilch-Frischkäse potentiell pathogene Erreger wie *Salmonella typhimurium*, *Shigella* spp., *Citrobacter* spp. und *K. pneumoniae* enthielten. Die Abwesenheit dieser Spezies in pasteurisierten Käsen zeigt, dass die Wärmebehandlung wesentlich zur Verbesserung der mikrobiologischen Beschaffenheit beiträgt. Pasteurisierte

Käse waren allerdings auch nicht frei von Coliformen. Dies unterstreicht die Bedeutung einer guten Herstellungshygiene.

ZÁRATE *et al.* (1997) untersuchten den Verlauf des Keimgehalts eines Rohmilch-Frischkäses während der Lagerung. Hierbei wurde keine Vermehrung von *Enterobacteriaceae*, Coliformen oder Fäkal-Coliformen beobachtet. Der maximale Keimgehalt wurde in den ersten zwei Tagen nach der Herstellung festgestellt, danach war ein deutlicher Abfall der Keimzahl zu verzeichnen, die im Fall der Fäkal-Coliformen sogar unterhalb der Nachweisgrenze lag. Dies führten die Autoren auf die Säureproduktion durch die Starterkulturen und der damit einhergehenden Senkung des pH-Wertes sowie auf den Salzgehalt zurück.

2.2.2 *Escherichia coli*

2.2.2.1 Allgemeine Charakterisierung

2.2.2.1.1 Morphologie, kulturelle und biochemische Eigenschaften

Escherichia coli (*E. coli*) gehört zur Familie der *Enterobacteriaceae* und ist ein 1,1-1,5 µm breites und 2,0-6,0 µm langes, gramnegatives, fakultativ anaerobes, stäbchenförmiges Bakterium. Viele Stämme sind durch peritriche Begeißelung beweglich. Auf nicht-selektivem Nähragar sind verschiedene Kolonieförmigkeiten möglich. S (smooth)-Formen erscheinen als leicht konvexe, grauweiße Kolonien mit einer feuchten, glänzenden Oberfläche und einem glatten Rand. R (rough)-Formen bilden trockene Kolonien mit rauer Oberfläche und unregelmäßigem Rand. Daneben gibt es intermediäre Formen dieser beiden Typen sowie ausgeprägt schleimig wachsende Kolonien. Auf Blutagar bildet *E. coli* grauweiße Kolonien, die von einer Hämolysezone umgeben sein können (HOLMES und GROSS, 1983; ØRSKOV, 1986).

Biochemische Eigenschaften von *E. coli* werden bei Tests wie der IMViC-Reihe (Indolbildung, Methylrot-Reaktion, Voges-Proskauer-Reaktion, Citratverwertung: +++-) genutzt, um *E. coli* von anderen *Enterobacteriaceae* zu differenzieren (s.a. 2.2.1.2.1; BECKER und TERPLAN, 1987). Außerdem erfolgt in vielen Verfahren der Nachweis des für die meisten Stämme spezifischen Enzyms β-Glucuronidase (FENG und HARTMAN, 1982). Die Serotypisierung ist die wichtigste Form zur Klassifizierung der verschiedenen *E. coli*-Stämme (ØRSKOV *et al.*, 1977; ØRSKOV, 1986). Derzeit sind mindestens 181 O-, 56 H- und 100 K-Antigene bekannt, woraus sich für die einzelnen Serotypen über 10.000 Kombinationsmöglichkeiten ergeben. Zu den pathogensten Stämmen gehört *E. coli* O157:H7 (SELBITZ, 2002; PADOLA *et al.*, 2002; SCHEUTZ *et al.*, 2004).

2.2.2.1.2 Wachstumseigenschaften

E. coli wächst unter fakultativ anaeroben Bedingungen in einem Temperaturbereich von 2,5-45 °C (RIEMELT *et al.*, 1996), wobei ein optimales Wachstum bei 37 °C stattfindet (ØRSKOV, 1986). Beim Nachweis Verotoxin-bildender *E. coli* (VTEC) ist deren

Empfindlichkeit gegenüber höheren Temperaturen zu beachten, denn schon bei 44,5 °C findet kein Wachstum mehr statt. Ihre minimale Wachstumstemperatur beträgt 7 °C (BUCHANAN und DOYLE, 1997; SCVPH, 2003b). Hinsichtlich der Wasserverfügbarkeit kann sich *E. coli* wie die meisten Bakterien noch bei a_w -Werten von bis zu 0,95 vermehren, wobei ein optimales Wachstum bei einem a_w -Wert von 0,99 gegeben ist (IFT/FDA, 2003). Das optimale pH-Milieu liegt im neutralen Bereich (pH 6,0-7,0). Ein Wachstum von *E. coli* ist jedoch noch bei Werten zwischen pH 4,7 und 9,5 möglich (RIEMELT *et al.*, 1996). In Lebensmitteln mit niedrigen pH-Werten kann *E. coli* längere Zeit persistieren (SINELL und KLEER, 2000). Die Säuretoleranz bzw. -resistenz von *E. coli* wurde in zahlreichen Untersuchungen geprüft. Diese ergaben, dass (meist nach „Adaptation“ in einem gemäßigt sauren Milieu) ein Überleben von *E. coli* noch bei Werten zwischen pH 2,0 und pH 3,0 möglich ist. Hierbei wurde in den meisten Fällen zur Simulation der Magenpassage die Toleranz gegenüber Salzsäure untersucht (GORDON und SMALL, 1993; LIN *et al.*, 1995; BROWN *et al.*, 1997; PAUL und HIRSHFIELD, 2003; ŠEPUTIENĖ *et al.*, 2003; FOSTER, 2004). Gegenüber organischen Säuren wie Milch-, Essig- und Zitronensäure weist *E. coli* eine vergleichsweise höhere Empfindlichkeit auf (SCVPH, 2003b), aber auch bei diesen Säuren wurde bei niedrigen pH-Werten (pH 3,5) ein Überleben von *E. coli* beobachtet (GOODSON und ROWBURY, 1989; LEYER *et al.*, 1995; BEALES, 2003; KOUTSOUMANIS und SOFOS, 2004).

2.2.2.1.3 Vorkommen und Bedeutung

E. coli ist ein natürlicher Bewohner des hinteren Darmabschnitts von Mensch und Tier. Sein Anteil an der Darmflora beträgt etwa 1 % (BEUTIN, 1991; MANAFI, 2002). Pathogene *E. coli* wie VTEC haben ihr Reservoir hauptsächlich im Darm von Wiederkäuern wie Rindern, Schafen, Ziegen und auch Wildwiederkäuern (GYLES, 2007). Über den Fäzes gelangt *E. coli* in die Umwelt und kann dort unter günstigen Bedingungen längere Zeit überleben. Außerhalb des Darmtraktes ist *E. coli* ein Indikatororganismus für mangelnde Hygiene, der Nachweis in Lebensmitteln deutet auf fäkale Verunreinigung und Verderb (BAUMGART, 1994; RIEMELT *et al.*, 1996; MANAFI, 2002). Daneben zeigt *E. coli* als Indexorganismus die mögliche Anwesenheit pathogener Keime ökologisch ähnlicher Herkunft an. Wobei zu beachten ist, dass neben den harmlosen Stämmen der Darmflora *E. coli* selbst auch pathogen sein kann (RIEMELT *et al.*, 1996).

2.2.2.2 *E. coli* als Krankheitserreger

Neben apathogenen *E. coli*-Stämmen, die Bestandteil der normalen Mikroflora des Darmtrakts sind, gibt es viele Spezies, die zu intestinalen und auch extraintestinalen Erkrankungen führen können (KAPER *et al.*, 2004). Prinzipiell können drei allgemeine klinische Erscheinungen durch Infektionen mit pathogenen *E. coli* unterschieden werden: (1) Darm- und Durchfallerkrankungen, (2) Harnwegsinfektionen, (3) Sepsis und Meningitis. Auf Basis der das Krankheitsbild bestimmenden Virulenzfaktoren werden *E. coli* in verschiedene Pathotypen eingeteilt (NATARO und KAPER, 1998; KAPER *et al.*, 2004). Die wichtigsten enteropathogenen *E. coli* sind in Tabelle 2.7 aufgeführt.

Tabelle 2.7: Enteropathogene *E. coli* (ZANGERL, 2006b; KAPER *et al.*, 2004)

Bezeichnung	Pathogenitätsmechanismen	Erkrankung	Kontaminationsquellen
Enteropathogene <i>E. coli</i> (EPEC)	Adhärenz (LEE ¹), EAF-Plasmid ²), Darmläsionen	Säuglingsdiarrhoe (Dyspepsiecoli)	Direktkontakt, (Schmierinfektion), Wasser
Enterohämorrhagische <i>E. coli</i> (EHEC)	Vero-/Shigatoxine, Adhärenz, Hämolysine	Diarrhoe, HC ³ , HUS ⁴ , TTP ⁵)	Fleisch, Geflügel, Rohmilch, Rohmilch-Produkte, Wasser, Direktkontakt
Enterotoxinogene <i>E. coli</i> (ETEC)	Enterotoxine (LT ⁶ , ST ⁷), Adhärenz (Kolonisationsfaktoren)	choleraähnliche Diarrhoe (Reisediarrhoe, Traveller's Disease)	Lebensmittel, Wasser, selten: Weichkäse (Brie, Camembert)
Enteroinvasive <i>E. coli</i> (EIEC)	Invasivität	ruhrähnliche Diarrhoe (wässrig-blutige Diarrhoe)	hauptsächlich Direktkontakt, Salate, Weichkäse

¹) locus of enterocyte effacement

³) Hämorrhagische Colitis

⁵) Thrombotisch-Thrombozytopenische Purpura

⁷) hitzestabiles Enterotoxin

²) EPEC adherence factor

⁴) Hämolytisch-Urämisches-Syndrom

⁶) hitzelabiles Enterotoxin

Enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC) wurden erstmals 1982 als Krankheitserreger beim Menschen beschrieben (KAPER *et al.*, 2004). Sie können schon in sehr geringer Anzahl (10-100 Keime) schwere Erkrankungen hervorrufen (SINELL und KLEER, 2000).

EHEC führen zum auffälligen klinischen Bild einer hämorrhagischen Colitis (HC), an die sich hauptsächlich bei Kleinkindern als extraintestinale Komplikation das hämolytisch-urämische Syndrom (HUS) und, vor allem bei älteren Erkrankten, die thrombotisch-thrombozytopenische Purpura (TTP) anschließen können (BÜLTE, 2004). EHEC-Stämme der Serovarietät O157:H7 sind die wichtigsten EHEC-Pathogene in Nord-Amerika, Großbritannien und Japan, aber auch die Serotypen O26, O103, O111 und O145 führen zu Erkrankungen und haben in anderen Ländern eine wesentlich größere Bedeutung als *E. coli* O157:H7 (KAPER *et al.*, 2004; ZANGERL, 2006b). Hauptverantwortlich für die Pathogenität sind gewebeschädigende Verotoxine (VT1, VT2 und Varianten), EHEC-Hämolysine und Adhärenzfaktoren (Intimine) zur Anheftung an die Darmzelle. Letztere werden durch das „*E. coli*-attaching-and-effacing“-Gen codiert, das sich innerhalb des „locus of enterocyte effacement“ (LEE) befindet, einer Pathogenitätsinsel, die noch weitere Virulenzfaktoren codiert (KRÄMER, 2002; BÜLTE, 2004). Obwohl mehr als 200 *E. coli*-Serotypen Verotoxine produzieren, verfügt die Mehrzahl nicht über die LEE-Pathogenitätsinsel und verursacht keine Erkrankungen beim Menschen. Diese Serotypen werden unter dem Begriff Verotoxin-bildende *E. coli* (VTEC) oder Shigatoxin-bildende *E. coli* (STEC) zusammengefasst (KAPER *et al.*, 2004) und nur diejenigen VTEC, die neben Verotoxinen über weitere Pathogenitätsfaktoren verfügen und Krankheitserscheinungen auslösen, werden als EHEC bezeichnet (RKI, 2008a). Da im Zusammenhang mit Erkrankungen immer wieder neue Serovare ermittelt und auch LEE-negative VTEC (z. B. *E. coli* O103:H21) existieren (KAPER *et al.*, 2004), sind alle VTEC als potentielle EHEC anzusehen (RKI, 2008a). Andere pathogene *E. coli* spielen bei Milch und Milchprodukten kaum eine Rolle (ZANGERL, 2006b).

Enteropathogene *E. coli* (EPEC), insbesondere die Serovarietäten O55, O111 und O127, verursachen bei Säuglingen schwere Durchfallerkrankungen (Dyspepsiecoli) und tragen in den Entwicklungsländern beträchtlich zur Säuglingssterblichkeit bei (MANAFI, 2002). Die Infektion tritt in erster Linie in Ländern mit mangelndem Hygienestandard und in wärmeren Klimaten auf. Als Erreger von Lebensmittelinfektionen sind EPEC-Stämme nicht sehr häufig beschrieben worden (SINELL und KLEER, 2000).

Enterotoxinogene *E. coli* (ETEC) stellen insbesondere in Entwicklungsländern ein Problem dar (FARMER III und KELLY, 1992) und sind einer der Hauptursachen der sogenannten Reisediarrhoe (Traveller's disease). Charakteristisch ist die Bildung extrazellulärer Toxine, die in hitzelabile (LT) und hitzestabile (ST) Toxine unterteilt werden (SINELL und KLEER, 2000; MANAFI, 2002). Sie verursachen choleraähnliche

Durchfälle einhergehend mit Bauchkrämpfen und Erbrechen. Die Infektionsdosis liegt bei 10^5 Zellen (BÜLTE, 2004).

Enteroinvasive *E. coli* (EIEC) rufen eine ruhrähnliche Infektion hervor, bei der die Erreger in das Epithel der Dickdarmschleimhaut eindringen, sich dort vermehren und die Schleimhaut zerstören (MANAFI, 2002). Dies führt zu wässrigen teils blutigen und schleimigen Durchfällen (NATARO und KAPER, 1998). Zur Auslösung einer Erkrankung müssen mindestens 10^6 - 10^{10} Keime aufgenommen werden (ZANGERL, 2006b). EIEC besitzen eine enge biochemische, genetische und pathogenetische Verwandtschaft mit *Shigella* (BÜLTE, 2004).

Diffus adhärenzte *E. coli* (DAEC) werden als Verursacher wässriger Diarrhoeausbrüche bei Kindern, die älter als 12 Monate sind, beschrieben (NATARO und KAPER, 1998).

Enter aggregative *E. coli* (EAggEC) werden immer häufiger mit persistierenden Durchfallerkrankungen bei Kindern und Erwachsenen in Verbindung gebracht. Weltweit können mehrere Krankheitsausbrüche auf EAggC zurückgeführt werden (KAPER *et al.*, 2004). Detaillierte Angaben zu den genannten und weiteren pathogenen *E. coli* können den Arbeiten von NATARO und KAPER (1998) und KAPER *et al.* (2004) entnommen werden.

2.2.2.3 Lebensmittelinfektionen durch pathogene *E. coli* in Milch und Frischkäse

Im Jahr 2007 wurden in Deutschland 6.401 Erkrankungs-Fälle durch darmpathogene *E. coli* (ohne EHEC) erfasst. Erkrankungen durch EHEC (außer HUS) wurden in 848 Fällen gemeldet (RKI, 2008b). Infektionen des Menschen mit pathogenen *E. coli*, die auf den Verzehr von Milch und Milcherzeugnissen zurückzuführen sind, wurden in der Literatur vielfach beschrieben. Einige Berichte über Lebensmittelinfektionen mit VTEC durch Milch und Frischkäse sind in Tabelle 2.8 zusammengestellt. Die dort aufgeführten Fälle zeigen, dass vor allem Rohmilch bzw. Rohmilcherzeugnisse und rekontaminierte Produkte ein Infektionsrisiko darstellen. Häufig waren Kinder erkrankt, Todesfälle wurden nicht verzeichnet. Weitere Erkrankungs-Fälle durch pathogene *E. coli* nach dem Verzehr von kontaminierter Milch und kontaminierten Milchprodukten sind bei AMMON (1997), DE BUYSER *et al.* (2001), HUSSEIN und SAKUMA (2005) beschrieben. Neben Milch stellen auch Rindfleisch, Wurst, Apfelsaft, Sprossen, Salate sowie kontaminiertes Wasser und direkter Tier- oder Personenkontakt häufige Infektionsquellen dar (AMMON, 1997).

Tabelle 2.8: Lebensmittelinfektionen mit VTEC durch Milch und Frischkäse

Land*	Jahr	Infektionsquelle	Serovar	Fälle	Bemerkungen	Referenzen
USA	1986	Rohmilch	O157:H7	2	-	MARTIN <i>et al.</i> , 1986
DE	1994	Rohmilch	O157	15	daneben Rind- und Hähnchenfleisch mögliches Vehikel	STÖRMANN <i>et al.</i> , 1996
GB	1994	pasteurisierte Milch	O157:H7	> 100	Rekontamination in Leitung, die Milch zur Abfüllanlage geführt hat	UPTON und COIA, 1994
USA	1994	pasteurisierte Milch	O104:H21	18	Rekontamination in Molkerei nach Pasteurisation	MOORE <i>et al.</i> , 1995
USA	1993	Rohmilch	O157:H7	14	-	KEENE <i>et al.</i> , 1997
DK	2003 - 2004	pasteurisierte Milch	O157:H-	25	Milch von Jersey-Kühen, die als Vollmilch pasteurisiert und danach erst fraktioniert wurde	JENSEN <i>et al.</i> , 2006
DE	2006	Rohmilch	„O80:H“	59	in mindestens drei Fällen wurde <i>E. coli</i> O80:H ⁻ nachgewiesen	RKI, 2008a
FR	1992 - 1993	Rohmilch-Frischkäse aus Kuh- und Ziegenmilch	Non-O157:H7	4	<i>E. coli</i> O157:H7 nicht nachgewiesen; keine weitere Serotypisierung durchgeführt	DESCHÊNES <i>et al.</i> , 1996
USA	1998	Rohmilch-Frischkäse	O157:H7	55	fälschlicherweise als aus pasteurisierter Milch hergestellter Frischkäse deklariert	DURCH <i>et al.</i> , 2000
FR	2004	Rohmilch-Frischkäse aus Ziegenmilch	O157:H7	3	-	ESPIÉ <i>et al.</i> , 2006

* DE = Deutschland; GB = Großbritannien; DK = Dänemark; FR = Frankreich

2.2.2.4 Vorkommen und Bedeutung von *E. coli* in Milch und Frischkäse

Da *E. coli* ein normaler Bestandteil der Darmflora von Rindern ist, kann eine Kontamination der Rohmilch durch fäkale Verunreinigung bei der Milchgewinnung stattfinden. Eine direkte Kontamination kann durch intramammäre Sekretion erfolgen (GILMOUR und ROWE, 1981; JAYARAO und WANG, 1999). Untersuchungen zum Vorkommen von *E. coli* in Bestandmilch ergaben Kontaminationsraten von bis zu 99 % (Tabelle 2.9). Hierbei lag der Keimgehalt von *E. coli* bei der Mehrzahl der Proben deutlich unter 10^2 KbE/g. Trotz des häufigen Vorkommens von *E. coli* in Bestandmilch, ist der Anteil von pathogenen *E. coli* sehr gering (JAYARAO und WANG, 1999; SCVPH, 2003b). Bei den in Tabelle 2.9 aufgeführten Studien lag die Nachweishäufigkeit von VTEC in Bestandmilchproben zwischen 0 % und maximal 4 %.

Durch die Pasteurisation wird *E. coli* sicher abgetötet, so dass das Vorkommen von *E. coli* in wärmebehandelten Produkten selten ist und meist das Ergebnis entweder einer unzureichenden Pasteurisation oder einer Rekontamination. Die Einhaltung der Personal- und Prozesshygiene ist daher eine der wichtigsten Maßnahmen zur Verhinderung von *E. coli*-Infektionen durch Lebensmittel (RIEMELT *et al.*, 1996; VAN KESSEL *et al.*, 2004). Die Sensibilität von *E. coli* insbesondere VTEC gegenüber der Wärmebehandlung wird durch viele Faktoren wie u. a. dem Fettgehalt des Produktes beeinflusst. Je höher der Fettgehalt, desto höher die thermale Resistenz, da im Fett suspendierte Bakterienzellen allgemein schwieriger zu zerstören sind (BUCHANAN und DOYLE, 1997). So war der Fettgehalt der Milch auch bei mehreren Erkrankungsfällen in Dänemark von Bedeutung (Tabelle 2.8). In den Jahren 2003/2004 erkrankten dort 25 Personen durch VTEC, nachdem sie Milch von Jersey-Kühen konsumiert hatten. Hierbei handelte es sich zwar um pasteurisierte Milch, jedoch war diese als Vollmilch einer Wärmebehandlung unterzogen worden und erst danach in die verschiedenen Fraktionen aufgetrennt worden (JENSEN *et al.*, 2006). Hinsichtlich der Lagerung von Milch ist zu beachten, dass auch bei niedrigen Temperaturen (8 °C) eine Vermehrung von *E. coli* stattfinden kann und dass daher bei der Kühlagerung Temperaturen von mindestens ≤ 5 °C eingehalten werden sollten (MASSA *et al.*, 1999).

Tabelle 2.9: Vorkommen von *E. coli* bzw. VTEC in Bestandsmilch (Kuhmilch)

Probenherkunft ¹⁾	Anzahl Proben	Anzahl positiv	% positiv	KbE/g: Anzahl der Proben ²⁾	Referenzen
Vorkommen von <i>E. coli</i>					
FR	69	k.A. ³⁾	k.A.	$\leq 10^1$: 56 Max: $6,4 \times 10^2$	DESMASURES <i>et al.</i> , 1997
DE	74	44	59 %	$< 9,3 \times 10^0$: 70 Max: $4,6 \times 10^1$	HAHN <i>et al.</i> , 1999a
GB	500 ⁴⁾	495	99 %	$< 10^2$: 479	COIA <i>et al.</i> , 2001
CZ	111	49	44 %	Max: $> 3 \times 10^3$	SCHLEGELOVÁ <i>et al.</i> , 2002
BE	143	122	85 %	$\leq 10^1$: 67 $> 10^1 - \leq 10^2$: 63 $> 10^2 - \leq 10^3$: 13	DE REU <i>et al.</i> , 2004
USA	859	798	93 %	k.A.	VAN KESSEL <i>et al.</i> , 2004
Vorkommen von VTEC					
USA	1720	15	0,87 %	k.A.	STEELE <i>et al.</i> , 1997
IT	100	0	0 %	k.A.	MASSA <i>et al.</i> , 1999
DE	74	0	0 %	k.A.	HAHN <i>et al.</i> , 1999a
GB	500	0	0 %	k.A.	COIA <i>et al.</i> , 2001
USA	268	2	0,75 %	k.A.	MURINDA <i>et al.</i> , 2002
BE	143	1	0,7 %	k.A.	DE REU <i>et al.</i> , 2004
USA	131	5	3,8 %	k.A.	JAYARAO und HENNING, 2001

¹⁾ FR = Frankreich; DE = Deutschland; GB = Großbritannien;
CZ = tschechische Republik; BE = Belgien; IT = Italien

²⁾ bzw. maximaler (Max) Keimgehalt in KbE/g

³⁾ k.A. = keine Angabe

⁴⁾ ab Hof bezogene Proben, nicht als Bestandsmilch bezeichnet

In Tabelle 2.10 sind einige Untersuchungsergebnisse zum Vorkommen von *E. coli* und VTEC in Frischkäse zusammengefasst. Bei den dort aufgeführten Proben handelt es sich überwiegend um Rohmilchprodukte. Zwischen 2 % und 86 % der Frischkäse ergaben den Nachweis von *E. coli*. Der maximale Keimgehalt für *E. coli* lag bei $1,1 \times 10^6$ KbE/g.

Tabelle 2.10: Untersuchungen zum Vorkommen von *E. coli* und VTEC in Frischkäse

Probenherkunft ¹⁾	Anzahl Proben	Anzahl (%) positiv	KbE/g: Anzahl der Proben ²⁾	Behandlung der Milch ³⁾	Tierart ⁴⁾	Referenzen
Vorkommen von <i>E. coli</i>						
DE	35	30 (86 %)	Med: $1,5 \times 10^1$ Max: $1,1 \times 10^6$	R	K	HAHN <i>et al.</i> , 1999b; COENEN, 2000
BE	8	1 (12,5 %)	$< 10^1$: 7 $2,4 \times 10^2$: 1	R	Z	DE REU <i>et al.</i> , 2002
AT	74	k.A. ⁵⁾	$< 10^4$: 67 $\geq 10^4$ - 10^5 : 7	R	K	PFLEGER, 2001
BE	4	1 (25 %)	$< 10^3$: 1	R	K	DE REU <i>et al.</i> , 2004
IE	125	2 (1,6 %)	$< 10^2$: 123 10^2 - $< 10^3$: 2	P	k.A. ⁵⁾	FSAI, 2005
DE	44	5 (11 %)	10^0 - 10^1 : 3 $> 10^1$ - 10^2 : 1 $> 10^2$ - 10^3 : 1	R, P	Z	OELLIG, 2006
GB	62	2 (3 %)	$< 10^4$: 60 10^4 - $< 10^5$: 0 $\geq 10^5$: 2	R, T	K	LITTLE <i>et al.</i> , 2008
	412	9 (2 %)	$< 10^2$: 403 10^2 - $< 10^3$: 6 $\geq 10^3$: 3	P	K	
Vorkommen von VTEC						
DE	35	0 (0 %)	-	R	K	HAHN <i>et al.</i> , 1999b
BE	8	0 (0 %)	-	R	Z	DE REU <i>et al.</i> , 2002
BE	4	0 (0 %)	-	R	K	DE REU <i>et al.</i> , 2004
ES	91	2 (2,2 %)	-	k.A.	S	REY <i>et al.</i> , 2006
	12	2 (16,7 %)	-	k.A.	Z	

¹⁾ DE = Deutschland; BE = Belgien; AT = Österreich; IE = Irland; GB = Großbritannien; ES = Spanien

²⁾ bzw. medianer (Med), maximaler (Max) Keimgehalt in KbE/g

³⁾ R = Rohmilch; R, T = Rohmilch, thermisiert; P = pasteurisierte Milch

⁴⁾ K = Kuhmilch; Z = Ziegenmilch; S = Schafmilch

⁵⁾ k.A. = keine Angabe

VTEC waren in der Mehrzahl der untersuchten Proben nicht nachweisbar. Lediglich bei REY *et al.* (2006) ergaben zwei von 91 Schafmilch-Frischkäsen sowie zwei von 12 Ziegenmilchfrischkäsen ein positives Ergebnis für VTEC. HAHN *et al.* (1999b) führten die geringe Nachweisrate von VTEC in Frischkäse auf den Herstellungsprozess zurück, bei dem durch die Dicklegung der Milch die Anzahl der Erreger unter die Nachweisgrenze gesenkt wird und bei dem die Herstellung und Verarbeitung in einem leicht zu reinigenden und zu desinfizierenden geschlossenen System stattfindet. Eine Rekontamination von Frischkäse mit pathogenen *E. coli* wie *E. coli* O157:H7 kann jedoch in Anbetracht der geringen infektiösen Dosis und der Fähigkeit des Organismus in sauren Lebensmitteln zu überleben ein Gesundheitsrisiko darstellen (LEKKAS *et al.*, 2006).

Untersuchungen von AROCHA *et al.* (1992) zeigten, dass während der Herstellung von Frischkäse (Hüttenkäse) eine Vermehrung von *E. coli* O157:H7 um bis zu 10^2 KbE/g stattfinden kann. Durch die Wärmebehandlung des Bruchs und der Molke (57 °C für 1,5 h) wurde jedoch eine vollständige Inaktivierung des Erregers erreicht. Auch bei VECCHIONACCE *et al.* (1978) und HUDSON *et al.* (1997) führte die Erhitzung des Bruchs während der Hüttenkäse-Herstellung auf 54 °C bzw. 56 °C zu einer sicheren Abtötung von *E. coli* O157:H7 bzw. von *E. coli* ATCC 9637.

SIMS *et al.* (1989) konnten während der Lagerung von Hüttenkäse bei 7 °C, 10 °C und 25 °C über maximal 14 Tage kein Wachstum von enteropathogenen oder anderen *E. coli* feststellen. In einigen Fällen wurde sogar ein Abfall des Keimgehaltes beobachtet. Die Ergebnisse führten die Autoren auf den niedrigen pH-Wert zwischen 4,5 und 5,1 zurück.

Untersuchungen von SAAD *et al.* (2001) zum Einfluß der Starterkulturen auf das Wachstum von *E. coli* O157:H7 zeigten, dass in Frischkäse, der ohne Starterkulturen hergestellt worden war, der Keimgehalt nach 24 h bei 8,5 °C um bis zu 10^2 KbE/g anstieg. Während der folgenden 14-tägigen Lagerung blieb der Keimgehalt relativ konstant. In Frischkäse, der mit Starterkulturen hergestellt worden war, konnte zwar zunächst auch ein Anstieg des Keimgehaltes beobachtet werden, jedoch höchstens um 0,5 KbE/g. Außerdem kam es während der Lagerung zu einem Abfall der Keimzahl. Andere Faktoren wie die Herstellung aus Rohmilch oder pasteurisierter Milch bzw. mit oder ohne Salz führten zu keinem signifikanten Unterschied des Gehalts von *E. coli* O157:H7. MENDOZA-YEPES *et al.* (1999) konnten in Frischkäse während der Lagerung bei 3 °C über 20 Tage kein

Wachstum von *E. coli* O157:H7 feststellen. Wenn die Käse ohne Zusatz von Starterkulturen hergestellt worden waren, wurde jedoch bei 7 °C eine Vermehrung von *E. coli* O157:H7 beobachtet. Hierbei lag die Wachstumsrate bei 0,92 log KbE/g/d. Nach acht Tagen wurde ein Keimgehalt von über 10⁷ KbE/g erreicht. In Frischkäse mit Zusatz von Starterkulturen fand keine Vermehrung von *E. coli* statt. KASRAZADEH und GENIGEORGIS (1995) konnten auch in Frischkäsen ohne Zusatz von Starterkulturen während der Lagerung (8 °C für 60 Tage) kein Wachstum von *E. coli* O157:H7 nachweisen, stattdessen wurde sogar ein Abfall des Keimgehaltes um bis zu 10² KbE/g beobachtet. Bei höheren Lagerungstemperaturen (10, 12, 16, 20 und 30 °C) wurde eine Vermehrung von *E. coli* beobachtet. Durch Absenkung des pH-Wertes mit Kaliumsorbat von pH 6,6 auf pH 5,9 war dagegen sogar bis einschließlich 16 °C keine Vermehrung von *E. coli* möglich.

LEKKAS *et al.* (2006) untersuchten den Einfluß der Frischkäse-Herstellung auf das Wachstum von *E. coli* O157:H7. Hierbei verglichen sie industriell gefertigte Frischkäse (pH 3,7 ± 0,1) mit Frischkäsen, die nach traditioneller Art hergestellt worden waren (pH 3,9 ± 0,1). Diese wurden über 28 Tage bei 4 °C und 12 °C gelagert. Bei industriellen Frischkäsen fiel der Keimgehalt deutlich schneller ab und nach 14 Tagen bei 4 °C konnte *E. coli* nicht mehr nachgewiesen werden. Traditionell hergestellte Käse hingegen ergaben noch nach 28 Tagen einen positiven Nachweis.

Die aufgeführten Ergebnisse zum Verhalten von *E. coli* während der Herstellung und Lagerung von Frischkäse zeigen, dass die Einhaltung niedriger Temperaturen, eines niedrigen pH-Wertes bzw. die Gegenwart von Starterkulturen und die Herstellungsweise zu den Hauptfaktoren gehören, um das Wachstum von *E. coli* zu kontrollieren.

2.2.3 Rechtliche Grundlagen für *Enterobacteriaceae*, coliforme Keime und *E. coli*

Die aktuellen EU-Vorschriften beinhalten weder für *Enterobacteriaceae* noch für coliforme Keime in Käse mikrobiologische Kriterien. Die zuvor geltende Milchverordnung (Verordnung über Hygiene- und Qualitätsanforderungen an Milch und Erzeugnisse auf Milchbasis) enthielt lediglich Grenzwerte für den Coliformen-Gehalt in Weichkäse. Älteren Angaben zufolge befanden sich bei der IDF (International Dairy Federation)

Grenzwerte für Coliforme in Frischkäse in Höhe von $m = 100 \text{ KbE/g}$ und $M = 1000 \text{ KbE/g}$ ($n = 5$; $c = 2$) in Diskussion. Diese haben sich jedoch nicht durchgesetzt (BECKER und TERPLAN, 1987). Die Schweizer Hygieneverordnung in der Fassung vom 22. Februar 2000 (Verordnung über die hygienischen und mikrobiologischen Anforderungen an Lebensmittel, Gebrauchsgegenstände, Räume, Einrichtungen und Personal) gab für den *Enterobacteriaceae*-Gehalt in Frischkäse einen Toleranzwert von 10^3 KbE/g an. Diese Fassung ist allerdings nicht mehr in Kraft und die aktuelle Fassung (Hygieneverordnung des EDI vom 23. November 2005) entspricht den Vorgaben der VO (EG) Nr. 2073/2005. Lediglich für *E. coli* sind nach der VO (EG) Nr. 2073/2005 Grenzwerte vorgesehen (Tabelle 2.11). Die Überprüfung des Vorkommens von *E. coli* dient als Prozesshygienekriterium. Die mikrobiologischen Kriterien für *E. coli* orientieren sich an der Behandlung der zur Herstellung verwendeten Milch und nicht an der jeweiligen Käsegruppe. Im Fall unbefriedigender Ergebnisse (ein/mehrere gemessene Wert $\geq M$ oder mehr als c/n -Werte zwischen m und M) sind Verbesserungen in der Herstellungshygiene und bei der Auswahl der Rohstoffe vorzunehmen.

Tabelle 2.11: Grenzwerte (KbE/g) für *E. coli* in Käse gemäß VO (EG) Nr. 2073/2005 (Prozesshygienekriterium)

Lebensmittel- kategorie	Probennahme		Grenzwerte		Stufe, für die das Kriterium gilt
	n	c	m	M	
Käse aus Milch oder Molke, die einer Wärmebe- handlung unter- zogen wurden	5	2	100 KbE/g	1000 KbE/g	Zu einem Zeit- punkt der Her- stellung, zu dem der höchste <i>E. coli</i> -Gehalt erwartet wird ¹⁾

Erläuterung:

n = Anzahl der Probeneinheiten der Stichprobe

c = Anzahl der Probeneinheiten, deren Werte zwischen m und M liegen dürfen

m = Schwellenwert; das Ergebnis gilt als ausreichend, wenn die Keimzahl jeder einzelnen Probe den Wert „ m “ nicht übersteigt

M = Höchstwert; das Ergebnis gilt als nicht ausreichend, wenn die Keimzahl einer oder mehrerer Proben den Wert „ M “ erreicht oder überschreitet

¹⁾ Bei Käsen, die das Wachstum von *E. coli* nicht begünstigen, liegt der *E. coli*-Gehalt gewöhnlich zu Beginn des Reifungsprozesses am höchsten. Bei Käsen, die das Wachstum von *E. coli* begünstigen, trifft dies normalerweise am Ende des Reifungsprozesses zu.

Konkrete Beurteilungskriterien, die sich auf den akzeptablen *E. coli*-Gehalt in Frischkäse beziehen, sind aus den Empfehlungen der Europäischen Kommission für ein koordiniertes Programm zur amtlichen Lebensmittelüberwachung für 2004 bzw. für 2005 (2004/24/EG bzw. 2005/175/EG) abzuleiten (Tabelle 2.12).

Tabelle 2.12: Beurteilungskriterien (KbE/g) für *E. coli* in Frischkäse gemäß den Empfehlungen 2004/24/EG und 2005/175/EG

Frischkäse hergestellt aus	Probennahme		Beurteilungskriterien	
	n	c	m	M
roher oder thermisierter Milch	5	2	10.000 KbE/g	100.000 KbE/g
pasteurisierter Milch	5	2	100 KbE/g	1000 KbE/g

Erläuterung:

n = Anzahl der Probeneinheiten der Stichprobe

c = Anzahl der Probeneinheiten, deren Werte zwischen m und M liegen dürfen

m = Schwellenwert; das Ergebnis gilt als ausreichend, wenn die Keimzahl jeder einzelnen Probe den Wert „m“ nicht übersteigt

M = Höchstwert; das Ergebnis gilt als nicht ausreichend, wenn die Keimzahl einer oder mehrerer Proben den Wert „M“ erreicht oder überschreitet

Hinsichtlich des Vorkommens Verotoxin-bildender *E. coli* wird durch die VO (EG) Nr. 2073/2005 (Abs. 2) generell festgelegt, dass Lebensmittel keine Mikroorganismen oder deren Toxine oder Metaboliten in Mengen enthalten sollten, die ein für die menschliche Gesundheit unannehmbares Risiko darstellen. Nach einer Stellungnahme des SCVPH (Scientific Committee on Veterinary Measures relating to Public Health) führt die Anwendung eines mikrobiologischen Standards für VTEC O157 auf das Endprodukt wahrscheinlich nicht zu einer bedeutenden Verringerung des damit verbundenen Risikos für den Verbraucher, so dass stattdessen mikrobiologische Leitlinien zur allgemeinen Verringerung der Fäkalkontamination auf allen Stufen der Lebensmittelkette empfohlen werden, die zu einer Verringerung des VTEC-Risikos beitragen (Abs. 14, VO (EG) Nr. 2073/2005). Sollte ein Lebensmittel einen positiven Befund für VTEC ergeben, so darf es nicht in den Verkehr gebracht werden. Gegebenenfalls ist es zurückzurufen oder vom Markt zu nehmen.

2.2.4 Nachweis von *Enterobacteriaceae*, coliformen Keimen und *E. coli* unter Verwendung von selektiven Nährmedien

Eines der klassischen Selektivnährmedien zum Nachweis von *Enterobacteriaceae* ist der Kristall-Violett-Galle-Glukose-Agar (VRBG-Agar) (MOSSEL, 1985). Dieser basiert auf einem fermentierbaren Kohlenhydrat (Glukose) und einem pH-Indikator (Neutralrot) (BLOOD und CURTIS, 1995). Als Flüssigmedium wird häufig die *Enterobacteriaceae*-Enrichment-Bouillon (E.E.B) verwendet, die ebenfalls Glukose enthält. Vor der eigentlichen Beimpfung dieser Medien bedarf es eines (nicht-selektiven) Anreicherungsschrittes, da die Bakterien in der Regel sublethal geschädigt sind, wodurch ihr Wachstum auf Selektivmedien gehemmt ist (MOSSEL, 1985; BLOOD und CURTIS, 1995). Durch ihre spezifischen Enzymaktivitäten können *E. coli* und andere Coliforme auch über die Umsetzung fluorogener oder chromogener Substrate nachgewiesen werden. Dies sind sehr sensitive Methoden, die eine höhere Genauigkeit aufweisen und einen schnelleren Nachweis von Bakterien ermöglichen. Eine Identifizierung von *E. coli* und anderen Coliformen kann in der Regel noch auf dem Isolationsmedium durchgeführt werden, so dass auf das Anlegen von Subkulturen sowie zeitaufwendige Bestätigungsreaktionen verzichtet werden kann (MANAFI *et al.*, 1991; MANAFI, 1996). Im Folgenden sollen die hierbei verwendeten Enzymsysteme erläutert werden.

Das wichtigste Kriterium für den Nachweis von coliformen Keimen ist die Verwertung von Laktose. Die Aufspaltung dieses Disacharids in Glukose und Galaktose wird durch das Enzym β -D-Galactosidase katalysiert. Der Laktose-Abbau wird meist anhand von Säure- oder Gasproduktion nachgewiesen (MANAFI, 1996; GEISSLER *et al.*, 2000). Für *E. coli* ist der Nachweis der β -D-Glucuronidase (GUD) spezifisch (MANAFI, 2002). Dieses Enzym katalysiert die Hydrolyse von β -D-Glukopyranosiduronsäure-Derivaten in ihre korrespondierenden Aglykone und D-Glukuronsäure (ROMPRÉ *et al.*, 2002). Etwa 94-96 % der *E. coli*-Isolate zeigen Glucuronidase-positive Reaktionen (DAHLÉN und LINDE, 1973; FENG und HARTMAN, 1982; HANSEN und YOURASSOWSKY, 1984; EDBERG und KONTRICK, 1986; KASPAR *et al.*, 1987). Einige darmpathogene *E. coli* wie *E. coli* O157:H7 besitzen allerdings keine β -D-Glucuronidase und können daher nicht über dieses Enzyms detektiert werden (MANAFI, 2002). Seltener wird bei anderen *Enterobacteriaceae* wie *Shigella* (44-58 %), *Salmonella* (20-29 %) oder *Yersinia* GUD-Aktivität beobachtet (FENG und HARTMAN, 1982; ROMPRÉ *et al.*, 2002).

Verschiedene fluorogene und chromogene Medien basieren auf dem parallelen Nachweis der β -D-Galactosidase und der β -D-Glucuronidase. Aufgrund ihrer unterschiedlichen Enzymausstattung können Gesamt-Coliforme und *E. coli* gleichzeitig nachgewiesen werden (MANAFI, 2000; GEISSLER *et al.*, 2000; ROMPRÉ *et al.*, 2002). In fluorogenen Medien ist eines der am häufigsten verwendeten Substrate das 4-Methylumbelliferyl- β -D-Glucuronid (MUG), das die Messung der Glucuronidase-Aktivität von *E. coli* ermöglicht. Die β -D-Glucuronidase hydrolysiert MUG zu 4-Methylumbelliferon, das bei Bestrahlung mit langwelligem UV-Licht (366 nm) blau fluoresziert. MUG ist sowohl in flüssigen Medien wie z. B. der Lauryl-Sulfat-Bouillon (LST-MUG) als auch in festen Medien wie dem Kristallviolett-Galle-Laktose-Agar (VRB-MUG) enthalten (MANAFI, 2000). Die Erfassung der Gesamt-Coliformen erfolgt in diesen Medien über die Verwertung von Laktose. Deren Abbau durch die Galactosidase wird als Gasbildung (LST-MUG) oder als Säurebildung (VRB-MUG) mittels eines pH-Indikators angezeigt. Andere fluorogene Substrate neben MUG sind β -Naphthylamin (β -NAP) und 7-Amino-4-Methylcoumarin (7-AMC) (MANAFI, 1996). Außerdem kann unter Verwendung einer LST-MUG-Bouillon mit der Zugabe von Tryptophan eine positive Fluoreszenz für den Nachweis von *E. coli* durch Überprüfung der Indol-Reaktion ergänzt werden und auf diese Weise weitere Bestätigungsreaktionen ersparen (GEISSLER *et al.*, 2000).

Bei chromogenen Nährmedien sind Kolonien von *E. coli* und Coliformen aufgrund ihrer spezifischen Enzymsysteme unterschiedlich gefärbt (ZANGERL und FRIEDL, 2001). Chromogene Enzymsubstrate enthalten meist Phenol-Derivate wie O- und P-Nitrophenol (ONP, PNP), P-Nitroanilin (PNA), Indoxyl-(Y), 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-(X), 5-Bromo-6-Chloro-3-Indolyl-(Mangenta), 6-Chloro-3-Indolyl-(Salmon), N-Methylindolyl-(Grün) oder 5-Jod-3-Indolyl-(Jod)-Komponenten (MANAFI, 1996). Ein Beispiel eines chromogenen Mediums, das den gleichzeitigen Nachweis von *E. coli* und Coliformen ermöglicht, ist der selektive *E. coli*/Coliformen-Chromogen-Agar (ECC-Agar), der zwei chromogene Substrate enthält: Rose-Galactopyranosid für den Nachweis der β -D-Galactosidase und X-Glucuronid für den Nachweis der β -D-Glucuronidase. Während Coliforme nur Rose-Galactopyranosid spalten, spaltet *E. coli* beide Chromogene, so dass nach Einlagerung der farbigen Spaltprodukte Coliforme rosa und *E. coli* violett gefärbte Kolonien ergeben. Neben den Erwähnten gibt es viele weitere fluorogene und chromogene Nährmedien für den Nachweis von *E. coli* und Coliformen. Eine Übersicht über die Eigenschaften dieser Medien kann der Arbeit von MANAFI (2000) entnommen werden.

2.3 *Listeria monocytogenes*

2.3.1 Systematik

Listeria (L.) monocytogenes gehört zur Gattung *Listeria* und wird nach BERGEY'S Manual of Systematic Bacteriology (SEELIGER und JONES, 1986) der Gruppe der regelmäßigen, nicht-sporenbildenden, grampositiven Stäbchenbakterien zugeordnet. Die Gattung *Listeria* umfasst derzeit sechs Spezies, dazu gehören neben *L. monocytogenes* außerdem *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. innocua*, *L. welshimeri* und *L. grayi* (ROCOURT, 1988; ROCOURT *et al.*, 1992; VÁZQUEZ-BOLAND *et al.*, 2001). Die größte Bedeutung als Krankheitserreger, sowohl beim Mensch als auch beim Tier, hat *L. monocytogenes* (McLAUHLIN *et al.*, 2004). Erkrankungen durch *L. ivanovii* (CUMMINS *et al.*, 1994; LOW und DONACHIE, 1997) und *L. seeligeri* (ROCOURT *et al.*, 1987) sind nur in sehr seltenen Fällen beschrieben worden. *L. innocua* wurde nur im Zusammenhang mit Infektionen bei Tieren erwähnt (WALKER *et al.*, 1994). *L. welshimeri* und *L. grayi* wurden bisher noch nicht als Krankheitserreger beschrieben (McLAUHLIN *et al.*, 2004).

Eine serologische Differenzierung der Listerien-Spezies kann anhand von 15 spezifischen O-(Oberflächen)-Antigenen und vier an den Geißeln befindlichen H-Antigenen (A-D) vorgenommen werden (SEELIGER und JONES, 1986). Innerhalb der Spezies *L. monocytogenes* werden 13 Serovare unterschieden. Im Falle von Erkrankungen werden am häufigsten die Serovare 1/2a, 1/2b und 4b isoliert (McLAUHLIN *et al.*, 2004). Nach FARBER und PETERKIN (1991) sind sie für 90 % der humanen Listeriose-Fälle verantwortlich, nach LIU (2006) sogar für 98 %. Dies sind jedoch nicht die am häufigsten aus der Umwelt oder aus Lebensmitteln isolierten Serovare (McLAUHLIN *et al.*, 2004).

2.3.2 Allgemeine Charakterisierung

2.3.2.1 Morphologie, kulturelle und biochemische Eigenschaften

Listerien sind 0,4-0,5 µm breite und 0,5-2 µm lange, grampositive (in älteren Kulturen oft gramlabile) Stäbchenbakterien. Sie sind Katalase-positiv und Oxidase-negativ und können Äsculin hydrolysieren. Sie kommen einzeln und in kurzen Ketten, V-förmig oder

palisadenförmig aneinandergereiht vor. Durch peritrich angeordnete Geißeln sind Listerien beweglich (SEELIGER und JONES, 1986). Es werden insgesamt bis zu fünf Geißeln ausgebildet (BILLE und DOYLE, 1991). Die Ausbildung der Geißeln und die damit einhergehende Beweglichkeit sind nach Bebrütungstemperaturen von 20-25 °C am ausgeprägtesten (TERPLAN *et al.*, 1986a), während bei 37 °C (Körpertemperatur) die Entwicklung der Geißeln so gering sein kann, dass die Listerien unbeweglich erscheinen (SEELIGER und JONES, 1986; HOF, 1999).

Auf einem nicht-selektiven Nähragar bilden Listerien 0,5-1,5 mm große, runde, leicht konvexe, durchscheinende Kolonien, die bei normaler Beleuchtung bläulich-grau erscheinen und bei schräg auftreffendem Licht charakteristisch blau-grün schimmern. *L. monocytogenes* wächst auf Blutagar unter Ausbildung einer schmalen Zone einer β -Hämolyse. Eine positive CAMP-Reaktion wird mit *Staphylococcus aureus* beobachtet, jedoch nicht mit *Rhodococcus equi*. Durch die Hämolyse, das CAMP-Phänomen und die Umsetzung von Rhamnose und Mannose unter Säurebildung (jedoch nicht von Xylose und Mannit) kann *L. monocytogenes* biochemisch von den anderen Spezies der Gattung *Listeria* differenziert werden (SEELIGER und JONES, 1986).

2.3.2.2 Vorkommen und Wachstumseigenschaften

Listerien sind in der Umwelt weit verbreitet und kommen u. a. im Erdboden (vermutlich das natürliche Reservoir), in Pflanzen, Silage, Gewässern, Abwasser und Schlachthofabfällen (GRAY und KILLINGER, 1966; BILLE und DOYLE, 1991) sowie im Magen-Darm-Trakt und Kot gesunder Menschen und Tiere vor (SEELIGER und JONES, 1986). *L. monocytogenes* wurde bisher sowohl aus rohen und zubereiteten Lebensmitteln (einschließlich Molkereiprodukten, Fleisch, Gemüse, Meeresfrüchte) als auch aus der Umgebung lebensmittelverarbeitender Betriebe isoliert (BILLE und DOYLE, 1991). Da Listerien relativ anspruchslos sind, vermehren sie sich auch unter Bedingungen, die für andere humanpathogene Bakterien oft wenig tolerierbar sind (RKI, 2006).

Optimale Wachstumsbedingungen sind bei Temperaturen im Bereich zwischen 30 °C und 37 °C gegeben (SEELIGER und JONES, 1986). Der Temperaturbereich, in dem sich *L. monocytogenes* vermehren kann, reicht bei ansonsten optimalen

Wachstumsbedingungen von $-0,4\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis $+45\text{ }^{\circ}\text{C}$. Das bedeutet, dass auch bei Kühltemperaturen eine Vermehrung stattfinden kann, allerdings hängt dies auch von anderen Faktoren wie dem Vorhandensein einer kompetitiven Flora, insbesondere Bacteriocin-produzierenden Laktobazillen, dem pH-Wert und der Salzkonzentration des Milieus ab (RKI, 2003). Einige Berichte zeigen, dass die Virulenz von *L. monocytogenes* eher nach einer Inkubation bei niedrigeren Temperaturen als nach Inkubation bei höheren Temperaturen erhöht ist. Es ist möglich, dass die Lagerung bei Kühlschranktemperaturen die Virulenz von *L. monocytogenes* noch verstärkt (GALDIERO *et al.*, 1997).

Listerien können unter aeroben und fakultativ anaeroben Bedingungen wachsen (SEELIGER und JONES, 1986). Das beste Wachstum wird jedoch in einer Atmosphäre mit einem erhöhten CO_2 -Gehalt von 5-10 % und einem reduzierten Sauerstoffgehalt beobachtet (SMITH, 1983; PEARSON und MARTH, 1990).

Hinsichtlich der pH-Ansprüche wächst *L. monocytogenes* am besten in einem neutralen bis leicht alkalischen Milieu (SEELIGER und JONES, 1986; PEARSON und MARTH, 1990). Gegenüber Schwankungen des pH-Wertes zeigt sich *L. monocytogenes* relativ unempfindlich und eine Vermehrung findet noch bei pH-Werten zwischen 4,4 und 9,4 statt (SCVPH, 1999; RKI, 2003). Der minimale pH-Wert, bei dem noch Wachstum stattfindet, wird durch die Temperatur und die Art der Säure beeinflusst (GALDIERO *et al.*, 1997).

Listerien zeigen eine hohe Salztoleranz und können noch bei Konzentrationen von 10 % Kochsalz wachsen. Einige Stämme tolerieren über einen längeren Zeitraum sogar Salzgehalte von 20 % (SEELIGER und JONES, 1986). Da der Salzgehalt auch Einfluss auf den a_w -Wert hat, kann dementsprechend auch noch bei niedrigen a_w -Werten zwischen 0,90 und 0,93 ein Wachstum von *L. monocytogenes* verzeichnet werden (SCVPH, 1999).

2.3.3 *Listeria monocytogenes* als Krankheitserreger

Infektionen des Menschen mit Listerien werden fast ausschließlich durch *L. monocytogenes* verursacht. Bei einer aufgrund des ubiquitären Vorkommens recht häufigen Exposition kommt es nur vergleichsweise selten zu manifesten Erkrankungen (RKI, 2006). Bei 1 % bis 30 % aller Menschen findet man Listerien im Stuhl (HOF, 1999).

Es ist anzunehmen, dass die Krankheit in manchen Fällen unerkannt bleibt, da die Symptome vielfältig und unspezifisch sind. Vorwiegend sind Personen betroffen, deren Immunsystem nicht voll funktionstüchtig bzw. supprimiert ist (TERPLAN *et al.*, 1986a). Dazu zählen u. a. alte und kranke Menschen, Schwangere und deren un- und neugeborene Kinder (HOF, 1999). Die Bedeutung der Listeriose ergibt sich aus einem hohen individuellen Risiko für die Erkrankten. So liegt die Mortalitätsrate bei einer systemischen Listeriose zwischen 20 % und 40 %. Es ist eine sehr deutliche Zunahme der in den letzten Jahren erfassten Krankheitsfälle zu verzeichnen, für die es bisher keine hinreichende Erklärung gibt (FARBER und PETERKIN, 1991; RKI, 2006).

Untersuchungen in den USA ergaben, dass jährlich etwa 2500 Menschen an einer Infektion mit *L. monocytogenes* erkranken und 500 Menschen an der Infektion versterben. In den USA macht die Listeriose zwar nur 0,02 % der lebensmittelbedingten Erkrankungen aus, allerdings ist sie für ca. 27 % der Todesfälle, die durch eine Lebensmittel-Infektion bedingt sind, verantwortlich (MEAD *et al.*, 1999). In Deutschland lag die Zahl der humanen Listeriose-Erkrankungen im Jahr 2005 bei 0,62 Krankheitsfällen pro 100.000 Einwohner (RKI, 2006). Im Jahr 2007 wurden 356 Erkrankungsfälle gemeldet (RKI, 2008c). Seit Einführung der Meldepflicht für Listeriose im Jahr 2001 (§ 7 Abs. 1 Nr. 28 IfSG) ist nach anfänglich konstanten Meldezahlen, im Jahr 2005 (510 Fälle) ein starker Anstieg der jährlich gemeldeten Fälle zu verzeichnen (HOF *et al.*, 2007). Zwar wurde 2004 die Falldefinition der Listeriose insofern geändert, dass zu jedem Neugeborenen mit labordiagnostischem Nachweis von *L. monocytogenes* die Mutter ebenfalls als klinisch-epidemiologisch bestätigte Erkrankung übermittelt wird (RKI, 2006), jedoch ist die Anzahl der infizierten Schwangeren und Neugeborenen relativ konstant geblieben. Die Zunahme der gemeldeten Fälle betrifft vor allem alte Menschen (> 60 Jahre) (HOF *et al.*, 2007). Eine Ursache könnte sein, dass die Zahl alter Menschen mit prädisponierenden Faktoren zunimmt. Veränderte lebensmittelbedingte Risiken könnten eine Rolle spielen oder ein verändertes Verbraucherverhalten. Eventuell greifen alte Menschen aus Bequemlichkeit häufiger zu fertiger, gekühlter Ware oder weisen im Umgang mit Lebensmitteln (Lagerung, Kontrolle der Haltbarkeit, Hygiene) eher Fehlverhalten auf (RKI, 2006).

Die minimale infektiöse Dosis für *L. monocytogenes* hängt von vielen Variablen ab, beispielsweise vom Immunstatus, von der Virulenz des Erregers, von der Art und Menge des kontaminierten Lebensmittels und von der Konzentration des Erregers im Lebensmittel

(SCVPH, 1999; McLAUHLIN *et al.*, 2004). Aufgrund der teilweise recht langen Inkubationszeit (3-70 Tage) kann die Erregermenge im Lebensmittel zum Zeitpunkt der Infektion oft nicht mehr ermittelt werden. Für Risikogruppen werden Keimgehalte zwischen 10^1 und 10^4 Kbe/g angegeben, für gesunde Erwachsene Dosen zwischen 10^5 bis 10^9 Kbe/g (RKI, 2006).

Große Bedeutung hat eine Infektion von Schwangeren. Schwangere haben im Vergleich zu anderen Erwachsenen ein zwölfmal höheres Risiko, an einer Listeriose zu erkranken (HOF, 1999), dabei weisen sie selbst oft nur wenig ausgeprägte Symptome auf, die einem kurzen, grippeähnlichen Schub ähneln. Die septische Ausbreitung während dieser Zeit kann jedoch zu einer Plazentitis und ausgehend davon zu einer intrauterinen Infektion des Fötus führen (SCHUCHAT *et al.*, 1991). Dies wird als „early-onset“-Form der neonatalen Listeriose bezeichnet (Mortalitätsrate von 38 %) und kann Ursache von Aborten, Totgeburten, Frühgeburten oder von Erkrankungen von Neugeborenen sein (Sepsis, Granulomatosis infantiseptica). Die „late-onset“-Form der neonatalen Listeriose (Mortalitätsrate von 26 %) ist durch eine Infektion während der Geburt bedingt und tritt erst einige Tage bis Wochen nach der Geburt auf. Sie manifestiert sich meist als Meningitis und kann zu bleibenden neurologischen Schäden führen (SCHUCHAT *et al.*, 1991; SCHLECH, 2000).

Bei immunkompetenten Menschen kommt es selten zu einer Infektion und noch seltener zu einer Erkrankung, die häufig nur als leichte, uncharakteristische fieberhafte Reaktion verläuft (RKI, 2003). Es kann eine selbst limitierende fieberhafte Gastroenteritis auftreten, die mit Übelkeit, Erbrechen und Diarrhö einhergeht (DOGANAY, 2003). Eine Listeriose bei Erwachsenen (Nicht-Schwangeren) kann sich als Meningitis, Encephalitis oder Sepsis manifestieren. Daneben sind Endokarditiden, Arthritiden, Osteomyelitiden, Abszesse sowie pleuropulmonäre Erkrankungen beschrieben (BILLE und DOYLE, 1991).

2.3.4 Listerien in Lebensmitteln

Aufgrund der weiten Verbreitung der Listerien in der Umwelt und der Fähigkeit auch bei Kühltemperaturen, in anaerober Atmosphäre, bei niedrigen pH-Werten und hohen Salzkonzentrationen zu wachsen (FARBER und PETERKIN, 1991), kann eine

Kontamination von Lebensmitteln mit Listerien auf vielen Stufen der Gewinnung und Bearbeitung erfolgen. In lebensmittelverarbeitenden Betrieben sind Listerien häufig als sogenannte „Hauskeime“ zu finden. Dort können sie zu einer Rekontamination der Lebensmittel führen, die bereits einem Listerien abtötenden Verfahren unterzogen worden sind (RKI, 2003). Der Verzehr von kontaminierten Lebensmitteln stellt einen der wichtigsten Übertragungswege für Listerien dar (FARBER und PETERKIN, 1991; SCVPH, 1999; JEMMI und STEPHAN 2006). Insbesondere (rohe) Lebensmittel tierischer Herkunft können während der Gewinnung kontaminiert werden (RKI, 2003). Zu diesen Lebensmitteln zählen Fleisch, Fleischerzeugnisse (z. B. Wurst wie Salami und Teewurst), Fisch, Fischerzeugnisse (z. B. Lachs, geräucherter Fisch), Muscheln sowie Milch und Milchprodukte (z. B. Weichkäse) (FARBER und PETERKIN, 1991; HOF, 2003; RAMASWAMY *et al.*, 2007). Neben Lebensmitteln tierischer Herkunft stellen auch pflanzliche Lebensmittel eine wichtige Infektionsquelle dar, insbesondere solche, die mit Erde, Staub bzw. tierischem Dünger in Berührung kommen. Hierzu zählen Kartoffeln, Radieschen, rohe Pilze und Salate (vor allem vorgeschnittene Salate und Krautsalat) (FARBER und PETERKIN, 1991; HOF 2003; RKI, 2006). Es besteht prinzipiell bei allen offenen Speisen, die nicht kurz vor Verzehr erhitzt worden sind, die Möglichkeit, dass diese mit Listerien kontaminiert sind (HOF, 2003; RKI, 2006). In Tabelle 2.13 sind einige Listeriose-Ausbrüche zusammengestellt, die auf den Verzehr von kontaminierten Lebensmitteln zurückzuführen sind.

In Europa sind kontaminierte Milchprodukte für fast die Hälfte aller bisher aufgetretenen Listeriose-Ausbrüche verantwortlich (RKI, 2006). Die FDA (2003) nimmt an, dass die prädiktive Anzahl der Listeriose-Fälle durch den Verzehr von Frischkäse bei 7,7 Fällen pro Jahr liegt. Dies bedeutet, dass durch den Verzehr von Frischkäse ein mittleres Risiko besteht, an einer Listeriose zu erkranken. Es gibt keine Berichte über Listeriose-Ausbrüche, die durch den Verzehr von Rahm-Frischkäse oder Hüttenkäse verursacht wurden (FDA, 2003). Es wurden jedoch Krankheitsausbrüche im Zusammenhang mit „Mexican-Style“-Frischkäse beobachtet. Hierbei handelt es sich um eine heterogene Gruppe von Frischkäsen, die durch Lab- oder Säurezugabe aber typischerweise ohne Starterkulturen hergestellt werden (TORRES und CHANDAN, 1981). Solche Käse werden in dieser Form in Deutschland (Mitteleuropa) nicht hergestellt (BECKER und TERPLAN, 1986a).

Tabelle 2.13: Ausbrüche lebensmittelbedingter Listeriosen beim Menschen (McLAUHLIN *et al.*, 2004; JEMMI und STEPHAN, 2006; SWAMINATHAN und GERNER-SMIDT, 2007)

Land	Jahr	Infektionsquelle	Fälle	Todesfälle
USA	1976	roher Salat*	20	5
Neuseeland	1980	rohe Meeresfrüchte/Fisch*	22	7
Kanada	1981	Krautsalat	41	18
USA	1983	pasteurisierte Vollmilch, Milch mit 2 % Fett*	49	14
USA	1985	Frischkäse mexikanischer Art aus unpasteurisierter Milch	142	30
Schweiz	1983-1987	Weichkäse	122	34
England	1987-1989	Pastete	355	94
USA	1989	Garnelen	2	NB
Dänemark	1989-1990	Blauschimmelkäse	26	7
Australien	1990	Pastete	9	NB
Australien	1991	geräucherte Muscheln	4	0
Neuseeland	1992	geräucherte Muscheln	4	1
Frankreich	1993	Schweinezunge in Aspik	279	NB
Frankreich	1993	Schweinefleisch schmalzgebacken	38	10
USA	1994	pasteurisierte Schokoladenmilch	45	0
Schweden	1994-1995	geräucherte Forelle	9	2
Frankreich	1995	Weichkäse	17	4
Kanada	1996	Krabbenfleisch	2	0
Italien	1997	Maissalat	1566	0
USA	1998-1999	Hot Dogs und Fleischdelikatessen	50	> 8
Finnland	1998-1999	Butter	25	6
Finnland	1999	geräucherte Forelle	5	NB
England	1999	Käse, Käse- und Salat-Sandwich	2	1
Frankreich	1999-2000	Schweinefleisch schmalzgebacken	10	2
USA	2000	Putenfleisch	29	7
Frankreich	1999-2000	Schweinezunge in Aspik	32	10
USA	2000-2001	Frischkäse mexikanischer Art aus unpasteurisierter Milch	12	5
USA	2002	Putendelikatessen, Fertigfleischgerichte	54	8
Kanada	2002	Rohmilchkäse	17	0
USA	2003	Frischkäse mexikanischer Art	12	NB
Schweiz	2005	Weichkäse	3	1

* Lebensmittel nur durch epidemiologische Untersuchungen miteinbezogen
NB = nicht bekannt

In Kalifornien führte im Jahr 1985 der Verzehr von „Mexican-Style“-Frischkäse, der mit kontaminierter unpasteurisierter Milch hergestellt worden war, zu 142 Listeriose-Fällen mit 48 Todesfällen (LINNAN *et al.*, 1988). Im Oktober 2000 bis Januar 2001 traten in North-Carolina 12 Listeriose-Fällen mit fünf Todesfällen auf, die durch Frischkäse verursacht wurden, der aus kontaminierter Rohmilch in privaten Haushalten hergestellt worden war (MacDONALD *et al.*, 2005). Aus Rohmilch hergestellter „Mexican-Style“-Frischkäse war auch im Jahr 2003 die Ursache für 12 Listeriose-Fälle in Texas (SWAMINATHAN und GERNER-SMIDT, 2007). Zu mehreren Fällen einer fiebrigen Gastroenteritis kam es im Jahr 2001 auf einer Sommerfarm in Schweden. Dort erkrankten 48 Besucher der Farm nach dem Verzehr von Rohmilch-Frischkäse. Untersuchungen dieses Frischkäses ergaben nicht nur eine Kontamination mit *L. monocytogenes*, sondern auch mit VTEC und in einem Fall mit ETEC (CARRIQUE-MAS, 2003).

2.3.5 Vorkommen und Bedeutung von *L. monocytogenes* in Milch und Milcherzeugnissen

Die Nachweishäufigkeit von *L. monocytogenes* in Rohmilch beträgt nach FARBER und PETERKIN (1991) ungefähr 2,2 % bzw. nach KOZAK *et al.* (1996) etwa 3,4 %. Der Listeriengehalt der Rohmilch liegt meist unter 10 Kbe/ml (KOZAK *et al.*, 1996) bzw. unter 10² Kbe/ml (BECKERS *et al.*, 1987). In Tabelle 2.14 sind einige Untersuchungsergebnisse zum Vorkommen von *L. monocytogenes* in Rohmilch aufgeführt. Während Mitte der 80er Jahre noch hohe Kontaminationsraten (45,3 %) von Rohmilch mit *L. monocytogenes* festgestellt wurden, wurden in den letzten Jahren deutlich niedrigere Nachweisraten (0-16 %) ermittelt. Eine direkte Kontamination der Milch kann durch erkrankte Tiere (Abort, Mastitis, Encephalitis), die intermittierende Ausscheider sind, erfolgen. Die Milch offensichtlich erkrankter Tiere wird zwar nicht verwendet, jedoch spielt die Verbreitung des Erregers in der Umgebung und das Vorkommen asymptomatisch infizierter Tieren eine wichtige Rolle (KOZAK *et al.*, 1996; GAYA *et al.*, 1998). Von größerer Bedeutung ist möglicherweise die indirekte Kontamination der Rohmilch. Durch mangelnde Melkhygiene können Listerien aus dem Futter, dem Kot, von der Euteroberfläche oder der Liegefläche in die Milch gelangen (FEDIO und JACKSON, 1992).

Tabelle 2.14: Vorkommen von *L. monocytogenes* in Rohmilch (Kuhmilch)

Probe	Probenherkunft	Probenzahl	Anzahl (%) <i>L. monocytogenes</i> positiv	Referenzen
Rohmilch*	Spanien	95	43 (45,3 %)	DOMÍNGUEZ RODRIGUEZ <i>et al.</i> , 1985
Anlieferungsmilch (112 Proben), Bestandsmilch (9 Proben)	USA	121	15 (12 %)	HAYES <i>et al.</i> , 1986
Bestandsmilch	Niederlande	137	6 (4,4 %)	BECKERS <i>et al.</i> , 1987
Bestandsmilch	Kanada	445	6 (1,3 %)	FARBER <i>et al.</i> , 1988a
Bestandsmilch	Schottland	180	14 (2,6 %)	FENLON und WILSON, 1989
Rohmilch*	Italien	40	0 (0 %)	MASSA <i>et al.</i> , 1990
Rohmilch*	England, Wales	361	13 (3,6 %)	GREENWOOD <i>et al.</i> , 1991
Bestandsmilch	Irland	113	6 (5,3 %)	HARVEY und GILMOUR, 1992
Bestandsmilch	Irland	589	29 (4,9 %)	REA <i>et al.</i> , 1992
Bestandsmilch	Schottland	160	25 (15,6 %)	FENLON <i>et al.</i> , 1995
Bestandsmilch	Frankreich	69	4 (5,8 %)	DESMASURES <i>et al.</i> , 1997
Bestandsmilch	Kanada	1720	47 (2,7 %)	STEELE <i>et al.</i> , 1997
Bestandsmilch	Spanien	774	28 (3,6 %)	GAYA <i>et al.</i> , 1998
Bestandsmilch	Deutschland	74	12 (16,2 %)	HAHN <i>et al.</i> , 1999a
Bestandsmilch	USA	131	6 (4,6 %)	JAYARAO und HENNING, 2001
Bestandsmilch	Schweden	294	3 (1 %)	WAAK <i>et al.</i> , 2002
Bestandsmilch	Belgien	143	9 (6,3 %)	DE REU <i>et al.</i> , 2004
Bestandsmilch	USA	861	56 (6,5 %)	VAN KESSEL <i>et al.</i> , 2004
Bestandsmilch	Spanien	340	23 (6,8 %)	VITAS <i>et al.</i> , 2004

* Probenmaterial nicht eindeutig zu Bestands- oder Anlieferungsmilch zuzuordnen

Die Silagefütterung wird häufiger als Ursache für eine höhere Belastung von Milch mit Listerien angesehen, wobei die Literaturangaben hierzu uneinheitlich sind. Einige Autoren haben saisonale Schwankungen der Listerien-Kontamination beschrieben. Hierbei wurde im Winter und damit der Zeit der Silagefütterung eine höhere Nachweisrate festgestellt (REA *et al.*, 1992; MEYER-BROSETA *et al.*, 2003). Andere Autoren können keinen saisonalen Einfluss bestätigen oder es wurde sogar genau umgekehrt eine höhere Listerien-Nachweisrate im Sommer beobachtet (FARBER *et al.*, 1988a; FENLON und WILSON, 1989; GAYA *et al.*, 1998).

Bei Käse, der aus Rohmilch hergestellt wurde, ist nicht auszuschließen, dass eine Kontamination der Milch Ursache für das Vorkommen von Listerien im Endprodukt ist (KRÜGER, 2000). Bei Käse, der aus wärmebehandelter Milch hergestellt wurde, sind die Listerien durch die Pasteurisation inaktiviert oder abgetötet worden (KRÜGER, 2000; SILVA *et al.*, 2003). Zwar ergaben die Untersuchungen von FERNÁNDEZ-GARAYZÁBAL *et al.* (1986) und DOYLE *et al.* (1987), dass Listerien die Fähigkeit haben, die Pasteurisation zu überleben, jedoch zeigen die Ergebnisse vieler anderer Untersuchungen, dass die in der Rohmilch enthaltenen Listerien durch eine ordnungsgemäße Pasteurisation abgetötet werden (TERPLAN *et al.*, 1986a; BECKERS *et al.*, 1987; CDC, 1988; FARBER *et al.*, 1988b; MacDONALD und SUTHERLAND, 1993; HOF 1999; JEMMI und STEPHAN, 2006). Dennoch ist die Kontamination der Rohmilch von Bedeutung, da jedes Pathogen, das in der Rohmilch enthalten ist, in die Umgebung einer Käserei gelangen kann (COTTON und WHITE, 1992; ROGGA *et al.*, 2005). Die Fähigkeit der Listerien bei niedrigen Temperaturen zu wachsen führt dazu, dass nahezu alle Einrichtungen einer Käserei ideale Wachstumsbedingungen für Listerien bieten (KOZAK *et al.*, 1996). Bei mangelnder Hygiene können durch eine Rekontamination nach der Wärmebehandlung Probleme entstehen (KRÜGER, 2000; SILVA *et al.*, 2003; ROGGA *et al.*, 2005).

2.3.6 Vorkommen und Bedeutung von *L. monocytogenes* in Frischkäse

Aufgrund ihrer Bedeutung bei lebensmittelbedingten Listeriosen sind Käse intensiv untersucht worden. Listerien haben die Fähigkeit die Herstellung und Reifung vieler verschiedener Käsesorten zu überleben (FARBER und PETERKIN, 1991; GAYA *et al.*,

1998). Weichkäse, Blauschimmelkäse und halbfeste Schnittkäse (z. B. Brie, Camembert, Roquefort, Münster, Gorgonzola) gehören zu den am häufigsten kontaminierten Sorten, wobei Produkte mit einem Schmierebelag offensichtlich noch günstigere Voraussetzungen für das Wachstum von Listerien bieten (TERPLAN *et al.*, 1986b; RKI, 2006; RAMASWAMY *et al.*, 2007). Hartkäse sind weit weniger kontaminiert (RKI, 2006).

Frischkäse werden zu den Käsen gezählt, in denen *L. monocytogenes* eine geringe Überlebensfähigkeit aufweist (FARBER und PETERKIN, 1991). Industriell gefertigter Quark ist meist frei von Listerien (RKI, 2006). SWAMINATHAN und GERNER-SMIDT (2007) schätzen das Risiko einer Listeriose durch den Verzehr von Frischkäse als gering ein. Die FDA (2003) hingegen zählt Frischkäse zu den Lebensmitteln, bei denen das Wachstum von *L. monocytogenes* während der Lagerung generell möglich ist. Sie ordnet Frischkäse den Lebensmitteln zu, bei denen ein geringes bis mittleres Risiko besteht bei Verzehr an einer Listeriose zu erkranken. In Tabelle 2.15 sind einige Untersuchungsergebnisse zum Vorkommen von *L. monocytogenes* in Frischkäse zusammengestellt. Die Anzahl der positiven Proben lag zwischen 0 % und 15 %. Im Durchschnitt enthielten 3,5 % der Proben *L. monocytogenes*.

Um das Vorkommen von Listerien in Frischkäse zu kontrollieren, kommt nicht nur der Wärmebehandlung, sondern auch der Verwendung von Starterkulturen eine wesentliche Bedeutung zu. Die Aktivität der Starterkulturen führt zur Produktion von Milchsäure (und anderen organischen Säuren) und damit zu einer Senkung des pH-Wertes, die das Listerienwachstum hemmt (ADAMS und NICOLAIDES, 1997). Listerien sind jedoch gegenüber pH-Wert-Schwankungen relativ unempfindlich (VÁZQUEZ-BOLAND *et al.*, 2001), milde saure pH-Verhältnisse (pH 5,5) können zudem eine Säuretoleranz induzieren (GAHAN *et al.*, 1996; FALEIRO *et al.*, 2003). Säureadaptierte *L. monocytogenes* haben die Fähigkeit, die Fermentation von Milch (pH 4,8) zu überleben. GAHAN *et al.* (1996) zeigten, dass Listerien in Frischkäse mit einem pH von 4,71 und 5,15 während einer Lagerung von 15 Tagen bei 4 °C überleben können. Untersuchungen von CATALDO *et al.* (2007) zeigten, dass nicht nur säureadaptierte *L. monocytogenes* in Frischkäse eine Lagerung über 14 Tage bei 4 °C überleben können, sondern auch nicht adaptierte *L. monocytogenes*. Letztere jedoch in deutlich geringerer Konzentration. In Frischkäsen vom Typ Ricotta (pH 6,2-6,5) wurde nach sieben Tagen sogar ein Anstieg des Keimgehaltes verzeichnet.

Neben der Säureproduktion hat auch die Synthese antimikrobiell wirksamer Stoffe (Bacteriocine, CO₂, Wasserstoffperoxid, Ethanol, Diacetyl) Einfluss auf das Wachstum von Listerien. So wirkt Nisin, ein Bacteriocin, das von *Lactococcus lactis* produziert wird, hemmend auf die Vermehrung von *L. monocytogenes* (ADAMS und NICOLAIDES, 1997). Untersuchungen von SZABO und CAHILL (1998) haben gezeigt, dass bei Konzentrationen von 400 IU/ml Nisin die lag-Phase der Bakterien verlängert und bei höheren Konzentrationen das Wachstum gehemmt wird. MENDOZA-YEPES *et al.* (1999) untersuchten die hemmende Wirkung von Starterkulturen auf das Wachstum von *L. monocytogenes* in Frischkäse, der maximal 22 Tage bei 3 °C bzw. 7 °C gelagert wurde. Bei Zusatz von Starterkulturen wurde *L. monocytogenes* weder nach Lagerung bei 3 °C noch bei 7 °C nachgewiesen. Bei Frischkäsen hingegen, der ohne Starterkulturen hergestellt worden war, wurde ein Wachstum von *L. monocytogenes* beobachtet (Keimgehalte bis 10⁷ KbE/g).

In einer neueren Übersicht (FDA, 2003) wurden einige Untersuchungsergebnisse zum Wachstum von *L. monocytogenes* in Frischkäse während der Lagerung zusammengestellt (Tabelle 2.16). Diese ergaben für *L. monocytogenes* während der Lagerung von Frischkäse eine mittlere Wachstumsrate von 0,09 log KbE pro Tag. Hierbei war das Wachstum stark pH-abhängig. Während bei Ricotta mit einem pH von 5,9-6,1 der Keimgehalt anstieg, sank er in Rahm-Frischkäsen, deren pH bei 4,8 lag. Vergleichbare Ergebnisse erhielten HICKS und LUND (1991), PICCININ und SHELEF (1995) und ROGGA *et al.* (2005) bei Lagerungsversuchen von Hüttenkäse. In den meisten Fällen kam es zu einem Abfall des Keimgehaltes, in keinem Fall wurde eine Vermehrung von *L. monocytogenes* beobachtet. Der Abfall des Keimgehaltes war um so deutlicher, je niedriger der pH-Wert der Käse war.

Tabelle 2.15: Untersuchungen zum Vorkommen von *L. monocytogenes* in Frischkäse

Friskkäse	Milch ¹⁾	Tierart ²⁾	Probenzahl	Anzahl (%) positiv	Probenherkunft	Referenzen
Friskkäse	P	k.A.	54	0 (0 %)	Italien	MASSA <i>et al.</i> , 1990
„Minas“-Friskkäse ³⁾	P	K	20	2 (10 %)	Brasilien	DESTRO <i>et al.</i> , 1991
Friskkäse	P	K	366	4 (1,1 %)	England, Wales	GREENWOOD <i>et al.</i> , 1991
Hüttenkäse	k.A.	k.A.	10	0 (0 %)	USA	KOZAK <i>et al.</i> , 1996
Friskkäse	R	K	35	0 (0 %)	Deutschland	HAHN <i>et al.</i> , 1999b
Panela ⁴⁾	P*	K	40	6 (15 %)	Mexiko	SALTIJERAL <i>et al.</i> , 1999
Friskkäse	R	Z	8	1 (12,5 %)	Belgien	DE REU <i>et al.</i> , 2002
Friskkäse	R, T P	K K	62 412	1 (1,6 %) 1 (0,2 %)	Großbritannien	LITTLE <i>et al.</i> , 2008
Friskkäse	k.A.	k.A.	814	32 (3,9 %)	USA	FDA, 2003
„Minas“-Friskkäse	P	K	12	0 (0 %)	Brasilien	SILVA <i>et al.</i> , 2003
Latin Style-Friskkäse ⁴⁾	P	K	111	7 (6,3 %)	USA	KABUKI <i>et al.</i> , 2004
Friskkäse	R	K	4	0 (0 %)	Belgien	DE REU <i>et al.</i> , 2004
„Queso Fresco“ ⁴⁾	k.A.	k.A.	50	2 (4,0 %)	Portugal	MENA <i>et al.</i> , 2004
Friskkäse	P	k.A.	99	1 (1,0 %)	Spanien	VITAS <i>et al.</i> , 2004
Friskkäse	R, P	Z	44	0 (0 %)	Deutschland	OELLIG, 2006

¹⁾ P = pasteurisierte Milch; P* = evtl. nicht oder nicht ausreichend pasteurisierte Milch verwendet; R = Rohmilch; R, T: Rohmilch, thermisiert; k.A. = keine Angabe

²⁾ K = Kuhmilch; Z = Ziegenmilch; k.A. = keine Angabe

³⁾ „Minas“-Friskkäse: brasilianischer aus pasteurisierter Kuhmilch unter Verwendung von Starterkulturen und Lab hergestellter Friskkäse (pH 4,9-5,3) (SILVA *et al.*, 2003)

⁴⁾ „Latin-/Mexican-Style“-Friskkäse: heterogene Gruppe ungereifter Käse mit einem Salzgehalt von 1 % bis 3 %, die aus Kuh-, Ziegen- oder Büffelmilch durch Lab- oder Säurezugabe aber typischerweise ohne Starterkulturen hergestellt und meist frisch verzehrt werden (1-2 Tage nach Herstellung). Einige Käse sind zwei Wochen bis zwei Monate haltbar. Je nach Herkunftsregion gibt es für die Gruppe der „Latin-Style“-Friskkäse verschiedene Namen. „*Queso Fresco*“ ist ein Friskkäse aus Magermilch aus El Salvador und Venezuela, „*Panela*“ ist ein Friskkäse aus Vollmilch oder fettarmer Milch aus Mexiko (TORRES und CHANDAN, 1981; KABUKI *et al.*, 2004).

Tabelle 2.16: Wachstum von *L. monocytogenes* in Frischkäse während der Lagerung (zitiert nach: FDA, 2003)

Referenzen	Frischkäse	Temperatur	Wachstumsrate	Wachstumsrate bei 5 °C (log KbE/d)
EL-SHENAWY und MARTH, 1990	Hüttenkäse	gekühlt	Abfall um 0,5 bis 1,5 log in 1 bis 5 Wochen	-0,048
		6 °C	1 log in 21 d	-0,035
COTTIN <i>et al.</i> , 1990	Rahm-Frischkäse	4 °C	2 log in 2 d	1,423
GENIGEORGIS <i>et al.</i> , 1991	Hüttenkäse (5 Marken)	4 °C	0,39 log in 24 d	0,023
			0,34 log in 24 d	0,020
			0,41 log in 16 d	0,036
			0,94 log in 36 d	0,037
			Abfall 1,87 log in 8 d	-0,333
	8 °C	0,59 log in 18 d	0,015	
		Abfall 1,87 log in 36 d	-0,024	
		0,42 log in 24 d	0,007	
		1,13 log in 8 d	0,064	
		Abfall 1,87 log in 8 d	-0,106	
Ricotta (3 Marken)	4 °C	1,53 log in 30 d	0,072	
		3,58 log in 36 d	0,141	
		1,97 log in 22 d	0,127	
	8 °C	2,11 log in 8 d	0,120	
		1,75 log in 6 d	0,132	
	1,88 log in 8 d	0,106		
	Rahm-Frischkäse	4 °C	Abfall 2 log in 36 d	-0,079
		8 °C	Abfall 2 log in 30 d	-0,030
CHEN und HOTCHKISS, 1993	Hüttenkäse	4 °C	2,0 log in 40 d	0,071
		7 °C	2,4 log in 10 d	0,137
FEDIO <i>et al.</i> , 1994	Hüttenkäse	5 °C	2 log in 22 d	0,091
PAPAGEORGIU <i>et al.</i> , 1996	Ricotta	5 °C	GT* 16,2-20,2 h	0,397
		12 °C	GT 5,1-5,8 h	0,292

* GT = Generationszeit

2.3.7 Rechtliche Grundlagen

Bei der Festlegung der Grenzwerte für *L. monocytogenes* in Lebensmitteln wird gemäß VO (EG) Nr. 2073/2005 zwischen Lebensmitteln unterschieden, die eine Vermehrung begünstigen und solchen, bei denen das nicht der Fall ist. Kriterien für Lebensmittel, die eine Vermehrung nicht begünstigen, sind ein pH-Wert von $\leq 4,4$ oder ein a_w -Wert von $\leq 0,92$ oder ein pH-Wert von $\leq 5,0$ kombiniert mit einem a_w -Wert von $\leq 0,94$. Erzeugnisse mit einer Haltbarkeitsdauer von weniger als fünf Tagen werden automatisch den Lebensmitteln zugeordnet, die eine Vermehrung nicht begünstigen. Da bei Frischkäse die physikalischen Parameter pH-Wert und a_w -Wert teils über teils unter den genannten Werten liegen, ist Frischkäse im Zweifelsfall den Erzeugnissen zuzuordnen, die prinzipiell eine Vermehrung begünstigen und unterliegt den in Tabelle 2.17 aufgeführten Kriterien. Im Fall unbefriedigender Ergebnisse ist das Erzeugnis nicht sicher und muss gemäß Artikel 19 der VO (EG) Nr. 178/2002 vom Markt genommen oder zurückgerufen werden. Eine weitere Verarbeitung, die die Gefahr beseitigt oder eine Verwendung für andere Zwecke, ist nur möglich, wenn dies keine Gefahr für die Gesundheit für Mensch oder Tier darstellt.

Tabelle 2.17: Kriterien für *L. monocytogenes* gemäß VO (EG) Nr. 2073/2005 (Lebensmittelsicherheitskriterium)

Lebensmittelkategorie	Probennahme		Grenzwert	Stufe, für die das Kriterium gilt
	n	c		
Andere als für Säuglinge oder für besondere medizinische Zwecke bestimmte, verzehrfertige Lebensmittel, die die Vermehrung von <i>L. monocytogenes</i> begünstigen können	5	0	100 KbE/g ¹⁾	in Verkehr gebrachte Erzeugnisse während der Haltbarkeitsdauer
	5	0	in 25 g nicht nachweisbar ²⁾	bevor das Lebensmittel die unmittelbare Kontrolle des Lebensmittelunternehmers, der es hergestellt hat, verlassen hat

Erläuterung:

n = Anzahl der Probeneinheiten der Stichprobe

c = Anzahl der Probeneinheiten, deren Werte zwischen m und M liegen dürfen

¹⁾ gilt nur, wenn der Hersteller nachweisen kann, dass das Erzeugnis während der gesamten Haltbarkeitsdauer den Grenzwert von 100 KbE/g nicht übersteigt

²⁾ gilt, wenn der Hersteller den zuständigen Behörden nicht zufriedenstellend nachweisen kann, dass das Erzeugnis den Wert von 100 KbE/g während der gesamten Haltbarkeitsdauer nicht überschreitet

2.4 *Staphylococcus aureus*

2.4.1 Systematik

Die Spezies *Staphylococcus (S.) aureus* gehört zur Gattung *Staphylococcus* und wurde bisher gemeinsam mit den Gattungen *Micrococcus*, *Stomatococcus* und *Planococcus* der Familie der *Micrococcaceae* zugeordnet (KLOOS und SCHLEIFER, 1986). Inzwischen wird die Gattung *Staphylococcus* einer eigenen Familie, der Familie *Staphylococcaceae*, zugeordnet (GARRITY *et al.*, 2004). Der Name „*Staphylococcus*“ leitet sich von der traubenartigen Anordnung der Zellen (staphylos – Traube) im mikroskopischen Präparat und der häufig goldfarbenen (aureus – golden) Pigmentierung der Kolonien ab (KLOOS und SCHLEIFER, 1986). Neben *S. aureus* werden zur Zeit rund 50 Spezies der Gattung *Staphylococcus* zugeordnet. Diese werden in Koagulase-positive (KPS) und Koagulase-negative Staphylokokken (KNS) unterteilt, um apathogene oder minder-pathogene (KNS) von pathogenen Spezies (KPS) abzugrenzen (BECKER *et al.*, 2007).

2.4.2 Allgemeine Charakterisierung

2.4.2.1 Morphologie, kulturelle und biochemische Eigenschaften

Staphylokokken sind unbewegliche, grampositive, gewöhnlich Katalase-positive, kugelförmige Bakterien, die einen Durchmesser von 0,5-1,5 µm haben. Im mikroskopischen Präparat sind sie einzeln, zu zweit oder meistens in unregelmäßigen Haufen angeordnet. Die Zellwand der Bakterien ist Lysostaphin-empfindlich und überwiegend Lysozym-resistent. Glukose, Laktose, Maltose und Mannitol werden unter anaeroben Bedingungen zu Säure abgebaut. Einige Stämme besitzen eine Kapsel oder eine Pseudokapsel. Unbekapselte Kulturen von *S. aureus* bilden auf nicht-selektivem Nähragar glänzende, erhabene, runde Kolonien mit glatter Oberfläche und einem Durchmesser von 6-8 mm. Kolonien bekapselter Kulturen sind kleiner und stärker gewölbt. Sie wachsen glänzend feucht und sind von Schleim umgeben. Die Kolonien sind durch in der Zellwand eingelagerte Carotinoide bzw. deren Derivate pigmentiert, so dass die Farbe der Kolonien je nach Pigmentdichte von grau, grauweiß über gelblich, gelborange bis orange variiert (KLOOS und SCHLEIFER, 1986; BLOBEL und SCHLIESSER, 1994).

2.4.2.2 Vorkommen und Wachstumseigenschaften

Staphylokokken sind ubiquitär verbreitet. Menschen und Tiere sind das natürliche Reservoir von *S. aureus*. Rund 60 % der Bevölkerung sind intermittierende Träger des Bakteriums. Zwischen 20-30 % aller gesunden Menschen beherbergen *S. aureus* auf den Schleimhäuten des Nasen-Rachen-Raums. Daneben besiedeln Staphylokokken die intakte Haut sowie Hautdrüsen bei Mensch und Tier sowie bisweilen auch das Respirations-, Gastrointestinal- und Urogenitalsystem (KLOOS und LAMBE, 1991; BLOBEL und SCHLIESSER, 1994; KLUYTMANS *et al.*, 1997). Einige Faktoren, die das Wachstum und die Enterotoxin-Bildung von *S. aureus* beeinflussen, sind in Tabelle 2.18 zusammengestellt.

Tabelle 2.18: Wachstumseigenschaften von *S. aureus* und Faktoren für die Enterotoxin-Bildung, modifiziert nach TATINI (1973), CROWTHER und HOLBROOK (1980), BAIRD-PARKER (1990), ICMSF (1996) (zitiert nach: SCVPH, 2003a)

Faktor	Wachstum		Enterotoxin-Bildung	
	Optimum	Bereich	Optimum	Bereich
Temperatur	37 °C	7-48 °C	40-45 °C	10-48 °C
pH	6-7	4-10	7-8	4-9,6
Wasseraktivität	0,98	0,86 - > 0,99 ¹⁾	0,98	0,85 - > 0,99 ²⁾
NaCl (%)	0	0-20	0	0-10
Redoxpotential (E_h)	> +200 mV	< -200 mV bis > +200 mV	> +200 mV	< -100 mV bis > +200 mV
Atmosphäre	aerob	anaerob - aerob	aerob (5-20 %)	anaerob - aerob

¹⁾ Aerob (anaerob 0,90 bis > 0,99)

²⁾ Aerob (anaerob 0,92 bis > 0,99)

S. aureus ist insbesondere dadurch gekennzeichnet, dass sich der Organismus unter ansonsten optimalen Bedingungen noch bei einem niedrigen a_w -Wert von 0,86 vermehren kann. Dies entspricht einem hohen Salzgehalt von bis zu 20 % (QI und MILLER, 2000).

Dadurch hat *S. aureus* in bestimmten Lebensmitteln gegenüber anderen Mikroorganismen einen Selektionsvorteil (BLOBEL und SCHLIESSER, 1994). Des Weiteren zeigt *S. aureus* aerobes und fakultativ anaerobes Wachstum, wobei das beste Wachstum unter aeroben Bedingungen beobachtet wird (KLOOS und SCHLEIFER, 1986). Der Organismus kann sich in einem Temperaturbereich von 7-48 °C (Optimum bei 30-37 °C) (SCHMITT *et al.*, 1990) und in einem pH-Bereich von 4-10 (Optimum bei pH 6-7) vermehren (SCVPH, 2003a). Die Wachstumseigenschaften von *S. aureus* ermöglichen die Vermehrung in einer Vielzahl von Lebensmitteln, insbesondere solchen wie Käse, die bei der Herstellung mehreren Verarbeitungsschritten unterliegen (LE LOIR *et al.*, 2003).

2.4.2.3 Virulenzfaktoren

S. aureus bildet eine Reihe von Proteinen, die bedeutsam als Virulenzfaktoren sind (Enterotoxine, Toxic Shock Syndrom Toxin, Koagulase, Klumpungsfaktor, α -, β -, γ - und δ -Hämolysin, Thernonuklease, Protease, Hyaluronidase, Lipase, Staphylokinase, Kollagenase u. v. m.). Sie werden bei KLOOS und SCHLEIFER (1986), BLOBEL und SCHLIESSER (1994), BALABAN und RASOOLY (2000), DINGES *et al.* (2000) und BECKER *et al.* (2007) detailliert besprochen. Im Folgenden sollen nur einige dieser Virulenzfaktoren, die für die Differenzierung von *S. aureus* und die Lebensmittelsicherheit von Bedeutung sind, näher besprochen werden.

Als Hauptkriterium zur Identifizierung von *S. aureus* dient der Nachweis der extrazellulären Koagulase, die auf nicht proteolytischem Weg durch die Aktivierung von Prothrombin zu einer Umwandlung des löslichen Fibrinogens in das unlösliche Fibrin führt und damit zur Blutgerinnung (PANIZZI *et al.*, 2004). Zwar sind neben *S. aureus* noch andere Staphylokokken-Spezies wie *S. intermedius* oder *S. hyicus* in der Lage Koagulase zu bilden, sie können jedoch durch weitere biochemische Merkmale gut von *S. aureus* unterschieden werden (KLOOS und SCHLEIFER, 1986; BLOBEL und SCHLIESSER, 1994) und spielen im Zusammenhang mit Lebensmittelintoxikationen eher eine untergeordnete Rolle (BECKER *et al.*, 2007). Ein weiteres Merkmal zur Bestätigung von *S. aureus* ist der Klumpungsfaktor (Clumping factor), ein an der Zellwand gebundenes Protein, das durch die Bindung an Fibrinogen zum Verklumpen der Zellen führt (BODÉN und FLOCK, 1989; McDEVITT *et al.*, 1997). Des Weiteren bildet *S. aureus* vier

Hämolsine, von denen das α -Hämolsin am besten untersucht ist. Es wirkt toxisch auf viele Säugetierzellen. Ihm werden u. a. dermonekrotoxische und neurotoxische Wirkungen zugeschrieben. Es bildet Poren in Zellmembranen und führt damit zu einer vollständigen Lyse von Schaf- und Kaninchen-Erythrozyten (BHAKDI und TRANUM-JENSEN, 1991; BLOBEL und SCHLIESSER, 1994). Das β -Hämolsin ist eine Phospholipase C mit spezifischer Wirkung auf Sphingomyelin (Sphingomyelinase) und hat v. a. auf Schafererythrozyten eine hämolytische Wirkung. Die Hämolyse ist nach Inkubation bei 37 °C zunächst noch unvollständig und wird nach weiterer Aufbewahrung bei 4 °C vollständig. Dies hat zur Bezeichnung „Hot-Cold“-Hämolsin geführt (BLOBEL und SCHLIESSER, 1994). AARESTRUP *et al.* (1999) untersuchten *S. aureus*-Isolate von Menschen (Nase) und Mastitis-Kühen. Bei 59 % der menschlichen Isolate und 37 % der Rinder-Isolate wurde das α -Hämolsin nachgewiesen, während das β -Hämolsin nur bei 11 % der menschlichen Isolate und dafür bei 72 % der Rinder-Isolate nachgewiesen wurde. Das γ -Hämolsin besteht aus zwei Komponenten und hat lytische Wirkung auf Leukozyten und Erythrozyten vieler Säuger. Es wird von 99 % der *S. aureus*-Stämme produziert (PRÉVOST *et al.*, 1995). Das δ -Hämolsin, das von 97 % der *S. aureus*-Stämme produziert wird, verhält sich Surfactant-ähnlich und bildet Kationen-selektive Kanäle. Es weist ein breites Spektrum cytotoxischer Wirkungen auf (DINGES *et al.*, 2000).

Aus Sicht der Lebensmittelsicherheit haben Staphylokokken-Enterotoxine (SE) eine wesentliche Bedeutung. Sie werden anhand ihrer serologischen Eigenschaften unterschieden und mit lateinischen Buchstaben in alphabetischer Reihenfolge bezeichnet (BLOBEL und SCHLIESSER, 1994). Zu den Enterotoxinen zählen SEA, SEB, SEC (1-3), SED, SEE, SEG, SEH, SEI und SEJ. Sie sind dadurch gekennzeichnet, dass sie als Superantigene wirksam sind und Übelkeit und Gastroenteritiden verursachen (MUNSON *et al.*, 1998; BALBAN und RASOOLY, 2000). Neben den aufgeführten SE gibt es die Enterotoxin-ähnlichen Toxine SEI_J-SEI_R und SEI_U-SEI_V. Über deren Bedeutung bei Lebensmittel-Intoxikationen ist bisher wenig bekannt (BECKER *et al.*, 2007). SE bestehen aus kurzen Polypeptidketten, die reich an Lysin, Tyrosin, Aspartam- und Glutaminsäure sind und zumindest die klassischen SE (SEA-SEE) besitzen als charakteristisches Strukturmerkmal eine Cystein-Schleife, die für die emetische Aktivität von Bedeutung ist. Sie sind resistent gegenüber proteolytischen Enzymen (Pepsin, Trypsin, Chymotrypsin, Rennin und Papain), wodurch ihre Aktivität im Verdauungstrakt erhalten bleibt (DINGES *et al.*, 2000; LE LOIR *et al.*, 2003). Im Hinblick auf die Lebensmittelhygiene ist die

Hitzestabilität der SE bedeutsam. Normale Temperaturen und Erhitzungsdauer bei der küchenmäßigen Zubereitung der Lebensmittel führen zwar zur Abtötung von *S. aureus*, reichen aber nicht zur Inaktivierung der Toxine. SEA, SEB und SEC werden erst nach 20-30 min bei 120 °C vollständig inaktiviert. Untersuchungen von BENNETT und BERRY (1987) zeigten, dass im Katzentest SEA und SED noch nach Temperatureinwirkungen von 123,9 °C biologisch aktiv gewesen sind. Die Hitzestabilität der Toxine hängt von der Zusammensetzung des Lebensmittels, dem pH-Wert, des Salzgehaltes und der Ausgangskonzentration der Toxine ab (BERGDOLL *et al.*, 1974; SCHWABE *et al.*, 1990; BALBAN und RASOOLY, 2000; MARGOSCH *et al.*, 2005). Weitere Angaben über die einzelnen SE können den Arbeiten von BALBAN und RASOOLY (2000), DINGES *et al.* (2000), LE LOIR *et al.* (2003) und BECKER *et al.* (2007) entnommen werden.

2.4.3 *S. aureus* als Krankheitserreger

S. aureus ist ubiquitär verbreitet und kann als Erreger einer Vielzahl von Infektionen in Erscheinung treten (LE LOIR *et al.*, 2003). Am häufigsten sind eitrige Hautentzündungen wie Follikulitis, Furunkel, Karbunkel, Abszesse, Impetigo, postoperative Wundinfektionen oder das „Scalded Skin“-Syndrom, das durch das exfoliative Toxin verursacht wird. Daneben kann *S. aureus* auch bei Pneumonien, Osteomyelitiden, Meningitiden, Endokarditiden, Bakteriämien, Enterokolitiden oder Urogenitalinfektionen beteiligt sein (KLOOS und SCHLEIFER, 1986; KLOOS und LAMBE, 1991; NSO ROCA *et al.*, 2008). Das Auslösen einer Infektion und deren Ausmaß sind abhängig von den Virulenzfaktoren von *S. aureus* und den Abwehrmechanismen des Wirtes (ASPERGER, 1991).

Im Hinblick auf die Lebensmittelsicherheit hat die Staphylokokken-Intoxikation eine wesentliche Bedeutung. Der Verzehr von Lebensmitteln, die Staphylokokken-Enterotoxine enthalten, ist einer der häufigsten Ursachen lebensmittelbedingter Erkrankungen (BALBAN und RASOOLY, 2000). Eine Kontamination mit geringen Zahlen enterotoxinbildender *S. aureus* stellt noch keine Gefährdung dar. Erst wenn sich der Erreger vermehren kann und Keimzahlen von 10^5 - 10^6 KBE/g erreicht, ist mit einer nachweisbaren Bildung von Enterotoxinen zu rechnen (HOBBS, 1960; ZANGERL, 1999; SCVPH 2003a). Die Charakterisierung von *S. aureus*-Stämmen, die im Rahmen von 359 Krankheitsausbrüchen bzw. sporadischen Fällen in Großbritannien isoliert wurden, zeigte

dass für 79 % der Fälle SEA verantwortlich gewesen ist. Die Symptome einer Staphylokokken-Intoxikation äußern sich in Form von abdominalen Krämpfen, Übelkeit, Erbrechen, Durchfall (nie als einziges Symptom), Schweißausbrüchen, Schwindel und Kopfschmerzen. Die Inkubationszeiten sind sehr kurz, da die Toxine bereits präformiert vorliegen, so dass bereits nach 30 min bis 8 h (im Durchschnitt nach 1-6 h) erste Symptome auftreten. In den meisten Fällen ist die Erkrankung selbstlimitierend und endet nach 24 h (LE LOIR *et al.*, 2003; BECKER *et al.*, 2007).

Die minimal toxische Dosis für den Menschen liegt nach ASPERGER (1991) bei einer Enterotoxin-Konzentration von 0,1-0,2 µg pro Person. Im Zusammenhang mit einer SEA-Intoxikation bei Schulkindern durch pasteurisierte Schokoladenmilch, berichteten EVENSON *et al.* (1988) über eine toxisch wirksame Dosis von 144 ± 50 ng. In Japan führte im Jahr 2000 kontaminiertes Magermilchpulver, das zur Herstellung von fettarmer Milch und Joghurt verwendet wurde, in 13.420 Fällen zu einer SEA-Intoxikation. Hierbei wurde eine toxische Dosis von ungefähr 0,02-0,1 µg pro Person festgestellt (ASAO *et al.*, 2003). Intoxikationsversuche von RAJ und BERGDOLL (1969) zeigten, dass zum Auslösen einer klinischen Symptomatik beim Menschen durch SEB ein Toxingehalt von 20 bis 25 µg pro Person nötig ist.

2.4.4 Vorkommen und Bedeutung von *S. aureus* in Milch und Frischkäse

Milch und Milcherzeugnisse sind häufig mit enterotoxinogenen *S. aureus* kontaminiert und können daher Ursache lebensmittelbedingter *S. aureus*-Intoxikationen sein (MORANDI *et al.*, 2007; NORMANNO *et al.*, 2007). In Europa sind durchschnittlich 4,8 % (1-9 %) der Lebensmittelintoxikationen auf Milch und Milcherzeugnisse zurückzuführen (SCVPH, 2003a). In den USA sind im Jahr durchschnittlich 185.000 Krankheits- und zwei Todesfälle auf eine Staphylokokken-Intoxikation zurückzuführen (MEAD *et al.*, 1999). In Tabelle 2.19 sind einige solcher Krankheitsausbrüche durch SE-Intoxikationen zusammengestellt. Wärmebehandelte Milch ist extrem selten als Quelle identifiziert worden. Milchpulver oder Milchmischgetränke können nach Rekontamination jedoch ein Problem darstellen.

Tabelle 2.19: Lebensmittel-Intoxikationen durch Staphylokokken-Enterotoxine in Milch und Milcherzeugnissen (RKI, 1999; DE BUYSER *et al.*, 2001; SIMEÃO DO CARMO *et al.*, 2002; ASAO *et al.*, 2003)

Land	Jahr	Fälle	Intoxikationsquelle (SE-Typ)	Behandlung der Milch ¹⁾	Referenzen
Kanada	1980	62	Bruch (SEA, SEC)	k.A.	TODD <i>et al.</i> , 1981
USA	1981	16	Käse	P	ALTEKRUSE <i>et al.</i> , 1998
England	1983	2	Käse	P	BARRETT, 1986
Frankreich	1983	20	Schafkäse (SEA, SED)	R	DE BUYSER <i>et al.</i> , 1985
Schottland	1984	27	Schafkäse (SEA)	R	BONE <i>et al.</i> , 1989
Schottland	1985	2	Ziegenmilch	R	SHARP, 1989
USA	1985	860	Schokoladenmilch (SEA)	P	EVENSON <i>et al.</i> , 1988
Israel	1987	3	Ziegenmilch (SEB)	R	GROSS <i>et al.</i> , 1988
England	1988	155	Stilton-Käse ²⁾	R	MAGUIRE <i>et al.</i> , 1991
Brasilien	1994	7	Käse (SEH)	k.A.	PEREIRA <i>et al.</i> , 1996
Deutschland	1998	30	Käse (SEA, SED)	R	RKI, 1999
Brasilien	1999	50	Frischkäse ³⁾	R	SIMEÃO DO CARMO <i>et al.</i> , 2002
Japan	2000	13420	Magermilchpulver zur Herstellung von fettarmer Milch und Joghurt (SEA)	P	ASAO <i>et al.</i> , 2003

¹⁾ P = pasteurisierte Milch; R = Rohmilch; k.A. = keine Angabe

²⁾ *S. aureus* vermutet

³⁾ hausgemachter „Minas white cheese“: Frischkäse aus Minas Gerais (Brasilien), der unter Verwendung von Lab und Starterkulturen aus Kuhmilch hergestellt wird. Gemäß der brasilianischen Gesetzgebung darf nur pasteurisierte Milch verwendet werden, jedoch ist es in privaten Haushalten üblich Rohmilch zu verwenden (SIMEÃO DO CARMO *et al.*, 2002; FAO, 2008)

In einem Fall führte der Verzehr von hausgemachtem brasilianischen Frischkäse (Minas White Cheese) aus vermutlich roher Kuhmilch zu 50 Krankheitsfällen. Die Untersuchung des Frischkäses ergab eine *S. aureus*-Konzentration von $2,4 \times 10^3$ bis $2,0 \times 10^8$ KBE/g und den Nachweis der Enterotoxine SEA, SEB und SEC. Da diese Toxine auch von humanen

Stämmen produziert werden, ist eine Kontamination durch die herstellenden Personen als wahrscheinliche Ursache anzusehen. Da jedoch von diesen Personen selbst keine Proben genommen wurden, ist dies nicht belegt (SIMEÃO DO CARMO *et al.*, 2002).

Nach ASPERGER (1991) müssen zwei Bedingungen erfüllt sein, damit es zu einer Lebensmittelintoxikation durch *S. aureus*-Enterotoxine kommen kann. Neben einer Kontamination müssen begünstigende Wachstumsbedingungen vorliegen wie ungenügende Kühlung, lange Lagerungszeiten und Hemmung der obligaten Begleitflora. Primäre oder sekundäre Kontaminationen sind für *S. aureus* sehr häufig, da *S. aureus* einer der häufigsten Erreger sowohl klinischer als auch subklinischer Mastitiden ist (DE BUYSER *et al.*, 2001; JØRGENSEN *et al.*, 2005a) und auch auf der Haut des Melkpersonals vorhanden ist. Außerdem bestehen aufgrund des ubiquitären Vorkommens bei der Be- und Verarbeitung der Milch zahlreiche Kontaminationsmöglichkeiten, so dass *S. aureus* häufig in Rohmilch festgestellt wird (GILMOUR und HARVEY, 1990). Einige Untersuchungsergebnisse zum Vorkommen von *S. aureus* in Rohmilch sind in Tabelle 2.20 zusammengestellt. Hierbei lag die Nachweishäufigkeit von *S. aureus* in Kuhmilch zwischen 18 % und 87 %. In Ziegenmilch wurden einmal bei 32 % und einmal bei 96 % der Proben *S. aureus* nachgewiesen. Eine Untersuchung zu Schafmilch ergab eine Nachweisrate von 33 %. Milch ist ein exzellentes Medium für die Vermehrung von *S. aureus* und die Produktion von Enterotoxinen (GILMOUR und HARVEY, 1990). Dies kann durch Kühlung der Milch (< 7 °C) und Wärmebehandlung (50-60 °C subletale Schädigung, über 60 °C Absterben) verhindert werden (ASPERGER, 1991).

Untersuchungen zum Enterotoxinbildungsvermögen von *S. aureus*-Isolaten aus Rohmilch erbrachten sehr unterschiedliche Ergebnisse. JØRGENSEN *et al.* (2005b) wiesen bei 22,1 % von 165 *S. aureus*-Isolaten aus Kuhmilch Enterotoxine nach. Über SE-Gene verfügten 52,5 % der Isolate. Am häufigsten wurden *sec* bzw. SEC nachgewiesen. Ähnliche Ergebnisse erhielten CENCI-GOGA *et al.* (2003), die bei 22 (14 %) von 160 Isolaten SE-Bildung (SEC und SED) nachweisen konnten. Einen deutlich höheren Anteil an Enterotoxinbildnern fanden CARDOSO *et al.* (1999). Von 127 *S. aureus*-Isolaten produzierten 43 % SE (vor allem SED). Untersuchungen von MORANDI *et al.* (2007) ergaben ebenfalls einen höheren Anteil an toxinbildenden *S. aureus*-Isolaten. Enterotoxinbildung wurde sogar bei 55 % der 71 *S. aureus*-Isolate nachgewiesen (vor allem SEA und SED) und 76 % der Isolate wiesen SE-Gene (vor allem *sej*) auf. Auch wenn *S. aureus* durch die Pasteurisation der Milch zuverlässig abgetötet wird, so behalten

die Enterotoxine weiterhin ihre biologische Wirksamkeit (JØRGENSEN *et al.*, 2005b). Dies war die Ursache für zwei Krankheitsausbrüche, bei denen SEA trotz Pasteurisation seine Aktivität behalten hat (Tabelle 2.19; EVENSON *et al.*, 1988; ASAO *et al.*, 2003).

Tabelle 2.20: Untersuchungen zum Vorkommen von *S. aureus* in Rohmilch

Probenherkunft ¹⁾	Probenart	Tierart ²⁾	Anzahl Proben	Anzahl (%) positiv bzw. KbE/g: Anzahl der Proben	Referenzen
DE	Bestandsmilch	K	101	40 (40 %)	KNAPPSTEIN und MÜLLER, 1998
	Tankmilch	K	164	142 (87 %)	
FR	Bestandsmilch	K	69	43 (62 %) (Ø 410 KbE/g)	DESMASURES <i>et al.</i> , 1997
DE	Bestandsmilch	K	74	40 (54 %) > 5 x 10 ² : 12 (17 %)	HAHN <i>et al.</i> , 1999a
AT	Rohmilch	K	92	< 10 ² : 52 (57 %) 10 ² -5 x 10 ² : 28 (30 %) > 5 x 10 ² : 12 (13 %)	PFLEGER, 2001
CZ	Bestandsmilch	K	111	38 (34 %)	SCHLEGELOVÁ <i>et al.</i> , 2002
CH	Bestandsmilch	Z	344	109 (32 %)	MUEHLHERR <i>et al.</i> , 2003
		S	63	21 (33 %)	
BE	Bestandsmilch	K	143	36 (25 %) ≤ 10 ¹ : 107 (75 %) > 10 ¹ : 26 (18 %) > 5 x 10 ² : 8 (6 %) > 2 x 10 ³ : 2 (1 %)	DE REU <i>et al.</i> , 2004
NO	Bestandsmilch	K	220	165 (75 %)	JØRGENSEN <i>et al.</i> , 2005b
		Z	213	205 (96 %)	

¹⁾ DE = Deutschland; FR = Frankreich; AT = Österreich; CZ = Tschechien; BE = Belgien; NO = Norwegen

²⁾ K = Kuhmilch; Z = Ziegenmilch; S = Schafmilch

Wachstum und Toxinproduktion von *S. aureus* in Frischkäse sind abhängig von der Ausgangskonzentration in der Milch, der Aktivität der Starterkulturen, dem pH-Abfall, der antagonistischen Wirkung der natürlichen Flora, der Salzkonzentration und den Temperaturen während der Herstellung und der Lagerung der Frischkäse (MEYRAND and VERNOZY-ROZAND, 1999). Untersuchungen zum Vorkommen von *S. aureus* in Frischkäse (Tabelle 2.21) ergaben eine Nachweishäufigkeit von 0 % bis 75 %, wobei vor allem Käse aus Rohmilch höhere Keimgehalte aufwiesen und häufiger die Grenzwerte gemäß VO (EG) Nr. 2073/2005 überschritten ($m = 10^4$ KbE/g; $M = 10^5$ KbE/g).

Bei der Herstellung ist insbesondere die Verwendung von Starterkulturen bedeutsam. Starterkulturen hemmen effektiv die Vermehrung von *S. aureus* und die Produktion von Enterotoxinen (LE LOIR *et al.*, 2003; SCVPH, 2003a). Ihre Wirkung beruht hauptsächlich auf der Säureproduktion und der pH-Senkung. Außerdem spielt die Produktion von Wasserstoffperoxid, antimikrobiellen Substanzen, flüchtigen Verbindungen und die Nährstoffkonkurrenz eine Rolle (HAINES und HARMON, 1973; GENIGEORGIS, 1989; LE LOIR *et al.*, 2003; NES und JOHNSBORG, 2004). Staphylokokken können in ihrem Wachstum nur schlecht mit anderen Keimen konkurrieren (HAINES und HARMON, 1973; GENIGEORGIS, 1989) und wenn die kompetitive Flora gering ist oder fehlt, sind schon niedrige *S. aureus*-Gehalte bedenklich (BLOBEL und SCHLIESSER, 1994). Untersuchungen von CHARLIER *et al.* (2008) ergaben, dass sogar schwach säuernde Stämme von *Lactococcus lactis* das Wachstum von *S. aureus* effizient hemmen, auch wenn die Ausgangskonzentration von *S. aureus* bei 10^3 KbE/g liegt. Dies konnte in den ersten 24 h entgegen den Erwartungen allerdings nicht auf die Säureproduktion zurückgeführt werden. Ebenso wurden alternative Effekte wie die Produktion von Bacteriocinen oder Wasserstoffperoxid ausgeschlossen. Die Autoren vermuteten, dass in der ersten Wachstumsphase indirekte Einflüsse wie die Nährstoffkonkurrenz und die Abgabe von Metaboliten, Peptiden oder Signalstoffen für die Hemmwirkung verantwortlich waren.

Tabelle 2.21: Untersuchungen zum Vorkommen von *S. aureus* in Frischkäse

Probenherkunft	Anzahl Proben	Anzahl (%) positiv bzw. KbE/g: Anzahl der Proben	Behandlung der Milch ¹⁾	Tierart ²⁾	Referenzen
Deutschland	26	≤ 10 ⁵ : 17 (65 %) > 10 ⁵ -10 ⁶ : 6 (23 %) > 10 ⁶ : 3 (12 %)	R	K	ASPERGER, 1991
Deutschland	35	8 (23 %) > 10 ² : 7 (20 %)	R	K	HAHN <i>et al.</i> , 1999b
Spanien	18	< 10 ² : 8 (44 %) 10 ² -10 ³ : 4 (22 %) > 10 ³ -10 ⁴ : 5 (28 %) > 10 ⁴ : 1 (6 %)	P	Z	OLARTE <i>et al.</i> , 1999
Tschechien	35	0 (0 %)	k.A.	k.A.	BELIČKOVÁ <i>et al.</i> , 2001
Österreich	41	< 10 ³ : 26 (63 %) 10 ³ -10 ⁴ : 4 (10 %) > 10 ⁴ : 11 (27 %)	R	K	PFLEGER, 2001
Belgien	8	> 10 ⁴ : 1 (12,5 %)	R	Z	DE REU <i>et al.</i> , 2002
Belgien	4	> 10 ² : 1 (25 %)	R	K	DE REU <i>et al.</i> , 2004
Norwegen	4	3 (75 %)	R	K	JØRGENSEN <i>et al.</i> , 2005b
Deutschland	44	0 (0 %)	R, P	Z	OELLIG, 2006
Deutschland	50	4 (8 %) > 10 ¹ -10 ² : 1 (2 %) > 10 ² -10 ³ : 1 (2 %) > 10 ³ -10 ⁴ : 1 (2 %) > 10 ⁵ -10 ⁶ : 1 (2 %)	R, P	Z	AKINEDEN <i>et al.</i> , 2008
Großbritannien	62	< 10 ³ : 59 (95 %) 10 ³ - < 10 ⁴ : 2 (3 %) ≥ 10 ⁴ : 1 (2 %)	R, T	K	LITTLE <i>et al.</i> , 2008
	412	< 10 ² : 412 (100 %)	P	K	
Mexiko	4	3 (75 %)	R	K	RENYE <i>et al.</i> , 2008
	2	0 (0 %)	P	K	

¹⁾ P = pasteurisierte Milch; R = Rohmilch; R, T = Rohmilch, thermisiert; k.A. = keine Angabe

²⁾ K = Kuhmilch; Z = Ziegenmilch; k.A. = keine Angabe

ZÁRATE *et al.* (1997) untersuchten das Wachstumsverhalten von *S. aureus* in Frischkäse aus roher Ziegenmilch, der ohne Starterkulturen hergestellt worden war und entweder frisch (nach 2-3 Tagen) oder nach einer Reifungsphase von 60 Tagen der Untersuchung zugeführt wurde. Bei zwei Tage altem Käsen war zunächst ein Anstieg des *S. aureus*-Gehalts um zwei bis drei Zehnerpotenzen zu verzeichnen. Danach wurde ein rascher Abfall beobachtet. HAMANA *et al.* (2002) untersuchten das Wachstumsverhalten von *S. aureus* in einem marokkanischen Frischkäse „Iben“, der einmal mit und einmal ohne Verwendung von Nisin-produzierenden *Lactococcus lactis* hergestellt worden war. Der Käse wurde mit SEC-produzierenden *S. aureus* beimpft. Bei einer Kontaminationshöhe von 10^3 KbE/g konnte *S. aureus* in Frischkäsen ohne Zusatz von Starterkulturen über einen längeren Zeitraum nachgewiesen werden. In Käsen mit Zusatz von *Lactococcus lactis* wurde ein schneller Abfall des Keimgehaltes beobachtet. Dies führten die Autoren auf die rasche pH-Wert-Senkung zurück. Wenn 10^5 KbE *S. aureus*/g enthalten waren, konnten noch nach drei Tagen *S. aureus* und SEC nachgewiesen werden, unabhängig davon, ob Starterkulturen zugegeben worden waren. Die Untersuchungen zeigen, dass während der Herstellung und Lagerung von Frischkäse ein Wachstum von *S. aureus* und die Produktion von Enterotoxinen möglich sind und dass dies von Starterkulturen beeinflusst werden kann.

2.4.5 Rechtliche Grundlagen

S. aureus wird gemäß VO (EG) Nr. 2073/2005 als Prozesshygienekriterium bewertet. Die mikrobiologischen Kriterien für *S. aureus* in Frischkäse sind in Tabelle 2.22 aufgeführt. Im Fall unbefriedigender Ergebnisse sind Verbesserungen in der Herstellungshygiene vorzunehmen. Wenn Keimgehalte von $> 10^5$ KbE/g Frischkäse nachgewiesen werden, ist die Partie zusätzlich auf Staphylokokken-Enterotoxine zu untersuchen. Bei der Überprüfung des Vorkommens von Staphylokokken-Enterotoxinen handelt es sich jedoch um ein Lebensmittelsicherheitskriterium. Bei in Verkehr gebrachten Erzeugnissen dürfen während der gesamten Haltbarkeitsdauer in 25 g Probe keine Staphylokokken-Enterotoxine nachweisbar sein.

Tabelle 2.22: Grenzwerte (KbE/g) für Koagulase-positive Staphylokokken gemäß VO (EG) Nr. 2073/2005 (Prozesshygienekriterium)

Lebensmittel- kategorie	Proben- nahme		Grenzwerte		Stufe, für die das Kriterium gilt
	n	c	m	M	
Käse aus Rohmilch	5	2	10^4 KbE/g	10^5 KbE/g	Zu einem Zeitpunkt der Herstellung, zu dem der höchste Staphylokokkengehalt erwartet wird ¹⁾
Nicht gereifter Weichkäse (Frischkäse) aus Milch oder Molke, die pasteurisiert oder einer Wärmebehandlung über der Pasteurisierungstemperatur unterzogen wurden ²⁾	5	2	10 KbE/g	100 KbE/g	Ende des Herstellungsprozesses ³⁾

Erläuterung:

n = Anzahl der Probeneinheiten der Stichprobe

c = Anzahl der Probeneinheiten, deren Werte zwischen m und M liegen dürfen

m = Schwellenwert; das Ergebnis gilt als ausreichend, wenn die Keimzahl jeder einzelnen Probe den Wert „m“ nicht übersteigt

M = Höchstwert; das Ergebnis gilt als nicht ausreichend, wenn die Keimzahl einer oder mehrerer Proben den Wert „M“ erreicht oder überschreitet

¹⁾ Im Fall unbefriedigender Ergebnisse sind Verbesserungen in der Herstellungshygiene und bei der Auswahl der Rohstoffe vorzunehmen. Sofern Werte $> 10^5$ KbE/g nachgewiesen werden, ist die Partie Käse auf Staphylokokken-Enterotoxine zu untersuchen.

²⁾ Ausgenommen Käse, bei denen der Hersteller zur Zufriedenheit der zuständigen Behörde nachweisen kann, dass kein Risiko einer Belastung mit Staphylokokken-Enterotoxinen besteht

³⁾ Im Fall unbefriedigender Ergebnisse sind Verbesserungen in der Herstellungshygiene vorzunehmen. Sofern Werte $> 10^5$ KbE/g nachgewiesen werden, ist die Partie auf Staphylokokken-Enterotoxine zu untersuchen.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Materialien

3.1.1 Probenmaterial

Im Jahr 2007 wurden 125 Frischkäse bzw. Frischkäsezubereitungen im Institut für Nahrungsmittelkunde, Professur für Milchwissenschaften der Justus-Liebig-Universität Gießen, auf ihre mikrobiologische Beschaffenheit untersucht. Die Probenauswahl berücksichtigte die derzeitigen Vermarktungs- und Angebotsformen von Frischkäse. Sowohl Proben aus konventioneller als auch aus ökologischer Herstellung wurden im Einzelhandel, auf dem Wochenmarkt sowie in Hofläden bezogen. Der überwiegende Probenanteil stammte aus Hessen, lediglich zehn Proben wurden in Hofläden bzw. auf Wochenmärkten in Nordrhein-Westfalen erworben (7 x Hofladen, 3 x Wochenmarkt). Informationen über die Produkte wurden der Verpackung entnommen bzw. bei unverpackter Ware beim Verkaufspersonal erfragt und protokolliert. Tabelle 3.1 zeigt eine Übersicht der Vermarktungs- und Angebotsformen sowie der Herstellungsweisen der untersuchten Proben. Die Mehrzahl der Proben (76 Proben) wurde im Einzelhandel erworben. Zum Einzelhandel zählten Lebensmittelgeschäfte, die sowohl Waren aus konventioneller als auch aus ökologischer Herstellung angeboten haben. Fünf Proben stammten aus dem Reisegewerbe. Der Ausdruck Reisegewerbe bezeichnet das „Feilbieten von Waren, die ohne vorherige Bestellung außerhalb der eigenen gewerblichen Niederlassung oder ohne eine solche zu haben angeboten werden“ (§ 55 Gewerbeordnung). Außerdem wurden 22 im Hofladen erworbene Proben untersucht. Bei einem Hofladen handelt es sich um einen noch im Hofbereich hergerichteten Raum, der der Vermarktung (selbsterzeugter) landwirtschaftlicher Produkte dient. Das Frischkäse-Sortiment der Hofläden bestand neben Produkten aus eigener Herstellung (Direktvermarktung) zumeist auch aus zugekaufter Ware. Zur Bezeichnung der Vermarktungsform dieser Proben wurde in den folgenden Abschnitten auf die Differenzierung zwischen Direktvermarktung und Zukauf verzichtet und die Proben werden alle der Gruppe „Hofladen“ zugeordnet. Des Weiteren wurden 22 Proben von Wochenmärkten bezogen. Der Begriff Wochenmarkt bezeichnet eine „regelmäßig wiederkehrende, zeitlich begrenzte Veranstaltung, auf der eine Vielzahl von Anbietern eine oder mehrere Waren anbieten“ (§ 67 Gewerbeordnung).

Nach Inkrafttreten der Verordnung zur Durchführung von Vorschriften des gemeinschaftlichen Lebensmittelhygienerechts vom 8. August 2007 wurden Änderungen der Käseverordnung vollzogen. Das Wärmebehandlungsgebot für Milch zur Herstellung von Frischkäse ist weggefallen. Bei den untersuchten Proben hatte allerdings jeder Hersteller pasteurisierte Milch verwendet und demzufolge waren keine Rohmilch-Frischkäse unter dem Probenmaterial vertreten. Hinsichtlich der Tierart stammte die Milch bei der Mehrzahl der Proben von Kühen (100 Proben), außerdem wurde Milch von Ziegen (12 Proben) und Schafen (7 Proben) verwendet. Bei sechs Proben konnte anhand der Verpackung nicht eindeutig differenziert werden, ob Kuh- oder Schafmilch bzw. ob Schaf- oder Ziegenmilch als Grundlage für den Käse diente. Die Gruppierung der verschiedenen Frischkäse auf Basis ihrer Hauptzutat (Definitionen gemäß TÄUFEL *et al.*, 1993) ist in Abbildung 3.1 dargestellt.

Tabelle 3.1: Übersicht zu Vermarktungs- und Angebotsformen sowie zu Herstellungsweisen der untersuchten Frischkäse bzw. Frischkäsezubereitungen

Vermarktungsform	Herstellung	Angebotsform ¹⁾	Probenzahl	D	F	DK	B	NL
Einzelhandel	konventionell	u	30	30	-	-	-	-
		F	37	22	5	10	-	-
	ökologisch	F	9	9	-	-	-	-
Einzelhandel, Reisegewerbe ²⁾	konventionell	F	5	5	-	-	-	-
Hofladen	ökologisch	u	11	11	-	-	-	-
		F	11	10	-	-	-	1
Wochenmarkt	konventionell	u	21	20	-	-	1	-
	ökologisch	u	1	1	-	-	-	-
Summe			125	108	5	10	1	1

D = Deutschland; F = Frankreich; DK = Dänemark; B = Belgien; NL = Niederlande

¹⁾ u = unverpackt; F = Fertigpackung

²⁾ der Ausdruck Reisegewerbe bezeichnet das gewerbsmäßige Feilbieten von Waren ohne vorherige Bestellung außerhalb der eigenen gewerblichen Niederlassung oder ohne eine solche zu haben (nach § 55 Gewerbeordnung)

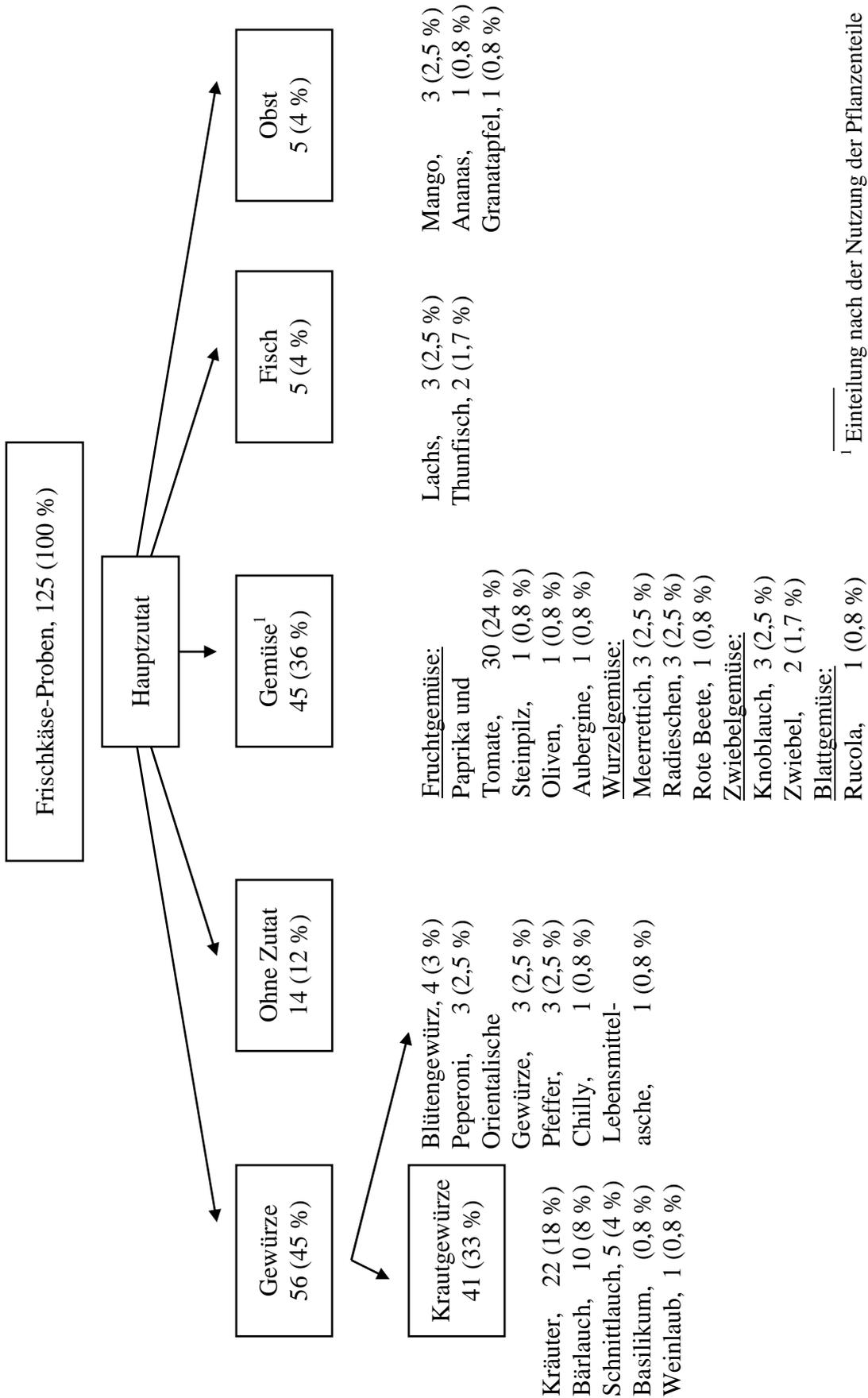


Abbildung 3.1: Übersicht zur Gruppierung der Frischkäse bzw. Frischkäsezubereitungen auf Basis ihrer Hauptzutut

3.1.2 Nährmedien und Reagenzien

Allgemein

Caseinpepton-Sojamehlpepton-Agar USP (CASO-Agar)	VWR, Darmstadt, Deutschland 1.05458.0500
Caseinpepton-Sojamehlpepton-Bouillon (CASO-Bouillon)	VWR 1.05459.0500
Columbia-Agar-Basis	VWR 1.10455.0500
GRAM-Color	
Lösung 1: Kristallviolettlösung	VWR 1.11885./1
Lösung 2: LUGOLS Lösung, stabil	VWR 1.11885./2
Lösung 3 + 4: Entfärbelösung	VWR 1.11885./3 + 4
Lösung 5: Safraninlösung	VWR 1.11885./5
Kaliumhydroxidplätzchen	VWR 1.05033.0500
Natriumchlorid-Lösung (0,14 mol/l)	Bestand Institut
Ringerlösung	Oxoid, Wesel, Deutschland BR 0052 G
Schafblut defibriniert	Elocin-lab GmbH, Mühlheim an der Ruhr, Deutschland 30.100.100
Steriles Aqua destillatum	Bestand Institut
Wasserstoffperoxid 3 %	VWR 1.07210.0250

Qualitativer Nachweis von *Enterobacteriaceae* und quantitative Bestimmung von coliformen Keimen bzw. *Escherichia coli*

api [®] 20 E	bioMérieux, Nürtingen, Deutschland 20100
api [®] 20 E Reagenzienkit	bioMérieux 20120
api [®] NaCl 0,85 % Medium, 5 ml	bioMérieux 20230
Bactident-Oxidase	VWR 1.13300.0001
BBL [™] Enterotube [™] II	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland 273176

Enterobacteriaceae Enrichment Broth (E. E. Broth)	BioRad, München, Deutschland 3564794
Fluorocult® Laurylsulfat-Bouillon	VWR 1.12588.0500
Fluorocult® VRB-Agar	VWR 1.04030.0500
Gepuffertes Peptonwasser	BioRad 64684
Identifizierungssoftware apiweb™	bioMérieux 40011
KÓVACS Indolreagenz	VWR 1.09293.0100
Paraffinöl	bioMérieux 70.100
Selektiver <i>E. coli</i> /Coliformen-Chromogen-Agar (ECC-Agar)	Oxoid CM 1046
Violet-Red-Bile-Glucose-Agar (VRBG-Agar)	Acumedia, Düsseldorf, Deutschland 7425 A

Quantitative Bestimmung von Koagulase-positiven Staphylokokken

BBL™ Coagulase Plasma mit EDTA	bioMérieux 10300
Baird-Parker-Agar	VWR 1.05406.0500
Eigelb-Tellurit-Emulsion (Egg-Yolk-Tellurite-Emulsion)	Oxoid 5 R 0054 C

Qualitativer Nachweis von *Listeria monocytogenes*

api® Listeria	bioMérieux 10300
BBL™ Bacto Purple Broth Base	Becton Dickinson 211558
D(+)-Mannit	VWR 1.59536.0015
D(+)-Xylose	VWR 1.08689.0025
FRASER-Listeria-Selektiv- Anreicherungsbouillon (Basis)	VWR 1.10398.0500
FRASER-Listeria-Selektiv-Supplement	VWR 1.10399.0001
L(+)-Rhamnose	VWR 1.04736.0025
McFarland Standard	bioMérieux 70.900
PALCAM-Listeria-Selektivagar (Basis)	VWR 1.11755.0500
PALCAM-Listeria-Selektivsupplement nach van Netten <i>et al.</i>	VWR 1.12122.0001

Molekularbiologische Charakterisierung der *E. coli*-Isolate mittels**Polymerasekettenreaktion (PCR)**

dNTP-Set (10 mmol/l, 4 x 0,25 ml)	MBI Fermentas, St. Leon-Roth, Deutschland R 0181
Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml)	Sigma, Taufkirchen, Deutschland 46067
PCR-Kit:	
Inkubationspuffer, 10fach	Applied Biosystem, Darmstadt, Deutschland 4311816
Magnesiumchlorid (25mmol/l)	
Taq-Polymerase (5 U/ μ l)	
Marker Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder (0,5 mg DNA/ml)	MBI Fermentas SM 0241
6 x Orange Loading Dye Solution	MBI Fermentas R 0631
SeaKem® LE Agarose	Biozym, Hessisch-Oldendorf, Deutschland 840.004
TAE-Puffer 50-fach	
242 g Tris-Basis Supra Pure	Roth, Karlsruhe, Deutschland 5429.3
57,1 ml Eisessig (100 %) Supra Pure	VWR 100066
100 ml EDTA (0,5 mol/l), pH 8,0	Sigma E 7889
1000 ml Aqua destillatum	

3.1.3 Laborgeräte und Verbrauchsmaterial

Abzug invent FCS LAFA™	vvert Laborbau, Deutschland
Accu-jet® pro Pipettierhelfer, Brand	VWR 612-2625
Agarclav	Integra Biosciences, biomedis, Laborservice GmbH, Gießen, Deutschland ID-Nr. 001705
alupro® (Alufolie)	VWR 293-4187
Autoclav SterVis	Holzner, Stuttgart, Deutschland
Autoclavierwannen	euro-clinic, München, Deutschland
Bag Filter® P (Homogenisierungsbeutel)	Transia GmbH, Ober-Mörlen, Deutschland 85002

Bag light [®] 400 ml (Homogenisierungsbeutel)	Transia 85011
BBL [™] Enterotube [™] II Codebuch	Becton Dickinson
Brutschrank B 12	Heraeus, Hanau, Deutschland 50042307
Brutschrank B 20	Heraeus 50042313
Brutschrank Thermo B 6420	Thermo Electron Cooperation, Neumental, Deutschland 51015281
Continent MW 800, Mikrowelle	Continent, Deutschland CW 1109-3
Cryobank [™] blau	Mast diagnostica, Reinfeld, Deutschland 291704
Cryobank [™] -Aufbewahrungsbox, grün	Mast diagnostica 291692
Deckgläschen, 18 x 18 mm	VWR 631-1331
DNA UV-Cleaner, UVC/T	Kisker Biotech, Steinfurt, Deutschland
Drigalski-Spatel aus Edelstahl, 19,5 cm, Ø 4 mm	Bestand Institut
Einkanalpipette, Eppendorf, 1000 µl	VWR 613-3641, Modell Reference
Einkanalpipette, Eppendorf, 200 µl	VWR 613-3637, Modell Reference
Erlenmeyerkolben, 250 ml gasprofi 1	VWR 214-1172 WLD Tec, Göttingen, Deutschland 6.001.000
Gefriertruhe Heraeus Freeze 286 Basic, -80 °C	Kendro Laboratory Products, Hanau, Deutschland 51014684
Gel-Doc 2000, Geldokumentationssystem	BioRad
Gelelektrophorese Power Pac 1000	BioRad
Gelkammer	BioRad
Glaspipette, 1 ml	VWR 612-1105
Glaspipette, 10 ml	VWR 612-1114
Handschuhe, Gr. M	VWR 11.21526
iCycler	BioRad
Immersionsöl	VWR 1.04699.0500
Impfösenhalter	VWR 231-2572
LABOCAP-Kappen	VWR 391-5906
Magnetrührer Heidolph mit Heizung MR 3001	VWR 442-1203
Magnetrührstäbchen	VWR 442-0059

Meßkette	WTW-Inolab, Weilheim, Deutschland 0881/183-0
Microprocessor pH-Meter pH 537	WTW-Inolab
Objektträger Menzel	VWR 631-0098
Petrischalen	Nerbe, Winsen/Luhe, Deutschland 09.031.0000
PICO 17 Zentrifuge	Heraeus
Pipettenspitzen, blau, 1000 µl	Fa. Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland 70762
Pipettenspitzen, gelb, 200 µl	Fa. Sarstedt 760002
Platin-/Iridiumdraht, Ø 0,5 mm	VWR 631.7114
Reagenzgläser mit Gewinde, 50 ml	VWR 212-1536
Reagenzgläser, 10 ml	VWR 212-1118
Reaktionsgefäße, 0,2 ml	Fa. Sarstedt
Reaktionsgefäße, 1,5 ml	Fa. Sarstedt
Schlauch für Agarclav, Ø 4 mm	biomedis A 515100
Schüttelwasserbad GFL 1083	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland Nr. 1076591 J
Schüttler Kottermann® 4010	Kottermann, Hänigsen, Deutschland
SONY Video Graphic Printer UP-895 CE	Sony, Tokyo, Japan
Stereomikroskop Axioplan	Zeiss, Wetzlar, Deutschland
Stereomikroskop Stemi DV 4	Zeiss
Stomacher 400 Circulator	Seward, Norfolk, England
Tecnomat 125, Plattengießer	Laborservice GmbH, ID-Nr. 001704
UV-Detektion LAMAG,	VWR 552-0053
UV-Lampe mit dualer Wellenlänge 254/366 nm	
Vortex VF 2	JK Janke & Kunkel IKA® - Labortechnik
Waage	Explorer Ohaus® Item No. E0D 120
Wasserbad GFL 1002	Gesellschaft für Labortechnik mbH
Wattestäbchen, steril, Holz/Baumwolle	VWR 115-8270
Zentrifuge 3200	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

3.1.4 Primer

Zielgene	Primerpaar	Referenzen	Herkunft
<i>stx1</i> und <i>stx2</i>	MK 1 MK 2	KARCH & MEYER, 1989	MWG-Biotech GmbH, Ebersberg, Deutschland

3.1.5 Bakterien-Referenzstämme

Die verwendeten Bakterien-Referenzstämme wurden auf Columbia-Schafblut-Agarplatten bei einer Temperatur von 4 °C aufbewahrt. Einmal pro Woche wurden frische Subkulturen auf neue Columbia-Schafblut-Agarplatten angelegt.

Tabelle 3.2: Aufführung der verwendeten Bakterien-Referenzstämme (ohne VTEC)

Mikroorganismus	Stammbezeichnung	Herkunft
<i>Enterobacter cloacae</i>	ATCC 13047	Max von Pettenkofer-Institut, LMU München
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	Professur für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde, JLU Gießen
<i>Listeria innocua</i>	ATCC 33090	Professur für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde, JLU Gießen
<i>Listeria ivanovii</i>	ATCC 19119	Professur für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde, JLU Gießen
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19116	Professur für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde, JLU Gießen
<i>Rhodococcus equi</i>	ATCC 6939	Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, JLU Gießen
<i>Staphylococcus aureus</i>	keine Angabe	Professur für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde, JLU Gießen

Tabelle 3.3: Aufführung der verwendeten Bakterien-Referenzstämme für VTEC

Bezeichnung	Herkunft	isoliert aus	Serovar	gebildete Toxine
B 2324	Professur für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde, JLU Gießen	Rinderkot	O157:H7	VT 2
B 2405	Professur für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde, JLU Gießen	Rinderkot	O3:H ⁻	VT 1

3.2 Methoden

3.2.1 Probennahme

Die Proben wurden im Einzelhandel, auf dem Wochenmarkt und in Hofläden erworben. Nach Erwerb wurden die Frischkäse umgehend, ohne Unterbrechung der Kühlkette, zum Labor transportiert. Nach Kennzeichnung mit der laufenden Untersuchungsnummer wurden die Proben bei + 4 °C gelagert. Die Untersuchung erfolgte am nächsten Tag bzw. innerhalb von 14 Tagen nach Probeneingang, in Abhängigkeit der angegebenen Haltbarkeit (bei unverpackter Ware kürzer als bei Ware in Fertigpackung). Die im Rahmen der Probenuntersuchung gewonnenen Isolate von *E. coli* wurden bei – 80 °C aufbewahrt, um später mittels PCR auf das Vorkommen der Gene *stx1* und *stx2* überprüft zu werden.

Im Rahmen einer Zusatzuntersuchung wurde der mikrobiologische Status von Frischkäse während der Lagerung untersucht. Dazu wurden fünf unverpackt angebotene Frischkäse aus dem Einzelhandel erworben, deren Haltbarkeit laut Verkaufspersonal sieben Tage betrug. Die Proben wurden an Tag 1, Tag 4 und Tag 7 nach Erwerb untersucht, wobei der siebte Tag dem letzten Tag der angegebenen Mindesthaltbarkeit entsprach. Jeder Untersuchungsansatz bestand jeweils aus einem qualitativen Nachweis von *Enterobacteriaceae*, einer quantitativen Bestimmung von coliformen Keimen bzw. *E. coli* und dem Nachweis von Listerien sowie der quantitativen Bestimmung von Koagulase-positiven Staphylokokken. Während des Untersuchungszeitraums wurden die Frischkäse im Kühlschrank bei einer Temperatur von + 6 °C aufbewahrt.

3.2.2 Spezifische Untersuchungsverfahren

Die mikrobiologischen sowie molekularbiologischen Untersuchungen wurden sowohl in Anlehnung an die Methoden der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 des Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuchs (LFGB) durchgeführt als auch in Anlehnung an die internationalen Normen der International Organization for Standardization (ISO). Abweichungen in der Vorgehensweise begründeten sich zum einem in labortechnischen Gründen, zum anderen in dem jeweiligen Untersuchungsziel und sind bei der Beschreibung der einzelnen Verfahren näher erläutert.

Tabelle 3.4: Auflistung der in Anlehnung angewandten Methoden

Parameter	Methode (nach § 64 LFGB bzw. ISO-Norm)
Probenvorbereitung	L 01.00-1
<i>Enterobacteriaceae</i>	ISO 21528-1:2004
Coliforme Keime bzw. <i>Escherichia coli</i>	L 01.00-54 bzw. ISO 10183:1992
	L 01.00-3
Bestätigung <i>Escherichia coli</i>	L 00.00-21
<i>Listeria monocytogenes</i>	L 00.00-32 bzw. ISO 11290-1:1996
Koagulase-positive Staphylokokken	L 00.00-55 bzw. ISO 6888-1:2003
Überprüfung des Vorkommens von <i>stx1</i>	L 00.00-45 bzw. ISO 22174:2005
und <i>stx2</i> mittels PCR	L 07.18-1

3.2.3 Qualitativer Nachweis und Identifizierung von *Enterobacteriaceae*

Der Nachweis von *Enterobacteriaceae* erfolgte in Anlehnung an die DIN EN ISO-Norm 21528-1:2004 „Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal methods for the detection and enumeration of *Enterobacteriaceae* – Part 1: Detection and enumeration by MPN technique with pre-enrichment“. In dieser Arbeit erfolgte lediglich eine qualitative Untersuchung. Unter sterilen Bedingungen wurden jeweils 10 g einer Frischkäseprobe in 90 ml gepuffertem Peptonwasser eingewogen und mit Hilfe eines Beutel-Walkmischgerätes 2 min bei Raumtemperatur homogenisiert. Die Anschüttelung

wurde zur nicht selektiven Voranreicherung für 24 h bei 37 °C im Schüttelwasserbad inkubiert. Anschließend wurden 1 ml der Voranreicherung in 10 ml *Enterobacteriaceae* Enrichment Broth (EEB) überführt und zur selektiven Anreicherung für weitere 24 h bei 37 °C inkubiert. Aus der selektiven Anreicherung wurden jeweils 0,1 ml im Doppelsatz auf Violet-Red-Bile-Glucose-Agar (VRBG-Agar) mit einem sterilen Spatel verteilt. Parallel wurde aus dieser Anreicherung ein fraktionierter Ösenausstrich sowohl auf VRBG-Agar als auch auf dem selektiven *E. coli*/Coliformen-Chromogen-Agar (ECC-Agar) angefertigt. Zusätzlich wurden Positivkontrollen (*Escherichia coli* ATCC 25922 und *Enterobacter cloacae* ATCC 13047) und Negativkontrollen (*Staphylococcus aureus*) mitgeführt. Die beimpften Platten wurden 24 h bei 37 °C bebrütet und anschließend auf das Wachstum von typischen Kolonien überprüft. Diese stellten sich auf VRBG-Agar als dunkelrote bis rosa Kolonien mit oder ohne roten Hof dar. Auf ECC-Agar zeigten violette Kolonien das Wachstum von *E. coli* und rosa Kolonien das Wachstum von coliformen Keimen an. Charakteristische Kolonien wurden auf Caseinpepton-Sojamehlpepton-Agar (CASO-Agar) überführt und nach einer Bebrütungsdauer von 24 h bei 37 °C vorläufig biochemisch mittels KOH- und Cytochromoxidase-Test bestätigt. Zur Durchführung des KOH-Tests wurde eine Öse Material aus der zu prüfenden Kolonie auf einem Objektträger in einem Tropfen (ca. 10 µl) 3%iger Kalilauge verrieben. Bei sichtbarer Viskositätssteigerung wurde der Test als positiv gewertet und es handelte sich um gramnegative Keime. Das Gramverhalten wurde stichprobenartig auch per Gramfärbung festgestellt. Zur Prüfung auf Cytochromoxidase-Aktivität wurde eine Kolonie auf der Reaktionszone eines kommerziellen Teststäbchens (Bactident-Oxidase, VWR) verrieben, wobei *Enterobacteriaceae* nach 30 s keine Blaufärbung ergaben. KOH-positive, Oxidase-negative Kolonien wurden entweder mittels api[®] 20 E oder BBL[™] Enterotube[™] II identifiziert. Die Testsysteme zur Identifizierung wurden gemäß Herstellerangaben verwendet. Für weitere Untersuchungen wurden frische Reinkulturen der *E. coli*-Isolate in ein CRYOBANK[™]-Kryoröhrchen, entsprechend einer McFarland-Dichte von 3-4, geimpft und im Gefrierschrank bei – 80 °C gelagert. Die einzelnen Untersuchungsschritte sind in Abbildung 3.2 schematisch dargestellt.

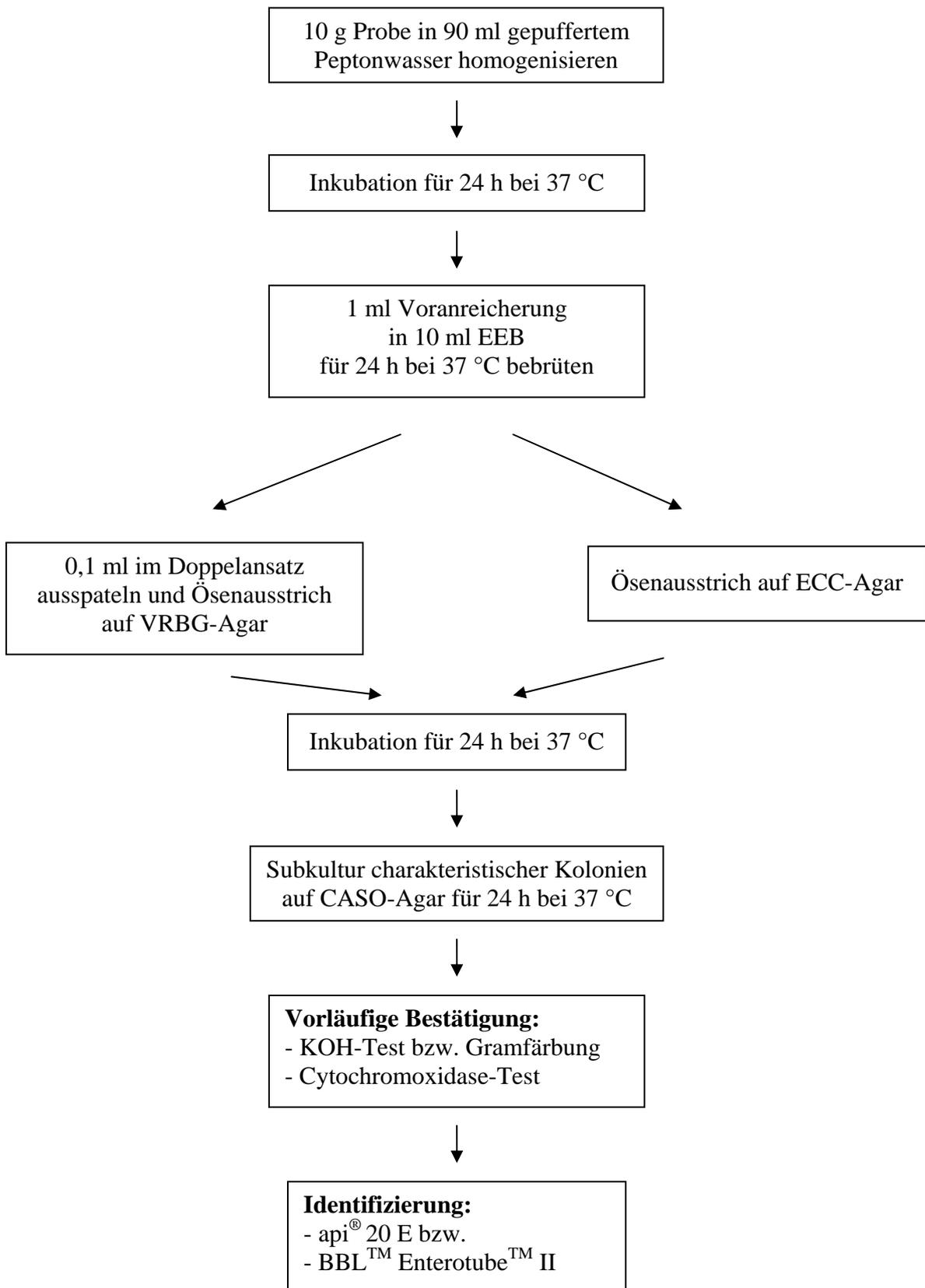


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung der Untersuchungsschritte zum qualitativen Nachweis und zur Identifizierung von *Enterobacteriaceae* in Anlehnung an DIN EN ISO 21528-1:2004

3.2.4 Quantitative Bestimmung von coliformen Keimen bzw. *Escherichia coli*

Die Bestimmung von coliformen Keimen bzw. *Escherichia (E.) coli* erfolgte in Anlehnung an die Methode L 01.00-54 „Bestimmung der *Escherichia coli* in Milch und Milchprodukten – Fluoreszenzoptisches Verfahren mit paralleler Bestimmung coliformer Keime“ (Übernahme der gleichlautenden deutschen Norm DIN 10183:1992). Unter sterilen Bedingungen wurden 10 g einer Probe in 90 ml viertelstarker Ringerlösung eingewogen und im Beutel-Walkmischgerät 2 min bei Raumtemperatur homogenisiert. Aus dieser Anschüttelung wurde eine dezimale Verdünnungsreihe in viertelstarker Ringerlösung von 10^{-1} bis 10^{-3} hergestellt. Pro Verdünnungsstufe wurde jeweils 1 ml in drei Kulturröhrchen geimpft, die 10 ml eines einfach konzentrierten selektiven Laurylsulfat-Tryptose-Nährmediums mit Zusatz von Tryptophan und 4-Methylumbelliferyl- β -D-glucuronid (LST-MUG) enthielten. Parallel dazu wurden drei Kulturröhrchen, die je 10 ml doppelt konzentriertes LST-MUG enthielten, mit jeweils 10 ml der Anschüttelung beimpft. Alle Kulturröhrchen waren mit einem Durham-Röhrchen beschickt. Der Inhalt der beimpften Röhrchen wurde durch vorsichtiges Schwenken gemischt. Nach Bebrütung bei 30 °C wurden nach 24 h und 48 h die Fluoreszenz durch Anregung mit langwelligem UV-Licht bei 366 nm (*E. coli*), die Indolbildung mittels KÓVACS-Reagenz (*E. coli*) und die Gasbildung (coliforme Keime) geprüft. Eine hellblaue Fluoreszenz galt als positiv, die Indolbildung wurde durch einen kirschroten Farbumschlag der Alkoholschicht bestätigt und die Gasbildung durch eine deutliche Gasblase im Durham-Röhrchen. Aus der Anzahl der Kulturröhrchen mit positiver Reaktion wurde aus drei aufeinander folgenden Verdünnungsstufen eine Indexziffer gebildet und mittels MPN-Tabelle (nach L 01.00-54 für Verdünnungsreihen mit dreifachem Ansatz) die Anzahl von coliformen Keimen bzw. *E. coli* je g bestimmt. Zweifelhafte Kulturen wurden in weitere Kulturröhrchen, die einfach konzentriertes LST-MUG enthielten, überimpft. Ein zweifelhaftes Ergebnis galt als positiv, wenn nach 24 h und 48 h Bebrütung bei 30 °C erneut Fluoreszenz und Indolbildung (*E. coli*) oder Gasbildung (coliforme Keime) auftraten. Aus jedem Kulturröhrchen, das zur Bildung der Indexziffer herangezogen wurde, wurde außerdem ein fraktionierter Ösenausstrich auf CASO-Agar angefertigt. Nach einer Bebrütung von 24 h bei 37 °C wurden KOH-positive, Oxidase-negative Kolonien mittels api[®] 20 E oder BBL[™] Enterotube[™] II identifiziert.

Die Proben wurden darüber hinaus in Anlehnung an die Methode L 01.00-3 „Bestimmung der coliformen Keime in Milch, Milchprodukten, Butter, Käse und Speiseeis – Verfahren mit festem Nährboden“ untersucht. Aus der Anschüttelung (Verdünnungsstufe 10^{-1}) wurden im Doppelansatz jeweils 0,33 ml auf drei Agarplatten mit Violet-Red-Bile-Agar mit 4-Methylumbelliferyl- β -D-glucuronid (VRB-MUG-Agar) und auf drei Platten mit ECC-Agar mit einem sterilen Spatel gleichmäßig verteilt. Für die Verdünnungsstufen 10^{-2} bis 10^{-3} wurden im Doppelansatz jeweils 0,1 ml der dezimalen Verdünnungsreihe auf den Nährmedien mittels Spatel verteilt. Die beimpften Platten wurden für 24 h bei 37 °C bebrütet und auf typische Kolonien untersucht. Auf VRB-MUG-Agar stellten sich coliforme Keime als rosafarbene bis dunkelrote Kolonien dar. Charakteristische Kolonien von *E. coli* besaßen außerdem, bei Anregung mit langwelligem (366 nm) UV-Licht, einen fluoreszierenden Hof. Auf ECC-Agar wurden violette Kolonien als *E. coli* und rosa Kolonien als coliforme Keime gewertet (s. 3.2.3). Von charakteristischen Kolonien wurden Subkulturen auf CASO-Agar angefertigt, die 24 h bei 37 °C bebrütet wurden. KOH-positive, Oxidase-negative Kolonien wurden mittels api[®] 20 E oder BBL[™] Enterotube[™] II identifiziert. Aus der Anzahl der charakteristischen Kolonien wurde die Anzahl der coliformen Keime und der *E. coli* mittels des gewogenen arithmetischen Mittels je g Probe nach der folgenden Formel berechnet.

$$\bar{c} = \frac{\sum c}{n_1 \times 1 + n_2 \times 0,1} \times d$$

\bar{c} = Anzahl coliformer Keime bzw. *E. coli* je g

$\sum c$ = Summe der typischen Kolonien aller Agarplatten, die zur Berechnung herangezogen wurden

n_1 = Anzahl der Agarplatten der niedrigsten Verdünnungsstufen, die zur Berechnung herangezogen wurden

n_2 = Anzahl der Agarplatten der nächsthöheren Verdünnungsstufe, die zur Berechnung herangezogen wurden

d = Faktor der niedrigsten ausgewerteten Verdünnungsstufe; hierbei handelt es sich um die auf n_1 bezogene Verdünnungsstufe

Sowohl bei dem MPN-Verfahren als auch bei der Verwendung fester Nährmedien wurden Positivkontrollen (*Escherichia coli* ATCC 25922 und *Enterobacter cloacae* ATCC 13047) und Negativkontrollen (*Staphylococcus aureus*) mitgeführt. Die jeweils aus den beiden Untersuchungsansätzen isolierten *E. coli* wurden nach Anfertigung frischer Reinkulturen für weitere Untersuchungen bei -80 °C aufbewahrt (s. 3.2.3). Die einzelnen Untersuchungsschritte sind in Abbildung 3.3 schematisch dargestellt.

Die neutrale Anschüttelung in Ringerlösung aus diesem Untersuchungsgang wurde außerdem zur Messung des pH-Wertes per Messelektrode verwendet.

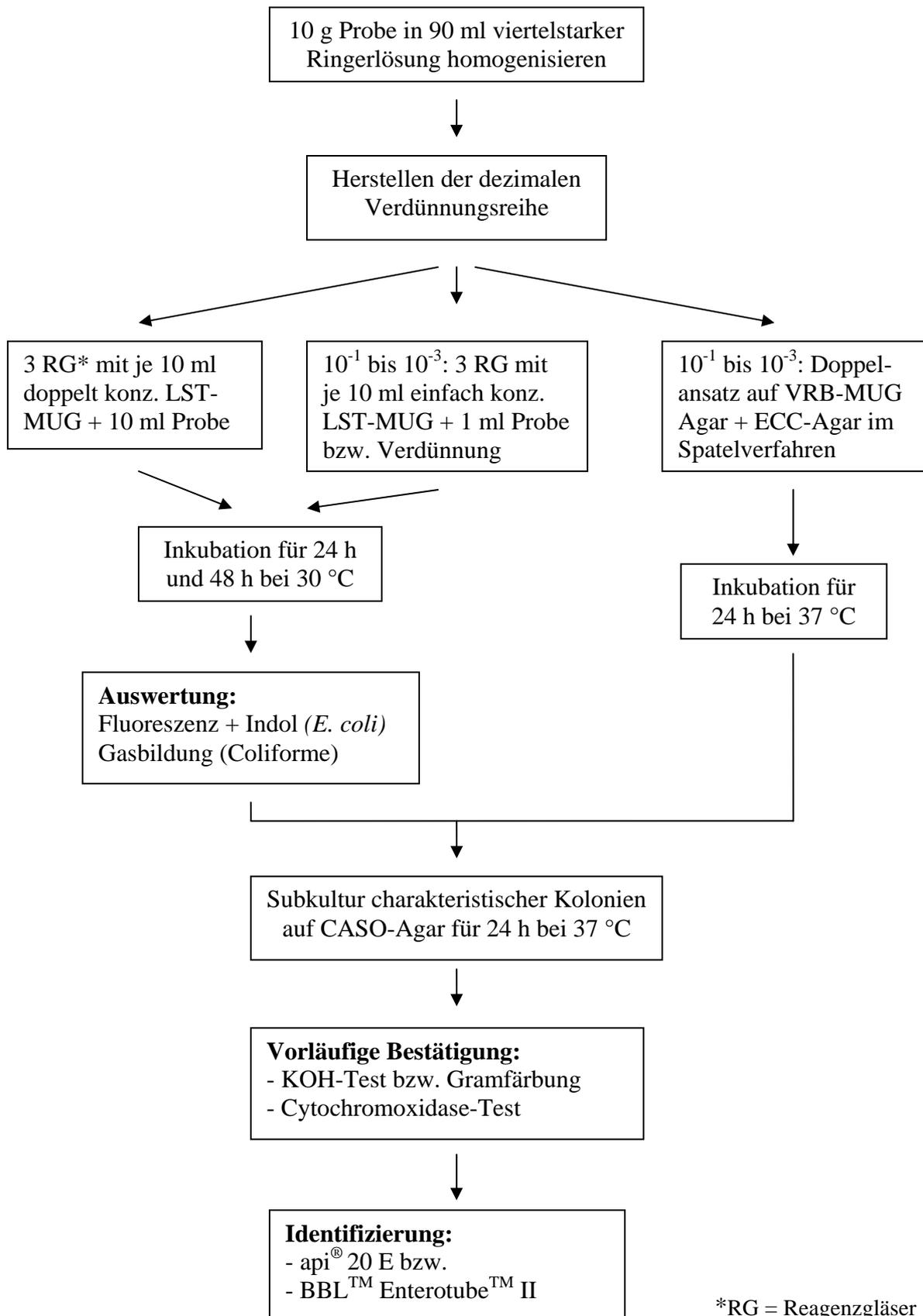


Abbildung 3.3: Schematische Darstellung der Untersuchungsschritte zur quantitativen Bestimmung von coliformen Keimen bzw. *E. coli* in Anlehnung an die Methoden L 01.00-54 und L 01.00-3 nach § 64 LFGB

3.2.5 Qualitativer Nachweis von *Listeria monocytogenes*

Der Nachweis von *Listeria (L.) monocytogenes* erfolgte in Anlehnung an die Methode L 00.00-32 „Horizontales Verfahren für den Nachweis und die Zählung von *Listeria monocytogenes* – Teil 1: Nachweisverfahren“ (Übernahme der gleichnamigen DIN EN ISO 11290-1:1996). Jeweils 25 g einer Probe wurden zu 225 g eines ersten selektiven Anreicherungsmediums (½ Fraser-Bouillon) gegeben und im Beutel-Walkmischgerät 2 min bei Raumtemperatur homogenisiert. Nach Inkubation der ersten Suspension für 24 h bei 30 °C, wurden 0,1 ml in 10 ml eines zweiten selektiven Anreicherungsmediums (Fraser-Bouillon) überführt und 48 h bei 37 °C bebrütet. Im Anschluß erfolgte von beiden Anreicherungskulturen jeweils ein fraktionierter Ösenausstrich auf Polymyxin-Acriflavin-Lithiumchlorid-Ceftazidim-Aesculin-Mannitol-Agar (PALCAM-Agar). Dieser wurde für 24 h und 48 h bei 37 °C bebrütet und auf das Wachstum von charakteristischen Kolonien überprüft, die sich als grün-graue Kolonien mit eingesunkenem Zentrum und einer braunschwarzen Verfärbung des Agars darstellten. Jeweils fünf typische Kolonien (bzw. bei geringer Anzahl alle Kolonien) wurden auf CASO-Agar überführt und 24 h bei 37 °C bebrütet. Auf diesem Agar waren charakteristische Kolonien 1 bis 2 mm groß, farblos bis weiß durchscheinend und hatten einen regelmäßigen Rand. Sie wurden im schrägen Durchlicht (Henry-Beleuchtung) betrachtet, dabei zeigten Kolonien von *Listeria spp.* eine blaue Färbung und eine körnige Oberfläche. Weiterhin wurden die Katalase-Aktivität, das Gramverhalten und die Beweglichkeit überprüft. Katalase-positive, grampositive, bewegliche Kolonien wurden weiter differenziert. Auf Columbia-Schafblut-Agar wurde der CAMP-Test gegen *Staphylococcus aureus* (positiv mit *L. monocytogenes*) und *Rhodococcus equi* (positiv mit *L. ivanovii*) durchgeführt, hierbei konnte gleichzeitig, nach einer Bebrütung für 24 h bei 37 °C, die Hämolyseform überprüft werden. *L. monocytogenes* und *L. ivanovii* zeigten eine deutliche β -Hämolyse, während *L. innocua* keine bzw. nur eine schwache Hämolysezone aufwies. Es wurde außerdem die Fähigkeit zum Kohlenhydratabbau (Rhamnose, Xylose, Mannit) untersucht, wobei eine Gelbfärbung nach einer bis zu fünftägigen Inkubation bei 37 °C als positiv gewertet wurde. In Tabelle 3.5 sind typische Reaktionen zur Bestimmung von *Listeria spp.* zusammengefasst. Charakteristische Kolonien wurden durch Verwendung eines Testsystems (api[®] Listeria) identifiziert. Die schematische Darstellung der Untersuchungsschritte zeigt Abbildung 3.4. Bei allen Reaktionen dienten *L. monocytogenes* ATCC 19116, *L. innocua* ATCC 33090

und *L. ivanovii* ATCC 19119 als Positivkontrollen und *Staphylococcus aureus* als Negativkontrolle.

Tabelle 3.5: Reaktionen zur Bestimmung von *Listeria spp.* gemäß L 00.00-32

Spezies	Hämo-lyse	CAMP-Test		Säureproduktion		
		<i>S. aureus</i>	<i>R. equi</i>	Rhamnose	Xylose	Mannit
<i>L. monocytogenes</i>	+	+	-	+	-	-
<i>L. innocua</i>	-	-	-	V	-	-
<i>L. ivanovii</i>	+	-	+	-	+	-
<i>L. seeligeri</i>	(+)	(+)	-	-	+	-
<i>L. welshimeri</i>	-	-	-	V	+	-
<i>L. grayi ssp. grayi</i>	-	-	-	-	-	+
<i>L. murrayi ssp. murrayi</i>	-	-	-	V	-	+

+ = positive Reaktion in mehr als 90 % der Fälle

- = keine Reaktion

(+) = schwache Reaktion

V = unterschiedliche Reaktion

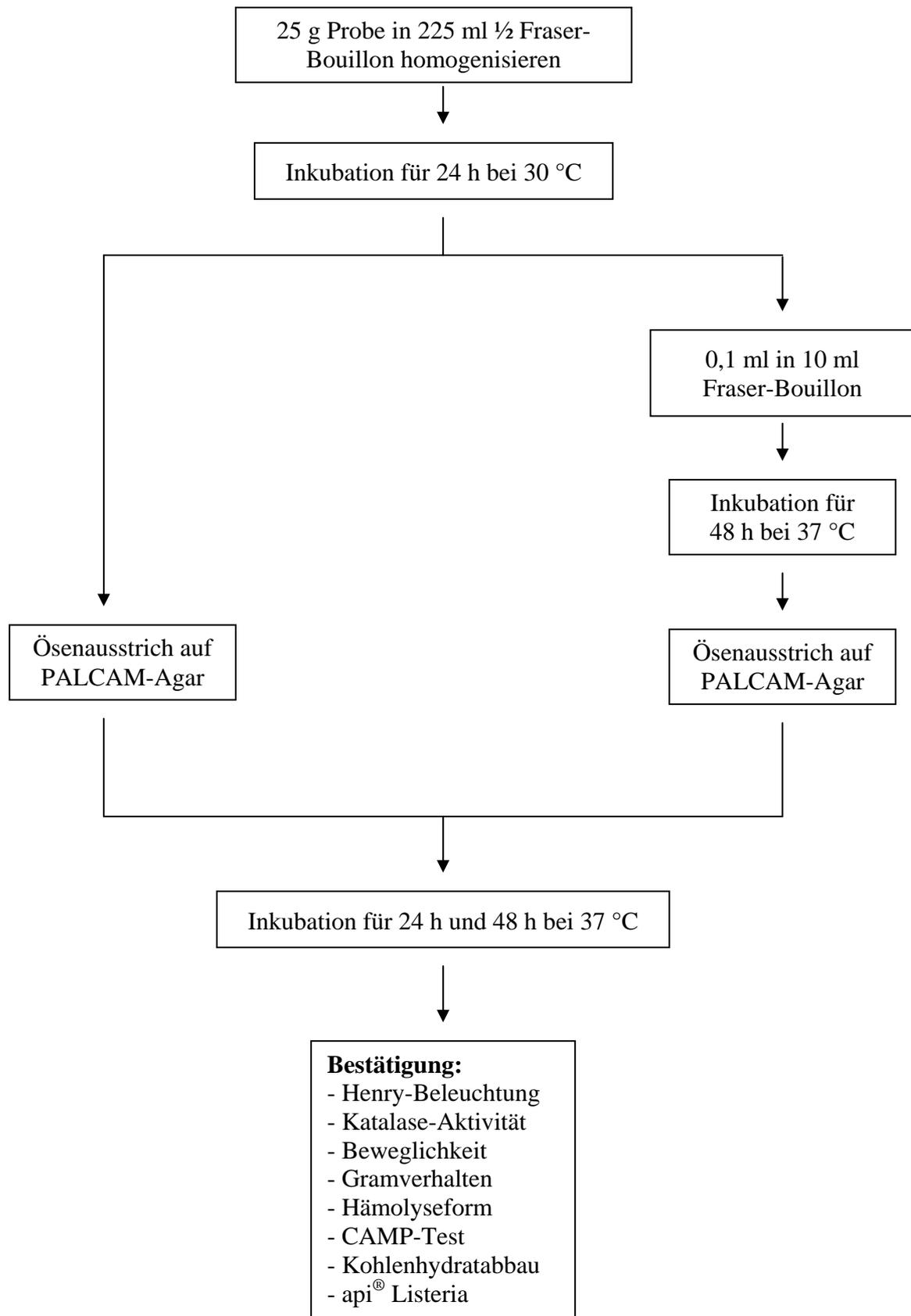


Abbildung 3.4: Schematische Darstellung der Untersuchungsschritte zum qualitativen Nachweis von *Listeria monocytogenes* in Anlehnung an die Methode L 00.00-32 nach § 64 LFGB

3.2.6 Quantitative Bestimmung von Koagulase-positiven Staphylokokken

Die quantitative Bestimmung von Koagulase-positiven Staphylokokken erfolgte bei 70 Frischkäse-Proben in Anlehnung an die Methode L 00.00-55 „Verfahren für die Zählung von Koagulase-positiven Staphylokokken (*Staphylococcus aureus* und anderer Spezies) in Lebensmitteln – Teil 1: Verfahren mit Baird Parker Agar“ (Übernahme der gleichnamigen Norm DIN EN ISO 6888-1:2003). Es wurden jeweils 10 g einer Probe in 90 ml viertelstarker Ringerlösung eingewogen und 2 min bei Raumtemperatur im Beutel-Walkmischgerät homogenisiert. Anschließend wurde eine dezimale Verdünnungsreihe von 10^{-1} bis 10^{-3} in viertelstarker Ringerlösung hergestellt. Aus der Anschüttelung (Verdünnungsstufe 10^{-1}) wurden im Doppelansatz 1 ml auf drei Platten mit Baird-Parker-Agar verteilt (0,33 ml pro Platte). Weiterhin wurden aus der Anschüttelung sowie aus der nächsten Verdünnung je 0,1 ml im Doppelansatz aufgebracht und mit einem Spatel verteilt (Verdünnungsstufe 10^{-2} bis 10^{-3}). Die beimpften Platten wurden für 24 h und 48 h bei 37 °C bebrütet und anschließend auf das Wachstum von Koagulase-positiven Staphylokokken kontrolliert. Typische Kolonien waren schwarz oder grau glänzend (Telluritspaltung) und besaßen einen opaleszierenden Ring, der von einer klaren Zone umgeben war (positive Eigelb-Reaktion durch Lecithinase und Lipase). Atypische Kolonien stellten sich als schwarze oder graue Kolonien mit oder ohne Eigelb-Reaktion dar. Als Positivkontrolle diente *Staphylococcus aureus* und als Negativkontrolle *Escherichia coli* ATCC 25922. Die typischen und atypischen Kolonien wurden gezählt. Jeweils fünf typische und fünf atypische Kolonien wurden auf Columbia-Schafblut-Agar überführt und 24 h bei 37 °C bebrütet. Kolonien mit einer vollständigen (α -Hämolyse) und/oder einer unvollständigen Hämolyse (β -Hämolyse) wurden weiterdifferenziert und nach Subkultivierung auf CASO-Agar (für 24 h bei 37 °C) auf ihre Katalase-Aktivität mittels 3%iger Wasserstoffperoxid-Lösung überprüft. Eine sofort eintretende Schaumbildung galt als positiv. Zur weiteren Differenzierung wurde das Vorkommen des Klumpungsfaktors überprüft. Dazu wurde ein Tropfen EDTA-stabilisiertes Kaninchenplasma in Koloniematerial eingerieben. Als positive Reaktion wurde eine deutlich sichtbare Verklumpung der Bakterien gewertet. Zum Ausschluß einer Selbstagglutination wurden ein bis drei Kolonien in einem Tropfen steriler physiologischer Kochsalzlösung verrieben. Stichprobenartig wurde zusätzlich der Koagulase-Test durchgeführt. Hierbei wurde mit einer sterilen Impföse Kulturmaterial von CASO-Agar in ein Kulturröhrchen mit 0,3 ml Kaninchenplasma überführt und bei 37 °C inkubiert. Nach

4 h bis 6 h wurde durch Kippen des Röhrchens das Plasma auf Koagulation überprüft. Bei fehlender Koagulation wurde bis zu 24 h weiter bebrütet. Der Koagulase-Test wurde als positiv beurteilt, wenn das Volumen des Koagulates mehr als die Hälfte des Ausgangsvolumens des Röhrcheninhaltes eingenommen hatte. Als Negativkontrolle diente ein unbeimpftes Röhrchen mit Plasma. Aus den zur Bestätigung herangezogenen Kolonien wurde die Anzahl der insgesamt vorhandenen Koagulase-positiven Staphylokokken je g Probe berechnet. Die einzelnen Untersuchungsschritte sind in Abbildung 3.5 dargestellt.

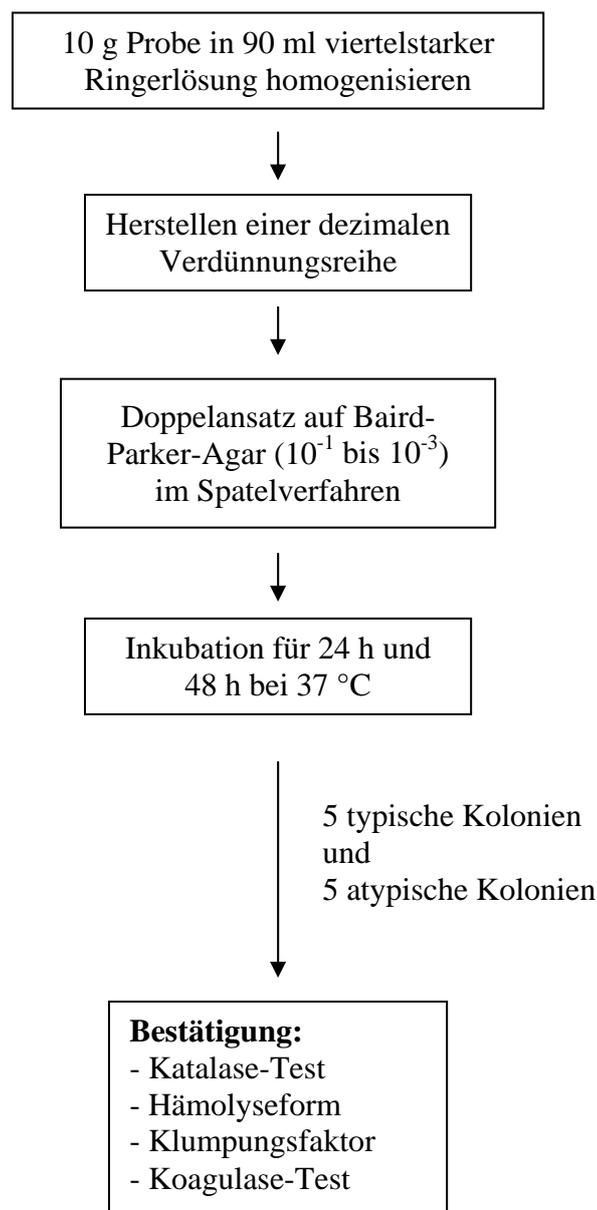


Abbildung 3.5: Schematische Darstellung der Untersuchungsschritte zur quantitativen Bestimmung von Koagulase-positiven Staphylokokken in Anlehnung an die Methode L 00.00-55 nach § 64 LFGB

3.2.7 Molekularbiologische Charakterisierung der *Escherichia coli*-Isolate mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die in den vorhergehenden Untersuchungen isolierten *E. coli* wurden zur Überprüfung auf das Vorhandensein der Gene *stx1* und *stx2* mittels PCR molekularbiologisch charakterisiert. Die Untersuchung erfolgte in Anlehnung an die Methode L 00.00-45 „Allgemeine verfahrensspezifische Anforderungen zum Nachweis von Mikroorganismen mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) in Lebensmitteln“ (Übernahme der gleichnamigen Norm DIN EN ISO 22174:2005) und in Anlehnung an die Methode L 07.18-1 „Nachweis, Isolierung und Charakterisierung Verotoxin-bildender *Escherichia coli* (VTEC) in Hackfleisch mittels PCR und DNA-Hybridisierungstechnik“.

3.2.7.1 Nukleinsäureaufbereitung und -extraktion

Zur Reaktivierung der isolierten *E. coli* wurde aus jedem CRYOBANK™-Kryoröhrchen eine Kugel mit einer sterilen Öse entnommen und auf CASO-Agar ausgestrichen. Nach Inkubation für 24 h bei 37 °C wurden jeweils drei Einzelkolonien abgenommen und in 150 µl Aqua dest. eingerieben. Der Inhalt der Reaktionsgefäße wurde gut gemischt. Ebenso wurde mit zwei Positivkontrollen (*Escherichia coli* B 2324 und B 2405) und einer Negativkontrolle (Aqua dest. ohne Zusatz) verfahren. Die Kulturen wurden für 10 min bei 100 °C im Wasserbad gekocht, dadurch wurde die Zellwand aufgeschlossen und die DNA freigesetzt. Anschließend wurden die Probenröhrchen, zur Abtrennung des Zelldetritus, 1 min bei 17.000 x g zentrifugiert, so dass die Nukleinsäure im Überstand verblieb.

3.2.7.2 Amplifikation der Nukleinsäuresequenz mittels spezifischer Primer durch die Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur DNA-Amplifikation wurde zunächst ein Reaktionsansatz (Mastermix) hergestellt dessen Zusammensetzung Tabelle 3.6 zu entnehmen ist. Die Primer wurden vor der Zugabe vorbereitet, indem 30 µl des Primers MK1 in 48 µl Aqua dest. und 20 µl des Primers MK2 in 68 µl Aqua dest. gelöst wurden. Eine Übersicht der verwendeten Oligonukleotidprimer wird in Tabelle 3.7 gegeben. Jeweils 2,5 µl aus dem Überstand der

aufbereiteten Proben-DNA wurden zu 27,5 µl des Reaktionsansatzes gegeben und in einem 0,2 ml Reaktionsgefäß (PCR-Tube) gut gemischt. Um eine Kontamination der Reagenzien auszuschließen, wurde als weitere Negativkontrolle ein Reaktionsansatz ohne DNA-Zugabe mitgeführt.

Tabelle 3.6: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes zur Durchführung der PCR

Reagenzien	Menge pro PCR-Ansatz
Aqua dest.	19,9 µl
Inkubationspuffer, 10fach	3,0 µl
MgCl ₂ (25 mmol/l)	1,8 µl
dNTP (10 mmol/l)	0,6 µl
Primer MK1 (10 µmol/l)	1,0 µl
Primer MK2 (10 µmol/l)	1,0 µl
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,2 µl
Gesamt-Volumen pro Ansatz	27,5 µl

Tabelle 3.7: Übersicht der verwendeten Oligonukleotidprimer zur Durchführung der PCR

Primer-paar	Zielsequenz 5'-3'	Zielgen	Produktgröße	Referenzen
MK1	TTT ACG ATA GAC TTC TCG AC	<i>stx1, stx2</i>	230 bp	KARCH & MEYER, 1989
MK2	CAC ATA TAA ATT ATT TCG CTC			

Das Gemisch aus Proben-DNA und Reaktionsansatz wurde in den Thermocycler eingesetzt und durchlief das in Tabelle 3.8 aufgeführte Temperatur-Zeit-Profil.

Tabelle 3.8: Temperatur-Zeit-Profil zur DNA-Amplifikation

Vorgang	Temperatur	Zeit	
Initiale Denaturierung	94 °C	10 min	
Denaturierung	94 °C	30 s	} 30 Zyklen
Anlagerung (Annealing)	44 °C	30 s	
Synthese (Extention)	72 °C	30 s	
Abschließender Syntheseschritt (Final Extention)	72 °C	5 min	
Abkühlung	4 °C		

3.2.7.3 Nachweis der spezifischen PCR-Produkte

Die Identifizierung der durch die PCR amplifizierten DNA-Abschnitte erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese und Ethidiumbromidfärbung. Zur Herstellung eines zwei Prozentigen Agarosegels wurden 3 g Agarose zu 150 ml 1 x TAE (Tris-Acetat-EDTA)-Puffer gegeben und in der Mikrowelle solange erhitzt, bis alle Schwebeteilchen gelöst waren. Die flüssige Agarose wurde im Wasserbad auf 56 °C abgekühlt und anschließend in die mit einem Kamm versehene Formschale gegossen. Nachdem das Gel fest genug war, wurde die Formschale in die Elektrophoresekammer gelegt. Die Laufkammer wurde mit 1 x TAE-Puffer aufgefüllt, bis das Gel vollständig bedeckt war, anschließend wurde der Kamm unter vorsichtigem Zug entfernt. Jeweils 12 µl eines DNA-Amplifikates wurden mit 2 µl „6 x Orange Loading Dye Solution“ vermischt und in die Vertiefungen des Gels pipettiert. Zur Größenbestimmung der Banden wurden in die erste Vertiefung einer Reihe 6 µl eines Markers von 100 bp (Basenpaare) pipettiert. An die Elektrophoresekammer wurde ein Strom von 130 V angelegt. Wenn die Lauffront des Loading-Puffers 70-80 % der Gellänge erreicht hatte, wurde die Elektrophorese beendet. Zur Darstellung der Amplifikate wurde das Gel zunächst für 7 min in einer wässrigen Ethidiumbromid-Lösung (5 µg/ml) im Schüttelwasserbad gefärbt. Anschließend wurde, je nach Farbintensität, überschüssiges Ethidiumbromid durch 15minütiges Waschen in Aqua dest. entfernt. Das feuchte Gel wurde unter UV-Licht bei einer Wellenlänge von 302 nm in einem Geldokumentationssystem betrachtet und digital fotografiert. Bei *stx*-positiven Proben stellte sich die amplifizierte DNA als weiße Bande vor grau-schwarzem Hintergrund dar.

4 ERGEBNISSE

4.1 Übersicht der Untersuchungsergebnisse

Eine Übersicht der Ergebnisse für die geprüften mikrobiologischen Parameter unter Berücksichtigung der Vermarktungs- und Angebotsformen der Frischkäsezubereitungen ist in Tabelle 4.1 zusammengestellt. Generell ergaben die Untersuchungen, dass unverpackt angebotene Frischkäse deutlich häufiger positive Befunde für die geprüften Mikroorganismen ergaben als Frischkäse in Fertigpackungen.

Tabelle 4.1: Häufigkeit positiver Befunde für die geprüften mikrobiologischen Parameter in Frischkäse, differenziert nach Vermarktungs- und Angebotsform

Parameter (Probenzahl)	Angebots- form ¹⁾	Absoluter und prozentualer Anteil positiver Proben				
		Proben Gesamt (n = 125)	Einzel- handel (n = 76)	Reise- gewerbe ²⁾ (n = 5)	Hof- laden (n = 22)	Wochen- markt (n = 22)
<i>Enterobacteriaceae</i>		55 (44 %)	28 (37 %)	5 (100 %)	6 (27 %)	16 (73 %)
	u	44	23	-	5	16
	F	11	5	5	1	-
Coliforme Keime		41 (33 %)	22 (29 %)	4 (80 %)	1 (5 %)	14 (64 %)
	u	35	21	-	-	14
	F	6	1	4	1	-
<i>E. coli</i>		17 (14 %)	10 (13 %)	1 (20 %)	1 (5 %)	5 (23 %)
	u	13	7	-	1	5
	F	4	3	1	-	-
Listerien		3 (2 %)	2 (3 %)	-	-	1 (5 %)
	u	3	2	-	-	1
	F	-	-	-	-	-
Koagulase-positive Staphylokokken³⁾ (n = 70)		1 (1 %)	1 (2 %)	-	-	-
	u	-	-	-	-	-
	F	1	1	-	-	-

¹⁾ u = unverpackt; F = Fertigpackung

²⁾ gewerbsmäßiges Feilbieten von Waren ohne vorherige Bestellung außerhalb der eigenen gewerblichen Niederlassung oder ohne eine solche zu haben (§ 55 Gewerbeordnung)

³⁾ Die Ergebnisse dieser Untersuchung beziehen sich auf 70 Frischkäse, für die eine quantitative Bestimmung Koagulase-positiver Staphylokokken durchgeführt worden war. Die Anzahl der Proben der jeweiligen Vermarktungsform, schlüsselt sich folgendermaßen auf: Einzelhandel n = 42, Reisegewerbe n = 2, Hofladen n = 18, Wochenmarkt n = 8

Der qualitative Nachweis von *Enterobacteriaceae* ergab für 55 Proben (44 %) ein positives Ergebnis. Bei diesen Proben handelte es sich in 44 Fällen um unverpackt angebotene Frischkäse bzw. Frischkäsezubereitungen. Die quantitative Bestimmung von coliformen Keimen ergab für 41 Proben (33 %) ein positives Ergebnis. Die Mehrzahl der positiven Proben (35 Proben) wurde ebenfalls unverpackt angeboten.

E. coli wurde in 17 Frischkäsezubereitungen (14 %) nachgewiesen. Aus diesen Proben wurden 48 *E. coli*-Isolate gewonnen. Die molekularbiologische Charakterisierung der *E. coli*-Isolate ergab in keinem Fall den Nachweis von *stx1* oder *stx2*.

L. monocytogenes wurde in keiner Probe nachgewiesen. Jedoch ergaben drei Proben den Nachweis von *L. innocua*.

Von den insgesamt 70 Proben, für die eine quantitative Bestimmung Koagulase-positiver Staphylokokken durchgeführt worden war, ergab nur eine Probe den Nachweis von *S. aureus*.

4.2 Ergebnisse der pH-Wert-Messung

Die pH-Wert-Messung in Frischkäse ergab Werte im Bereich von pH 3,75 bis pH 6,26. Im Durchschnitt wurde ein pH-Wert von 4,67 gemessen. *Enterobacteriaceae* (qualitativer Nachweis, s. 3.2.3) bzw. coliforme Keime (quantitative Bestimmung, s. 3.2.4) wurden erst in Frischkäsen mit einem pH-Wert ab 4,01 nachgewiesen (durchschnittlicher pH positiver Proben 4,74). Abbildung 4.1 zeigt den Zusammenhang zwischen dem pH-Wert der Frischkäse und der Kontaminationshäufigkeit mit *Enterobacteriaceae* bzw. coliformen Keimen. Tendenziell stieg ab einem pH-Wert von 4,50 der Anteil der kontaminierten Proben an. Während im pH-Wert-Bereich von 4,00 bis 5,50 der Anteil der positiven Proben noch bei 43 % für *Enterobacteriaceae* bzw. bei 32 % für coliforme Keime lag, wurden in Frischkäsen mit einem pH-Wert von $\geq 5,50$ in 63 % der Proben *Enterobacteriaceae* bzw. in 50 % der Proben coliforme Keime nachgewiesen. Bei den Proben mit einem positiven Befund für Listerien wurden pH-Werte von 4,40 und 4,45 und 5,92 gemessen. Die Probe, in der Koagulase-positiv Staphylokokken nachgewiesen wurden, wies einen pH-Wert von 5,07 auf.

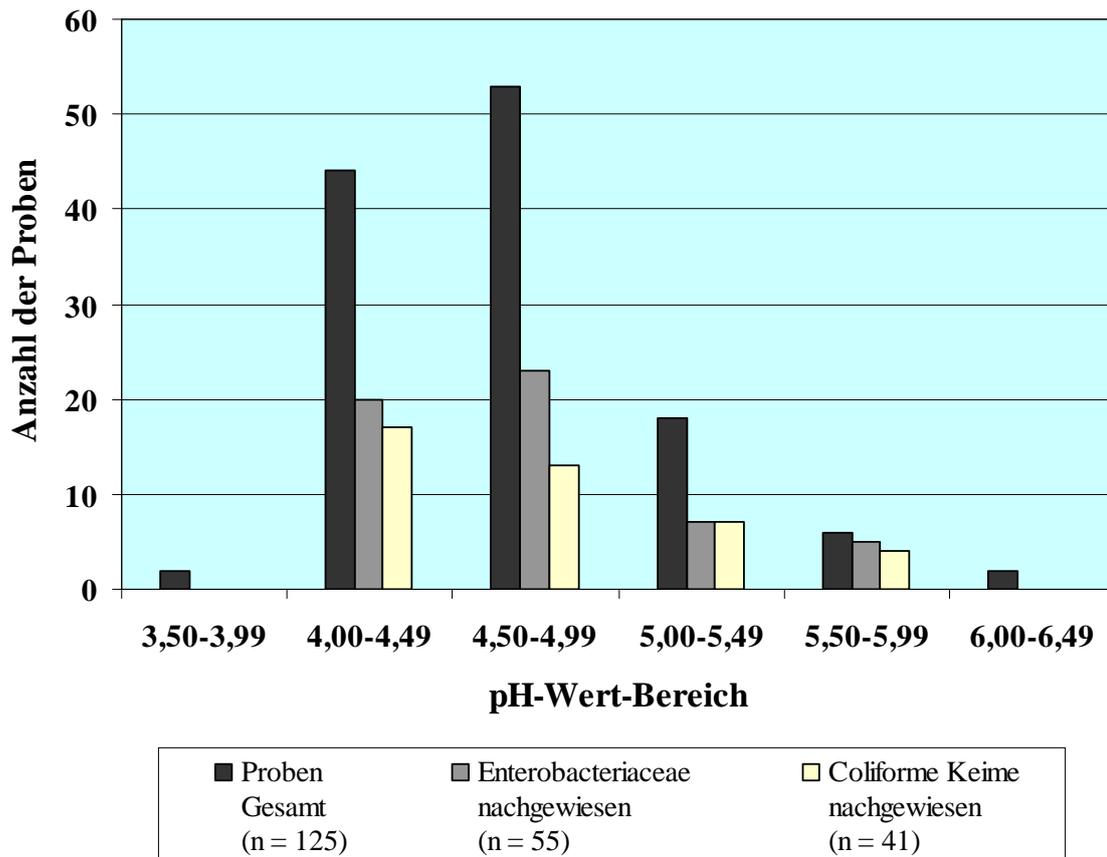


Abbildung 4.1: Zusammenhang zwischen pH-Wert der Frischkäse(zubereitungen) und der Kontaminationshäufigkeit mit *Enterobacteriaceae* (qualitativer Nachweis, s 3.2.3) bzw. coliformen Keimen (quantitative Bestimmung, s. 3.2.4)

4.3 Methodenvergleich

4.3.1 Verwendung von ECC-Agar als alternatives Selektivnährmedium zum VRBG-Agar zum Nachweis von *Enterobacteriaceae*

Der DIN EN ISO-Norm 21528-1:2004 entsprechend wurde der VRBG-Agar als Selektivnährmedium zum Nachweis von *Enterobacteriaceae* verwendet. Parallel wurde der ECC-Agar verwendet, um seine Eignung als alternatives Selektivnährmedium zu überprüfen. Hinsichtlich der Anzahl der Proben, die positive Befunde für *Enterobacteriaceae* ergaben, unterschieden sich die beiden Nährmedien nicht. Sowohl unter Verwendung von VRBG-Agar als auch unter Verwendung von ECC-Agar wurden in (denselben) 55 Proben *Enterobacteriaceae* nachgewiesen.

Abbildung 4.2 zeigt die Nachweishäufigkeit der *Enterobacteriaceae*-Spezies, die unter Verwendung von VRBG-Agar bzw. von ECC-Agar isoliert wurden. Bezüglich des Spektrums der aus den positiven Proben isolierten *Enterobacteriaceae*-Spezies und deren Nachweishäufigkeit in Frischkäse wurden in der Mehrzahl der Fälle keine wesentlichen Unterschiede zwischen der Verwendung von VRBG-Agar und von ECC-Agar festgestellt.

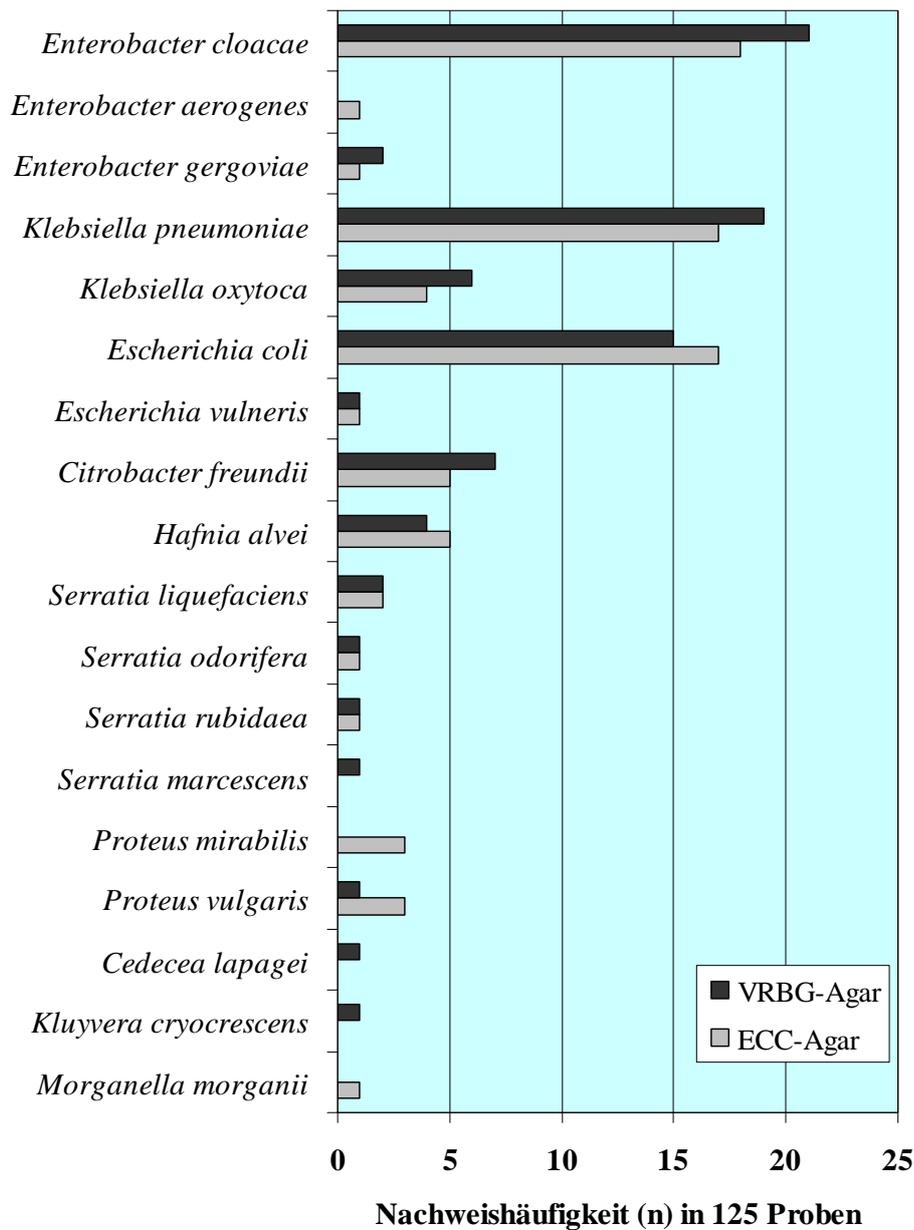


Abbildung 4.2: Vergleich der Nachweishäufigkeit der beim qualitativen Nachweis unter Verwendung von VRBG- bzw. ECC-Agar isolierten *Enterobacteriaceae*-Spezies

Bei den am häufigsten nachgewiesenen Spezies wie *Enterobacter spp.*, *Klebsiella spp.*, *Escherichia spp.* und *Citrobacter spp.* unterschied sich die Anzahl der positiven Befunde durch die beiden Nährmedien nur geringgradig. Unterschiede ergaben sich lediglich für Spezies, deren Nachweis nur vereinzelt erfolgte. So wurden Vertreter der Spezies *Proteus spp.* unter Verwendung von ECC-Agar in sechs und von VRBG-Agar nur in einer Probe nachgewiesen. Nur der ECC-Agar ergab in einer Probe den Nachweis von *Morganella morganii*. *Cedecea lapagei* und *Kluyvera cryocrescens* wurden nur unter Verwendung von VRBG-Agar in jeweils einer Probe nachgewiesen

Für den Nachweis von *E. coli* bot der ECC-Agar gegenüber dem VRBG-Agar den Vorteil, dass bereits anhand der Koloniemorphologie zwischen *E. coli* und coliformen Keimen unterschieden werden konnte. Auf dem ECC-Agar stellten sich präsumtive *E. coli* durch das Wachstum violetter Kolonien dar und konnten morphologisch deutlich von rosa Kolonien anderer coliformer Keime abgegrenzt werden. Die zur Absicherung durchgeführten Bestätigungsreaktionen ergaben für alle aus violetten Kolonien isolierten Bakterien ein positives Ergebnis für *E. coli*. Die Funktion des VRBG-Agars als Selektivnährmedium beruht lediglich auf dem Nachweis der Gesamt-*Enterobacteriaceae*. Eine Differenzierung von *E. coli* gegenüber anderen *Enterobacteriaceae* war somit rein subjektiv. So stellten sich präsumtive *E. coli* auf VRBG-Agar durch das Wachstum etwas flacherer und weniger glänzender Kolonien mit zum Teil roten Hof dar. Dies traf aber nicht in jedem Fall zu und konnte nicht als objektives diagnostisches Kriterium verwendet werden, so dass zum Nachweis von *E. coli* stets Subkulturen auf einem nicht selektiven Nährmedium angefertigt und Bestätigungsreaktionen durchgeführt werden mussten.

Hinsichtlich der Nachweisrate von *E. coli* unterschieden sich die beiden Nährmedien nur geringgradig. Unter Verwendung des ECC-Agars wurde *E. coli* in 17 Proben und unter Verwendung des VRBG-Agars in 15 Proben nachgewiesen. Allerdings wurde das Ergebnis unter Verwendung des VRBG-Agars nur durch die parallele Verwendung des ECC-Agars und einen erhöhten Arbeitsaufwand erreicht. Wurde auf dem ECC-Agar das Wachstum violetter Kolonien festgestellt und somit das Vorkommen von *E. coli* in der Probe vermutet, wurden vom VRBG-Agar eine vergleichsweise höhere Anzahl von Kolonien zur weiteren Charakterisierung herangezogen, um ebenfalls *E. coli* zu isolieren. Dies entsprach einem größeren Arbeits-, Material- und Zeitaufwand für den Nachweis von *E. coli* unter Verwendung des VRBG-Agars als unter Verwendung des ECC-Agars.

Eine Unterdrückung der Begleitflora wurde in der Mehrzahl der Fälle durch beide Nährmedien erreicht. In sieben Proben wurde unter Verwendung des ECC-Agars und in fünf Proben unter Verwendung des VRBG-Agars das Wachstum von Nicht-*Enterobacteriaceae* festgestellt. Die weitere Differenzierung dieser Mikroorganismen ergab, dass es sich hierbei um Pseudomonaden (ECC-Agar 4 Proben/VRBG-Agar 3 Proben), Aeromonaden (1/0), Sporenbildner (2/1) und Hefen (0/1) handelte. Kolonien dieser Mikroorganismen konnten sowohl auf VRBG- als auch auf ECC-Agar deutlich von charakteristischen Kolonien der *Enterobacteriaceae* unterschieden werden.

4.3.2 Vergleich des Einsatzes von LST-MUG-Bouillon, VRB-MUG-Agar und ECC-Agar zur quantitativen Bestimmung von coliformen Keimen

Für die quantitative Bestimmung von coliformen Keimen wurden parallel die LST-MUG-Bouillon, der VRB-MUG- und der ECC-Agar verwendet. Unter Verwendung der LST-MUG-Bouillon (Nachweisgrenze $3,0 \times 10^0$ KbE/g) wurden in 41 Proben (33 %) und damit vergleichsweise am häufigsten coliforme Keime nachgewiesen. Bei Verwendung der festen Nährmedien (Nachweisgrenze $1,0 \times 10^1$ KbE/g) ergab der VRB-MUG-Agar in 28 Fällen (22 %) und der ECC-Agar in 34 Fällen (27 %) den Nachweis von coliformen Keimen. Für die zusätzlichen positiven Proben unter Verwendung der LST-MUG-Bouillon wurden entweder Keimgehalte ermittelt, die unterhalb der Nachweisgrenze der festen Nährmedien lagen ($< 10^1$ KbE/g) oder niedrige Keimgehalte, die zwischen 10^1 und $< 10^2$ KbE/g lagen (Tabelle 4.2 und 4.3). Somit war die LST-MUG-Bouillon bei einem niedrigen Coliformen-Gehalt der Probe das vergleichsweise sensitivere Medium.

Für den maximalen Keimgehalt wurden unter Verwendung des VRB-MUG-Agars Werte von $2,7 \times 10^4$ KbE/g und unter Verwendung des ECC-Agars von $3,4 \times 10^4$ KbE/g für Coliforme ermittelt. Die LST-MUG-Bouillon ergab zwar nur einen maximalen Keimgehalt von $1,1 \times 10^3$ KbE/g, jedoch muss berücksichtigt werden, dass in sechs Proben die Bestimmung des maximalen Keimgehaltes nur eingeschränkt möglich war. Bei diesen wurde in der höchsten Verdünnungsstufe von 10^{-3} noch in allen drei Parallelansätzen des MPN-Verfahrens ein positives Ergebnis angezeigt, so dass von einem Keimgehalt $> 1,1 \times 10^3$ KbE/g ausgegangen werden muss.

Zwischen der Anzahl der positiven Befunde für coliforme Keime unter Verwendung der LST-MUG-Bouillon (41 Proben) und des VRB-MUG-Agars (28 Proben) bestand kein signifikanter Unterschied ($p > 0,05$; Chi-Quadrat-Vierfeldertest). Der Vergleich der durch die beiden Medien ermittelten Keimgehalte für coliforme Keime (Tabelle 4.2) zeigte, dass für 108 Proben (86 %) der gleiche Keimzahlbereich festgestellt wurde. Bei neun Proben wurden unter Verwendung der LST-MUG-Bouillon und in fünf Fällen unter Verwendung des VRB-MUG-Agars ein um eine Zehnerpotenz höherer Keimgehalt festgestellt. Nur in drei Fällen lag der unter Verwendung des VRB-MUG-Agars ermittelte Keimgehalt in einem um zwei Zehnerpotenzen höheren Keimzahlbereich.

Tabelle 4.2: Vergleich der ermittelten Keimgehalte (KbE/g) für coliforme Keime in Frischkäse (n = 125) unter Verwendung von LST-MUG-Bouillon und VRB-MUG-Agar

Coliforme Keime (KbE/g)		LST-MUG ¹⁾			
		< 10 ¹	10 ¹ bis < 10 ²	10 ² bis < 10 ³	> 10 ³
VRB-MUG ²⁾	< 10 ¹	92 ³⁾	5	0	0
	10 ¹ bis < 10 ²	2 ⁴⁾	6	4	0
	10 ² bis < 10 ³	0	2	3	0
	> 10 ³	0	3	1	7

¹⁾ Nachweisgrenze $3,0 \times 10^0$ KbE/g

²⁾ Nachweisgrenze $1,0 \times 10^1$ KbE/g

³⁾ bei Verwendung von LST-MUG wurden bei acht dieser Proben ein Keimgehalt für coliforme Keime zwischen $3,6 \times 10^0$ und $9,2 \times 10^0$ KbE/g ermittelt

⁴⁾ bei Verwendung von LST-MUG wurde bei diesen Proben ein Keimgehalt für coliforme Keime zwischen $3,6 \times 10^0$ und $9,2 \times 10^0$ KbE/g ermittelt

Zwischen der Anzahl der positiven Befunde unter Verwendung der LST-MUG-Bouillon (41 Proben) und des ECC-Agars (34 Proben) bestand kein signifikanter Unterschied ($p > 0,05$; Chi-Quadrat-Vierfeldertest). Für 104 Proben (83 %) ergaben die beiden Nährmedien einen gleichen Keimzahlbereich für coliforme Keime (Tabelle 4.3). Bei sieben Proben lag der unter Verwendung der LST-MUG-Bouillon und bei zehn Proben der unter Verwendung des ECC-Agars ermittelte Keimgehalt um eine Zehnerpotenz höher. In drei Fällen ergab der ECC-Agar einen um zwei Zehnerpotenzen höher liegenden

Keimgehalt. Nur einmal wurde ein sehr deutlicher Unterschied zwischen dem unter Verwendung der beiden Nährmedien ermittelten Keimgehalte festgestellt. Während bei Einsatz des ECC-Agars in einer Probe ein Coliformen-Gehalt von $1,5 \times 10^3$ KbE/g ermittelt wurde, ergab die Verwendung der LST-MUG-Bouillon einen negativen Befund für coliforme Keime.

Tabelle 4.3: Vergleich der ermittelten Keimgehalte (KbE/g) für coliforme Keime in Frischkäse (n = 125) unter Verwendung von LST-MUG-Bouillon und ECC-Agar

Coliforme Keime (KbE/g)	LST-MUG ¹⁾			
	< 10 ¹	10 ¹ bis < 10 ²	10 ² bis < 10 ³	> 10 ³
< 10 ¹	88 ³⁾	3	0	0
ECC ²⁾ 10 ¹ bis < 10 ²	5 ³⁾	7	4	0
10 ² bis < 10 ³	0	3	2	0
> 10 ³	1	3	2	7

¹⁾ Nachweisgrenze $3,0 \times 10^0$ KbE/g

²⁾ Nachweisgrenze $1,0 \times 10^1$ KbE/g

³⁾ bei Verwendung von LST-MUG wurde bei fünf dieser Proben ein Keimgehalt für coliforme Keime zwischen $3,6 \times 10^0$ und $9,2 \times 10^0$ KbE/g ermittelt

Auch zwischen der Anzahl der positiven Befunde unter Verwendung des VRB-MUG-Agars (28 Proben) und des ECC-Agars (34 Proben) bestand kein signifikanter Unterschied ($p > 0,05$; Chi-Quadrat-Vierfeldertest). Ein Vergleich der Ergebnisse bei Einsatz der beiden festen Nährmedien (Tabelle 4.4) zeigt, dass für die überwiegende Zahl der Proben (114 Proben bzw. 91 %) für coliforme Keime der gleiche Keimzahlbereich ermittelt wurde. Bei den Proben, bei denen voneinander abweichende Keimgehalte ermittelt wurden, ergab der VRB-MUG-Agar nur in einem Fall einen um eine Zehnerpotenz höheren Keimgehalt, während unter Verwendung des ECC-Agars in zehn Fällen ein höherer Keimgehalt festgestellt wurde. Dieser lag meist nur um eine Zehnerpotenz höher. In einem Fall betrug der Unterschied zwei Zehnerpotenzen und lediglich einmal übertraf der ECC-Agar den durch VRB-MUG-Agar ermittelten Keimgehalt um drei Zehnerpotenzen.

Tabelle 4.4: Vergleich der ermittelten Keimgehalte (KbE/g) für coliforme Keime in Frischkäse (n = 125) unter Verwendung von VRB-MUG-Agar und ECC-Agar

Coliforme Keime (KbE/g)	VRB-MUG ¹⁾				
	< 10 ¹	10 ¹ bis < 10 ²	10 ² bis < 10 ³	10 ³ bis < 10 ⁴	> 10 ⁴
< 10 ¹	90	1	0	0	0
10 ¹ bis < 10 ²	5	11	0	0	0
10 ² bis < 10 ³	1	0	4	0	0
10 ³ bis < 10 ⁴	1	0	1	6	0
> 10 ⁴	0	0	0	2	3

¹⁾ Nachweisgrenze 1,0 x 10¹ KBE/g

Hinsichtlich der Nachweishäufigkeit der bei der quantitativen Bestimmung aus den positiven Proben isolierten Coliformen-Spezies unterschieden sich die verwendeten Nährmedien nur geringgradig (Abbildung 4.3). Die Ergebnisse bezüglich der Nachweisrate von *E. coli* werden im folgenden Abschnitt gesondert besprochen. Die Verwendung der LST-MUG-Bouillon ergab im Vergleich zu den festen Nährmedien, entsprechend der höheren Anzahl an positiven Proben, vor allem für einzelne Spezies der Gattung *Enterobacter spp.* (insbesondere *E. cloacae*) sowie der Gattung *Klebsiella spp.* und *Serratia spp.* eine höhere Nachweisrate. Bei Einsatz der festen Nährmedien wurde für die Nachweishäufigkeit der verschiedenen Coliformen-Spezies in der Mehrzahl der Fälle kein wesentlicher Unterschied festgestellt. Lediglich für zwei Spezies ergaben sich etwas voneinander abweichende Nachweisraten. So wurde *Pantoea agglomerans* durch Verwendung des ECC-Agars in zwölf Proben und durch den VRB-MUG-Agar nur in sieben Proben nachgewiesen. Wohingegen der VRB-MUG-Agar für *Citrobacter freundii* in fünf Proben und der ECC-Agar nur in einer Probe einen positiven Befund ergab.

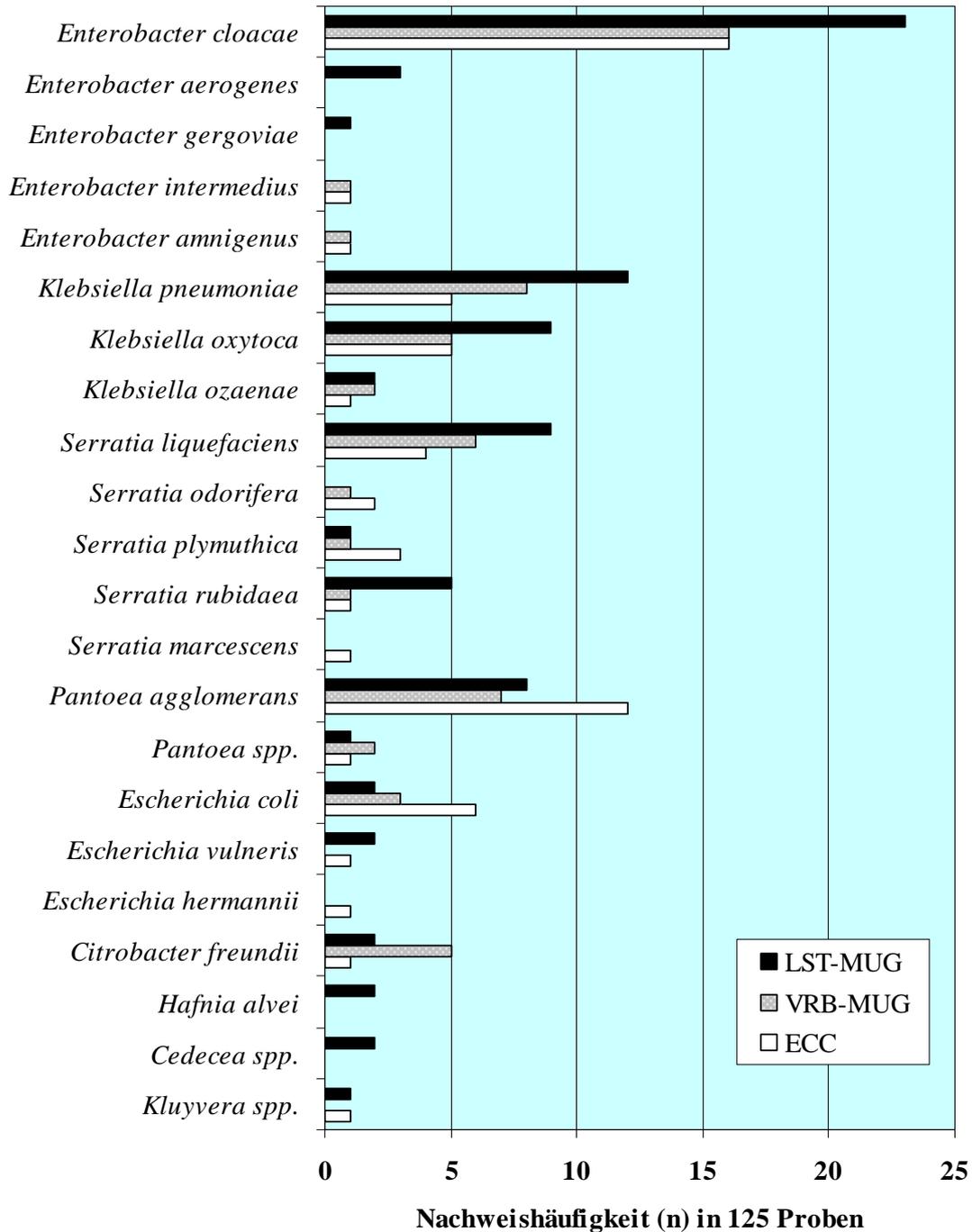


Abbildung 4.3: Vergleich der Nachweishäufigkeit der bei der quantitativen Bestimmung isolierten Coliformen-Spezies unter Verwendung von LST-MUG-Bouillon, VRB-MUG- bzw. ECC-Agar

4.3.3 Vergleich des Einsatzes von LST-MUG-Bouillon, VRB-MUG-Agar und ECC-Agar zur quantitativen Bestimmung von *E. coli*

Hinsichtlich der Anzahl der Proben, die im Rahmen der quantitativen Bestimmung einen positiven Befund für *E. coli* ergaben, wurden für die verschiedenen Nährmedien Unterschiede festgestellt. Der Einsatz des ECC-Agars ergab bei sechs Proben und damit am häufigsten den Nachweis von *E. coli*. Unter Verwendung des VRB-MUG-Agars wurden nur in drei Proben und unter Verwendung der LST-MUG-Bouillon lediglich in zwei Proben *E. coli* nachgewiesen. Im Bezug auf den ermittelten Keimgehalt für *E. coli* unterschieden sich die Ergebnisse der Nährmedien bei den Proben, bei denen ein Vergleich möglich war, nicht wesentlich (Tabelle 4.5).

Tabelle 4.5: Ermittelte Keimgehalte (KbE/g) für *E. coli* unter Verwendung von LST-MUG-Bouillon, VRB-MUG-Agar und ECC-Agar

Proben- Nummer	Ermittelte Keimgehalte für <i>E. coli</i> (KbE/g)		
	LST-MUG-Bouillon	VRB-MUG-Agar	ECC-Agar
30	9,2 x 10 ⁰	nn	1,0 x 10 ¹
39	nn	1,0 x 10 ¹	nn
101	2,3 x 10 ¹	nn	1,0 x 10 ¹
110	nn	2,0 x 10 ¹	1,0 x 10 ¹
112	nn	nn	1,0 x 10 ¹
121	nn	nn	1,0 x 10 ¹
122	nn	9,5 x 10 ¹	1,8 x 10 ¹

nn = nicht nachweisbar

Im Hinblick auf die Differenzierung von *E. coli* gegenüber anderen coliformen Keimen ergaben sich deutliche Unterschiede in der Auswertung der Selektivnährmedien. Am besten konnte auf dem ECC-Agar eine Differenzierung vorgenommen werden. Violett gefärbte Kolonien präsumtiver *E. coli* unterschieden sich deutlich von rosa gefärbten Kolonien anderer coliformer Keime (s. a. 4.3.1). Aufgrund dessen konnten der Nachweis von *E. coli* und die Bestimmung des Keimgehaltes direkt auf dem Agar durchgeführt werden, so dass die Auswertung schon nach 24 h möglich war. Zwar wurden dennoch

Subkulturen angelegt und Bestätigungsreaktionen durchgeführt, dies war aber nicht erforderlich und diente nur der Absicherung der Ergebnisse dieser Arbeit.

Unter Verwendung des VRB-MUG-Agars stellte sich die Differenzierung von *E. coli* schwieriger dar. Aufgrund der Umsetzung von MUG sollte das Vorkommen von *E. coli* durch das Wachstum fluoreszierender Kolonien angezeigt werden. Bei den drei Proben, die unter Verwendung des VRB-MUG-Agars einen positiven Befund für *E. coli* ergaben, wurde allerdings nur eine schwache Fluoreszenz festgestellt, die diffus im ganzen Agar verteilt war und nicht eindeutig bestimmten Kolonien zugeordnet werden konnte. Dadurch mussten zur Differenzierung stets mehrere Subkulturen angefertigt und weitere Bestätigungsreaktionen durchgeführt werden. Neben dem erhöhten Arbeits- und Materialaufwand bedeutete dies, dass frühestens nach 48-72 h eine Bestätigung für den Nachweis von *E. coli* vorlag.

Der Nachweis von *E. coli* unter Verwendung der LST-MUG-Bouillon erforderte den vergleichsweise größten Arbeits- und Materialaufwand und war mit dem größten Zeitaufwand verbunden. Bei Betrachtung der MPN-Röhrchen unter UV-Beleuchtung war die Fluoreszenz (durch den spezifischen MUG-Abbau von *E. coli*) häufig nicht eindeutig beurteilbar. In vielen Fällen ergaben in der Bouillon suspendierte Bestandteile des Frischkäses, wenn sie mit UV-Licht beleuchtet wurden, fluoreszenzähnliche Aufhellungen. Nach Durchführung der Bestätigungsreaktionen wurde allerdings nur in zwei Proben das Vorkommen von *E. coli* festgestellt. Die Kontrolle der Indolbildung konnte nur eingeschränkt als zusätzliches diagnostisches Kriterium für *E. coli* herangezogen werden. Außer *E. coli* weisen auch andere Coliforme wie *Klebsiella oxytoca* eine positive Indol-Reaktion auf. Eine positive Indol-Reaktion wäre nur in Kombination mit einer gut beurteilbaren Fluoreszenz ein sicheres Kriterium für *E. coli* gewesen. Letzlich bedeutete dies für die Auswertung, dass für einen eindeutigen Befund für *E. coli* stets Bestätigungsreaktionen durchgeführt werden mußten, so dass frühestens nach 48 h ein Verdacht (Gasbildung, Fluoreszenz und Indol-Bildung) auf das Vorkommen von *E. coli* bestand und frühestens nach 96 h eine Bestätigung für einen positiver Befund für *E. coli* vorlag.

4.3.4 Unterdrückung der Begleitflora bei Einsatz von LST-MUG-Bouillon, VRB-MUG-Agar und ECC-Agar

Generell wurde bei der quantitativen Bestimmung von coliformen Keimen im Vergleich zum qualitativen Nachweis von *Enterobacteriaceae* häufiger das Wachstum einer Begleitflora festgestellt. Dies begründet sich wahrscheinlich in der direkten Beimpfung der Nährmedien bei der quantitativen Bestimmung, während für den qualitativen Nachweis ein selektiver Voranreicherungsschritt durchgeführt worden war. Bei Verwendung der verschiedenen Nährmedien zur quantitativen Bestimmung von coliformen Keimen ergaben sich deutliche Unterschiede im Hinblick auf die Unterdrückung der Begleitflora (Tabelle 4.6). Auf dem ECC-Agar wurde in 32 Fällen (26 %) und damit am häufigsten das Wachstum von Nicht-Coliformen festgestellt. Dabei handelte es sich im Wesentlichen um grampositive Endosporen-bildende Stäbchen und grampositive Kokken (u. a. Enterokokken). Zwar ergab die Verwendung des ECC-Agars die meisten Befunde für Nicht-Coliforme, jedoch konnten diese dadurch, dass sie ungefärbte oder weiße Kolonien bildeten, gut anhand der Koloniemorphologie von coliformen Keimen differenziert werden. Im Fall von grampositiven Kokken waren die Kolonien außerdem nur ≤ 1 mm groß oder wiesen im Fall von Endosporen-bildenden grampositiven Stäbchen eine matte Oberfläche und einen unregelmäßigen Rand auf.

Tabelle 4.6: Übersicht der Begleitflora bei Einsatz von LST-MUG-Bouillon, VRB-MUG-Agar und ECC-Agar zur quantitativen Bestimmung von coliformen Keimen

Begleitflora	Anzahl der Proben		
	LST-MUG	VRB-MUG	ECC
Grampositive, Endosporen-bildende Stäbchen	7	1	16
Andere Grampositive Stäbchen ¹⁾	0	1	3
Grampositive Kokken ²⁾	8	3	12
Gramnegative, Oxidase-positive Stäbchen ³⁾	0	3	0
Gramnegative Stäbchen (außer Coliforme)	0	4	3
Hefen	0	0	1

¹⁾ z. B. *Acinetobacter baumannii* ²⁾ u. a. Enterokokken ³⁾ z. B. Pseudomonaden

Auf dem VRB-MUG-Agar wurde nur in 12 Fällen (10 %) das Wachstum von Nicht-Coliformen festgestellt. Solche Kolonien waren jedoch schwieriger von denen coliformer Keime zu unterscheiden, insbesondere im Fall von gramnegativen Stäbchen (*Acinetobacter baumannii*) oder von grampositiven Kokken, da in beiden Fällen 2-3 mm große rosa Kolonien ausgebildet wurden und diese denen der Coliformen zum Teil sehr ähnlich waren. Zum Ausschluß von falsch-positiven Ergebnissen war die Durchführung weiterer Bestätigungsreaktionen erforderlich.

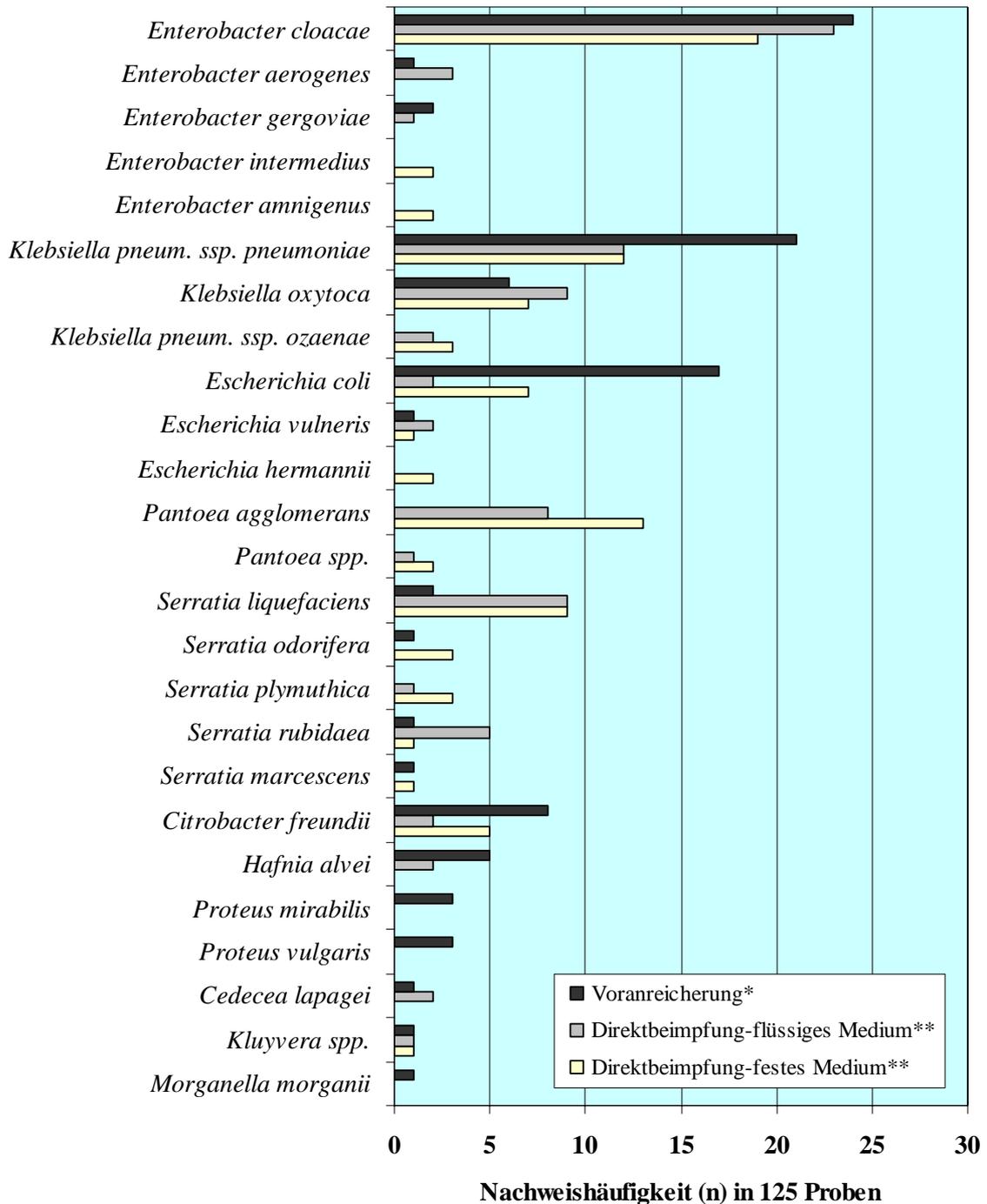
Unter Verwendung der LST-MUG-Bouillon wurde in 15 Fällen (12 %) das Wachstum von Nicht-Coliformen festgestellt. Insbesondere das Vorkommen von grampositiven Endosporen-bildenden Stäbchen (sieben Proben) konnte zu einem falsch-positiven Befund für Coliforme führen, da diese ebenfalls die Fähigkeit zur Gasbildung aus Laktose aufzeigten. Um einen falsch-positiven Befund auszuschließen, musste daher eine weitere Differenzierung durchgeführt werden. Dies bedeutete einen erhöhten Arbeits-, Material- und Zeitaufwand und ein endgültiges Ergebnis lag frühestens nach 72 h bis 96 h vor. Zum Bestandteil der Begleitflora in der LST-MUG-Bouillon gehörten auch grampositive Kokken (in sechs von acht Fällen Enterokokken). Diese konnten jedoch kein Gas aus Laktose bilden und sind nur im Rahmen der Überführung von LST-MUG-Bouillon auf CASO-Agar, die für die Bestätigung von Coliformen durchgeführt wurde, nachgewiesen worden.

4.3.5 Methodenabhängige Unterschiede bei Voranreicherung und Direktbeimpfung für den Nachweis von *Enterobacteriaceae*

Zum qualitativen Nachweis von *Enterobacteriaceae* (3.2.3) wurden zwei Voranreicherungsschritte durchgeführt, zunächst unter Verwendung eines nicht selektiven Nährmediums (Peptonwasser), danach in einem selektiven Nährmedium (EEB). Zur quantitativen Bestimmung von coliformen Keimen (3.2.4) wurde eine direkte Beimpfung der Nährmedien aus der Anschüttelung (in Ringerlösung homogenisiertes Probenmaterial) durchgeführt. Auch wenn kein signifikanter Unterschied ($p > 0,05$; Chi-Quadrat-Vierfeldertest) hinsichtlich der Anzahl der positiven Proben bei Durchführung einer Voranreicherung oder Direktbeimpfung bestand, so zeigt der Vergleich der Ergebnisse aus den beiden Untersuchungsansätzen dennoch, dass durch die Voranreicherung eine deutlich

höhere Probenzahl (55 Proben bzw. 44 %) einen positiven Befund für *Enterobacteriaceae* ergab, während durch die Direktbeimpfung nur 41 Proben (33 %) einen positiven Befund ergaben. Wie Abbildung 4.4 zeigt, war das Spektrum der isolierten *Enterobacteriaceae*-Spezies nach Durchführung einer Voranreicherung und nach Direktbeimpfung zwar weitestgehend ähnlich, aber für einige Spezies ergaben sich dennoch Unterschiede. *Pantoea spp.* und *Serratia spp.* wurden nach Direktbeimpfung in einer Reihe von Proben nachgewiesen, während nach Voranreicherung *Pantoea spp.* in keinem Fall und *Serratia spp.* in einer deutlich geringeren Probenzahl nachgewiesen wurden. Nach der Voranreicherung hingegen wurden wesentlich häufiger *Klebsiella spp.*, *E. coli* und *Citrobacter freundii* nachgewiesen. Aufgrund der praktischen Erfahrung wurden zwei verschiedene Ursachen für die unterschiedliche Nachweishäufigkeit einzelner Keime vermutet. Entweder eine nicht unerhebliche Verschiebung des Keimspektrums nach Voranreicherung oder eine schlechtere Anwachsrate der Mikroorganismen nach Direktbeimpfung der Nährmedien.

Hinsichtlich des Anteils der *E. coli*-positiven Proben wurde nach der Direktbeimpfung (sieben Proben bzw. 5,6 %) und nach der Durchführung einer Voranreicherung (17 Proben bzw. 13,6 %) ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$; Chi-Quadrat-Vierfeldertest) festgestellt. Unabhängig davon, ob eine Voranreicherung oder eine Direktbeimpfung durchgeführt worden war, wurde *E. coli* sowohl als einzige *Enterobacteriaceae*-Spezies einer Probe als auch in Vergesellschaftung mit bis zu vier anderen *Enterobacteriaceae*-Spezies nachgewiesen. Es war jedoch keine bevorzugte Co-Kontamination mit einer bestimmten anderen *Enterobacteriaceae*-Spezies erkennbar (Tabelle 4.7). Es fiel aber auf, dass wenn neben *E. coli* noch weitere coliforme Keime in einer Probe enthalten waren, für diese nur ein geringer Keimgehalt ermittelt wurde. Für insgesamt sieben Proben, die durch die quantitative Bestimmung bzw. Direktbeimpfung einen positiven Befund für *E. coli* ergaben, wurde in der Mehrzahl der Fälle nur ein Coliformen-Gehalt von deutlich unter 10^2 KbE/g (maximal $2,2 \times 10^2$ KbE/g) festgestellt (unabhängig davon ob ein flüssiges oder ein festes Nährmedium verwendet worden war).



Erläuterung:

*) Beimpfung von ECC- bzw. VRBG-Agar nach Voranreicherung in Peptonwasser (nicht-selektiv) und in *Enterobacteriaceae* Enrichment Broth (selektiv)

***) Direktbeimpfung von flüssigen (LST-MUG-Bouillon) bzw. festen Nährmedien (VRB-MUG- und ECC-Agar) aus der Anschüttelung (in Ringerlösung homogenisiertes Probenmaterial)

Abbildung 4.4: Ergebnisse nach Voranreicherung und nach direkter Beimpfung der Nährmedien für die Nachweishäufigkeit einzelner *Enterobacteriaceae*-Spezies

Tabelle 4.7: Enterobacteriaceen-Begleitflora beim Nachweis von *E. coli* in Abhängigkeit von den verwendeten Untersuchungsmethoden

Proben-Nr.	Nachgewiesene <i>Enterobacteriaceae</i> -Spezies	
	Voranreicherung ¹⁾	Direktbeimpfung ²⁾
20	<i>Escherichia coli</i>	-
21	<i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>
30	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
37	<i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Enterobacter cloacae</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>
39	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i> <i>Escherichia vulneris</i>
53	<i>Escherichia coli</i>	-
66	<i>Escherichia coli</i>	-
90	<i>Escherichia coli</i> <i>Enterobacter cloacae</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Proteus vulgaris</i>	<i>Enterobacter cloacae</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Pantoea agglomerans</i> <i>Citrobacter freundii</i> <i>Serratia liquefaciens</i>
101	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i> <i>Serratia odorifera</i>
102	<i>Escherichia coli</i>	-
110	<i>Escherichia coli</i> <i>Serratia liquefaciens</i>	<i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Enterobacter cloacae</i> <i>Enterobacter aerogenes</i>
111	<i>Escherichia coli</i> <i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>
112	<i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Enterobacter cloacae</i>
113	<i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Enterobacter cloacae</i> <i>Enterobacter intermedius</i> <i>Serratia liquefaciens</i> <i>Pantoea spp.</i> <i>Escherichia hermannii</i>
114	<i>Escherichia coli</i>	-
121	<i>Escherichia coli</i> <i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Escherichia coli</i> <i>Enterobacter cloacae</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Pantoea agglomerans</i>
122	<i>Escherichia coli</i> <i>Citrobacter freundii</i>	<i>Escherichia coli</i> <i>Citrobacter freundii</i> <i>Enterobacter cloacae</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Escherichia hermannii</i>

¹⁾ Beimpfung von ECC- bzw. VRBG-Agar nach Voranreicherung in Peptonwasser (nicht-selektiv) und in *Enterobacteriaceae* Enrichment Broth (selektiv)

²⁾ Direktbeimpfung von flüssigen (LST-MUG-Bouillon) bzw. festen Nährmedien (VRB-MUG- und ECC-Agar) aus der Anschlättelung (in Ringerlösung homogenisiertes Probenmaterial)

4.4 Qualitativer Nachweis von *Enterobacteriaceae*

Der qualitative Nachweis (s. 3.2.3) von *Enterobacteriaceae* ergab für 55 Proben (44 %) einen positiven Befund. In Tabelle 4.8 sind die Ergebnisse zum Nachweis von *Enterobacteriaceae* in Frischkäse bzw. Frischkäsezubereitungen in Abhängigkeit der Vermarktungsform, Angebotsform, Herstellungsweise und Hauptzutat zusammengestellt.

Die Gruppierung der Proben nach der Angebotsform zeigt, dass unverpackt angebotene Frischkäse bzw. Frischkäsezubereitungen in 70 % der Fälle und damit wesentlich häufiger den Nachweis von *Enterobacteriaceae* ergaben als Produkte in einer Fertigpackung, bei denen nur 18 % der Proben einen positiven Befund ergaben. Die unverpackt angebotenen Proben, die einen positiven Befund aufwiesen (44 Proben), waren meist konventionell hergestellt worden und stammten in der Mehrzahl der Fälle aus dem Einzelhandel (23 von 30 unverpackten Proben positiv) oder vom Wochenmarkt (16 von 22 unverpackten Proben positiv). Bei Frischkäsen, die in einer Fertigpackung angeboten worden waren und *Enterobacteriaceae* enthielten, wurde für die Gruppe der Frischkäse aus dem Reisegewerbe der größte Anteil an positiven Proben festgestellt. Jede der fünf Frischkäsezubereitungen aus dem Reisegewerbe ergab einen positiven Befund für *Enterobacteriaceae*. Diese Frischkäse stammten vom selben Hersteller und wurden zu zwei verschiedenen Zeitpunkten für die Untersuchung erworben.

Im Hinblick auf die Zutaten wird deutlich, dass positive Befunde vor allem auf Frischkäsezubereitungen entfielen, denen Gemüse (insbesondere Paprika und Tomate) oder Gewürze zugegeben worden waren. So enthielten 23 der 45 (51 %) Zubereitungen mit Gemüse und acht der 15 (53 %) Zubereitungen mit Gewürzen *Enterobacteriaceae*. Zwar ergaben nur vier Frischkäse mit der Zugabe von Fisch und drei Käse mit der Zugabe von Obst den Nachweis von *Enterobacteriaceae*, jedoch entsprach dies einem Probenanteil von 80 % bzw. 60 % bezogen auf die jeweilige Zutatengruppe. Es wurden nur wenige Proben mit der Zugabe von Fisch oder Obst untersucht, denn solche Frischkäsezubereitungen waren seltener erhältlich und gehörten eher zum Sortiment der unverpackt im Einzelhandel oder auf dem Wochenmarkt angebotenen Waren.

Tabelle 4.8: Qualitativer Nachweis von *Enterobacteriaceae* in Frischkäse bzw. Frischkäsezubereitungen in Abhängigkeit von Angebotsform, Herstellungsweise, Vermarktungsform und Hauptzutut

Gruppierung nach	Anzahl der Proben	<i>Enterobacteriaceae</i> nachgewiesen	
		Proben	%
Angebotsform			
unverpackt	63	44	70
Fertigpackung	62	11	18
Herstellungsweise			
konventionell	93	46	49
ökologisch	32	9	28
Vermarktungsform			
Einzelhandel, konventionell, unverpackt	30	23	77
Einzelhandel, konventionell, Fertigpackung	37	2	5
Einzelhandel, ökologisch, Fertigpackung	9	3	33
Einzelhandel, Reisegewerbe, Fertigpackung	5	5	100
Hofladen, ökologisch, unverpackt	11	5	45
Hofladen, ökologisch, Fertigpackung	11	1	9
Wochenmarkt, unverpackt	22	16	73
Hauptzutut			
Gemüse*	45	23	51
Krautgewürze	41	14	34
Gewürze	15	8	53
Ohne Zutat**	14	3	21
Fisch	5	4	80
Obst	5	3	60
Gesamt	125	55	44

* vorwiegend Paprika und Tomate

** im Text auch als unverarbeitete Frischkäse bezeichnet

Neben *Enterobacteriaceae* als Summenparameter wurde zusätzlich die Nachweishäufigkeit von *E. coli* bestimmt. Qualitativ wurde *E. coli* in 17 Proben (14 %) nachgewiesen. Hierbei fiel auf, dass 13 der *E. coli*-positiven Proben (76 %) unverpackt und nur vier der positiven Proben (24 %) in Fertigpackung angeboten worden waren. Bei Berücksichtigung der Herstellungsweise ergaben sich auch deutliche Unterschiede in der Nachweishäufigkeit von *E. coli*. So enthielten 14 Proben aus konventioneller und lediglich drei Proben aus ökologischer Herstellung *E. coli*. Die Mehrzahl der positiven Proben (10 Proben) stammte aus dem Einzelhandel. Daneben wurden fünf der positiven Frischkäse auf dem Wochenmarkt erworben. Lediglich in einer Probe aus dem Reisegewerbe und in einer Probe aus dem Hofladen wurde *E. coli* nachgewiesen. Die Gruppierung der positiven Proben nach der Hauptzutat zeigt, dass vor allem Frischkäsezubereitungen mit der Zugabe von Paprika bzw. Tomate (sieben der 30 Proben mit Paprika und Tomate) den Nachweis von *E. coli* ergaben. Außerdem enthielten vier der *E. coli*-positiven Proben Gewürze, drei Proben Krautgewürze und zwei Proben Fisch. Nur in einem der unverarbeiteten Frischkäse wurde *E. coli* nachgewiesen.

4.5 Quantitative Bestimmung von coliformen Keimen bzw. *E. coli*

Der Keimgehalt von coliformen Keimen bzw. *E. coli* wurde durch Einsatz des MPN-Verfahrens (LST-MUG-Bouillon) und des Koloniezählverfahrens (VRB-MUG- bzw. ECC-Agar) ermittelt. Da die Verwendung der LST-MUG-Bouillon am häufigsten einen positiven Befund für coliforme Keime ergab, wurden im Folgenden die Ergebnisse, die durch Einsatz des MPN-Verfahrens erhalten worden, ausgewertet. Für die Mehrzahl der Proben (95 %) wurden Keimgehalte unter 10^3 KbE/g festgestellt. Bei sechs Proben wurde allerdings in der höchsten Verdünnungsstufe von 10^{-3} noch in allen drei Parallelansätzen des MPN-Verfahrens ein positives Ergebnis angezeigt, so dass von einem Keimgehalt $> 1,1 \times 10^3$ KbE/g ausgegangen werden muss. Für diese sechs Proben wurden die Ergebnisse aus dem parallel durchgeführten Koloniezählverfahren berücksichtigt.

Die quantitative Bestimmung von coliformen Keimen (s. 3.2.4) ergab für 41 Proben (33 %) ein positives Ergebnis. In Tabelle 4.9 sind die Ergebnisse zur Nachweishäufigkeit von coliformen Keime in Frischkäse bzw. Frischkäsezubereitungen in Abhängigkeit der Vermarktungsform, Angebotsform, Herstellungsweise und Hauptzutat zusammengestellt.

Generell entspricht die Verteilung der positiven Proben den Ergebnissen, die durch den qualitativen Nachweis von *Enterobacteriaceae* erhalten wurden.

Tabelle 4.9: Nachweishäufigkeit von coliformen Keimen (quantitative Bestimmung) in Frischkäse bzw. Frischkäsezubereitungen in Abhängigkeit von Angebotsform, Herstellungsweise, Vermarktungsform und Hauptzutat

Gruppierung nach	Anzahl der Proben	Coliforme Keime nachgewiesen	
		Proben	%
Angebotsform			
unverpackt	63	35	56
Fertigpackung	62	6	10
Herstellungsweise			
konventionell	93	39	42
ökologisch	32	2	6
Vermarktungsform			
Einzelhandel, konventionell, unverpackt	30	21	70
Einzelhandel, konventionell, Fertigpackung	37	-	-
Einzelhandel, ökologisch, unverpackt	9	1	11
Einzelhandel, Reisegewerbe, Fertigpackung	5	4	80
Hofladen, ökologisch, unverpackt	11	-	-
Hofladen, ökologisch, Fertigpackung	11	1	9
Wochenmarkt, unverpackt	22	14	64
Hauptzutat			
Gemüse*	45	21	47
Krautgewürze	41	11	27
Gewürze	15	3	20
Ohne Zutat**	14	-	-
Fisch	5	3	60
Obst	5	3	60
Gesamt	125	41	33

* vorwiegend Paprika und Tomate; ** im Text auch als unverarbeitete Frischkäse bezeichnet

Die Mehrzahl (85 %) der für coliforme Keime positiven Proben wurde unverpackt angeboten (35 von 41 positiven Proben), während nur sechs der Frischkäse in Fertigpackung coliforme Keime enthielten. Im Bezug auf die Herstellungsweise ist auffällig, dass nur 6 % der ökologisch, aber 42 % der konventionell hergestellten Käse Coliforme enthielten. Die Berücksichtigung der Vermarktungsform zeigt, dass der überwiegende Anteil der positiven Befunde auf Käse aus dem Einzelhandel und vom Wochenmarkt entfiel, die unverpackt angeboten worden waren (21 bzw. 14 Proben von 41 positiven Proben). Bei den fünf Proben aus dem Reisegewerbe wurde mit 80 % der höchste prozentuale Anteil an positiven Proben festgestellt. Keiner der Proben aus dem Einzelhandel, die konventionell hergestellt und in Fertigpackung angeboten worden waren, enthielten coliforme Keime. Nur eine der 22 Proben, die im Hofladen erworben worden waren, ergab den Nachweis von Coliformen.

Die Gruppierung der Proben nach der Hauptzutat zeigt, dass die meisten der positiven Proben Gemüse (21 Proben) oder Krautgewürze (11 Proben) enthielten. Die positiven Proben mit Gemüse enthielten in 17 von 21 Fällen Paprika bzw. Tomate. Bezogen auf die jeweilige Hauptzutat, ergab ein relativ hoher prozentualer Anteil (60 %) der Käse mit Fisch oder Obst einen positiven Befund für coliforme Keime. Auffällig ist, dass bei keinem der unverarbeiteten Frischkäse coliforme Keime nachgewiesen wurden.

Die quantitative Bestimmung von coliformen Keimen ergab, dass die Mehrzahl der Frischkäse bzw. Frischkäsezubereitungen einen geringen Gehalt an coliformen Keimen aufwies (Tabelle 4.10). Bei 67 % der Proben lag der Keimgehalt sogar unterhalb der Nachweisgrenze von $3,0 \times 10^0$ KbE/g. Für den überwiegenden Anteil der positiven Proben, wurde ein Keimgehalt von 10^0 bis 10^2 KbE/g ermittelt (26 von 41 positiven Proben). Lediglich sieben Proben (6 %) wiesen einen Keimgehalt von $> 10^3$ KbE/g auf. Bei sechs dieser sieben Proben lag der Keimgehalt vermutlich deutlich über 10^3 KbE/g, da unter Verwendung der LST-MUG-Bouillon in der höchsten Verdünnungsstufe noch alle drei Parallelansätze ein positives Ergebnis anzeigten (4.3.2.1). Für diese Proben wurden die Ergebnisse aus dem Koloniezählverfahren unter Verwendung der festen Nährmedien (VRB-MUG- bzw. ECC-Agar) berücksichtigt. Diese ergaben für die sechs Proben einen Coliformen-Gehalt zwischen $2,1 \times 10^3$ KbE/g und maximal $3,4 \times 10^4$ KbE/g.

Bei Berücksichtigung der Herstellungs- und Vermarktungsformen zeigte sich, dass die 15 Proben, für die ein Keimgehalt von $\geq 10^2$ KbE/g ermittelt wurde, ausschließlich aus konventioneller Herstellung stammten und entweder im Einzelhandel oder auf dem Wochenmarkt erworben worden waren. Der überwiegende Anteil dieser Proben (80 % der Proben mit $\geq 10^2$ KbE/g) wurde unverpackt angeboten. Lediglich drei der Proben wurden in einer Fertigpackung verkauft, wobei es sich ausschließlich um Frischkäsezubereitungen aus dem Reisegewerbe handelte. Bezüglich der Zutaten fällt auf, dass von den 15 Proben mit einem Keimgehalt von $\geq 10^2$ KbE/g sieben der Frischkäsezubereitungen Gemüse (vor allem Paprika bzw. Tomate und Radieschen) und sechs der Proben Krautgewürze (vor allem Schnittlauch) enthielten.

Tabelle 4.10: Absolute und relative Häufigkeit der ermittelten Keimgehalte (KbE/g) für coliforme Keime in Frischkäse bzw. Frischkäsezubereitungen (Nachweisgrenze $3,0 \times 10^0$ KbE/g)

Coliforme Keime KbE/g	Anzahl der Proben	Prozentualer Anteil
$< 3,0 \times 10^0$	84	67 %
$3,0 \times 10^0$ bis $< 10^1$	10	8 %
$1,0 \times 10^1$ bis $< 10^2$	16	13 %
$1,0 \times 10^2$ bis $< 10^3$	8	6 %
$> 10^3$	7	6 %

Bezüglich des Vorkommens von coliformen Keimen in Frischkäse sind durch die VO (EG) Nr. 2073/2005 keine Grenzwerte festgelegt worden. In der nicht mehr aktuellen Fassung der Schweizer Hygieneverordnung von 26. Juni 1995 (Stand 22. Februar 2000) wurde für den Gehalt von *Enterobacteriaceae* in Frischkäse ein Toleranzwert von 10^3 KbE/g angegeben. Bei der IDF befanden sich für coliforme Keime in Frischkäse Grenzwerte in von Höhe $m = 100$ KbE/g und $M = 1000$ KbE/g in Diskussion, die sich jedoch nicht durchgesetzt haben. Würde man einen Keimgehalt von 10^3 KbE/g als Grenzwert für coliforme Keime in Frischkäse anwenden, hätten 6 % der untersuchten Proben einen kritischen Keimgehalt aufgewiesen.

Im Rahmen der quantitativen Bestimmung von coliformen Keimen in Frischkäse wurde auch der Keimgehalt für *E. coli* ermittelt. Die Einzelergebnisse, die durch Einsatz von LST-MUG-Bouillon, VRB-MUG- und ECC-Agar erhalten wurden, sind bereits in Tabelle 4.5 aufgeführt worden. Bei der quantitativen Bestimmung (3.2.4) ergaben insgesamt sieben Proben einen positiven Befund für *E. coli*. Die ermittelten Keimgehalte lagen zwischen $9,2 \times 10^0$ KbE/g und maximal $9,5 \times 10^1$ KbE/g. Somit überschritt keine der Proben die durch die VO (EG) 2073/2005 festgelegten Grenzwerte bzw. die durch die Empfehlungen der Europäischen Kommission (2005/175/EG) herausgegebenen Beurteilungskriterien für *E. coli* in Käse aus wärmebehandelter Milch oder Molke ($m = 100$ KbE/g, $M = 1000$ KbE/g). Bei den *E. coli*-positiven Proben handelte es sich ausschließlich um unverpackte Frischkäsezubereitungen konventioneller Herstellung, die entweder im Einzelhandel (fünf Proben) oder auf dem Wochenmarkt (zwei Proben) erworben worden waren. Als Hauptzutat enthielten diese Frischkäse Gemüse (Paprika bzw. Tomate), Gewürze und in einem Fall Krautgewürze. Auffällig ist, dass keiner der unverarbeiteten Frischkäse und keine der Frischkäsezubereitungen mit der Zugabe von Obst oder Fisch einen positiven Befund für *E. coli* ergab.

4.6 Nachweishäufigkeit isolierter *Enterobacteriaceae*-Spezies

Für die Auswertung der Nachweishäufigkeit verschiedener *Enterobacteriaceae*-Gattungen bzw. -Spezies in Frischkäse wurden die Ergebnisse aus dem qualitativen Nachweis von *Enterobacteriaceae* (3.2.3) und der quantitativen Bestimmung von coliformen Keimen (3.2.4) zusammengefasst. Aus 125 Frischkäse-Proben wurden *Enterobacteriaceae*-Spezies aus insgesamt elf verschiedenen Gattungen isoliert. Zu diesen gehörten *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Escherichia*, *Pantoea*, *Citrobacter*, *Hafnia*, *Proteus*, *Cedecea*, *Kluyvera* und *Morganella* (in der Reihenfolge ihrer Nachweishäufigkeit aufgeführt).

In einzelnen Proben wurden bis zu sieben verschiedene Gattungen nachgewiesen (Abbildung 4.5), wobei die Mehrzahl der Proben zwischen einer Gattung und vier verschiedene Gattungen enthielt. Das Vorkommen von *Enterobacteriaceae*-Spezies aus mehreren verschiedenen Gattungen wurde vor allem bei solchen Proben festgestellt, die entweder unverpackt im Einzelhandel oder auf dem Wochenmarkt oder in Fertigpackung im Reisegewerbe angeboten worden waren. Dies entspricht den in Abschnitt 4.4 und 4.5

aufgeführten Ergebnissen für den Zusammenhang zwischen Angebots- und Vermarktungsform und der Nachweishäufigkeit von *Enterobacteriaceae* bzw. coliformen Keimen.

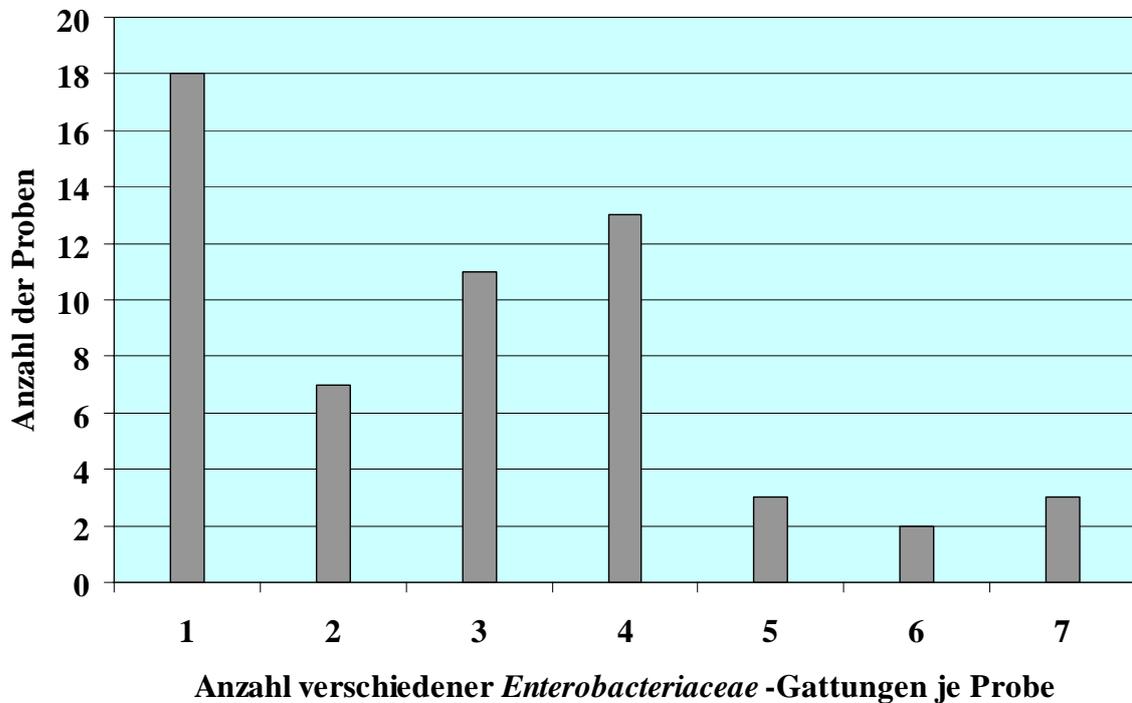


Abbildung 4.5: Absolute Häufigkeit der Co-Kontamination von Frischkäse mit *Enterobacteriaceae*-Spezies verschiedener Gattungen

In den 18 Proben, die nur *Enterobacteriaceae*-Spezies einer Gattung enthielten, wurden in der Mehrzahl der Fälle Spezies der Gattung *Enterobacter* (sechs Proben) und *Escherichia* (acht Proben) nachgewiesen. Tabelle 4.11 zeigt den Zusammenhang zwischen der Nachweishäufigkeit der isolierten *Enterobacteriaceae*-Gattungen und der Anzahl verschiedener Gattungen je Probe. Zu den am häufigsten nachgewiesenen Gattungen gehörten *Enterobacter* (38 Proben), *Klebsiella* (33 Proben), *Serratia* (26 Proben) und *Escherichia* (20 Proben). Sie wurden sowohl als einzige Gattung einer Probe als auch in Vergesellschaftung mit bis zu sechs anderen Genera nachgewiesen. *Enterobacteriaceae*-Spezies aus seltener nachgewiesenen Gattungen wie z. B. *Proteus*, *Cedecea*, *Kluyvera* oder *Morganella* waren meist in solchen Proben enthalten, die vier bis sieben verschiedene Genera aufwiesen.

Tabelle 4.11: Zusammenhang zwischen dem Vorkommen einzelner *Enterobacteriaceae*-Gattungen in Frischkäse und der Anzahl verschiedener Gattungen je Probe

Gattung	Positive Proben	Anzahl der Proben mit						
		1	2	3	4	5	6	7
<i>Enterobacter</i>	38	6	2	9	13	3	2	3
<i>Klebsiella</i>	33	0	3	10	12	2	3	3
<i>Serratia</i>	26	0	2	7	10	3	2	2
<i>Escherichia</i>	20	8	3	2	3	1	0	3
<i>Pantoea</i>	18	1	0	1	8	3	2	3
<i>Citrobacter</i>	11	0	0	1	3	2	2	3
<i>Hafnia</i>	7	2	3	1	1	0	0	0
<i>Proteus</i>	6	1	1	1	0	1	0	2
<i>Cedecea</i>	3	0	0	0	0	0	1	2
<i>Kluyvera</i>	2	0	0	0	2	0	0	0
<i>Morganella</i>	1	0	0	0	0	0	1	0

Bei Berücksichtigung der pH-Werte der positiven Proben zeigte sich, dass sechs der acht Proben, die *Enterobacteriaceae* aus fünf oder mehr Gattungen enthielten, einen pH-Wert von $\geq 5,10$ aufwiesen. Damit lagen deren pH-Werte über dem Durchschnitt der für Frischkäse ermittelten pH-Werte von pH 4,67. Das Wachstum einer Vielzahl von *Enterobacteriaceae*-Spezies aus verschiedenen Gattungen in Frischkäse schien daher durch höhere pH-Werte begünstigt zu werden. Häufiger nachgewiesene Gattungen wie *Enterobacter*, *Klebsiella* oder *Serratia* waren vermutlich gegenüber einem niedrigen pH-Wert weniger sensibel bzw. im Wachstum anderen Keimen überlegen.

Hinsichtlich der Vergesellschaftung bestimmter Genera in Frischkäse wurde bei Proben, bei denen *Enterobacteriaceae*-Spezies aus zwei oder drei verschiedenen Gattungen nachgewiesen wurden, häufig eine Co-Kontamination von *Enterobacter*, *Klebsiella* und *Serratia* festgestellt (Tabelle 4.12). Dies entsprach jedoch der generell höheren Nachweisrate dieser Genera in Frischkäse. Bei der Mehrzahl der isolierten Genera wurde keine auffällige Vergesellschaftung bestimmter *Enterobacteriaceae*-Gattungen festgestellt.

Tabelle 4.12: Vergesellschaftung von *Enterobacteriaceae* verschiedener Gattungen in Frischkäse bzw. Frischkäsezubereitungen

Nachgewiesene <i>Enterobacteriaceae</i> -Spezies der Gattung ¹⁾		Anzahl der Proben, die eine Co-Kontamination aufweisen mit											
		keine	<i>En</i>	<i>Kl</i>	<i>Se</i>	<i>Es</i>	<i>Pa</i>	<i>Ci</i>	<i>Ha</i>	<i>Pr</i>	<i>Ce</i>	<i>Klu</i>	<i>Mo</i>
Anzahl der Proben, die eine Co-Kontamination aufweisen mit	<i>En</i> (n = 38)	6		30	22	10	16	11	1	3	3	2	1
	<i>Kl</i> (n = 33)	0	30		22	10	15	10	2	4	3	2	1
	<i>Se</i> (n = 26)	0	22	22		5	13	7	3	3	2	2	1
	<i>Es</i> (n = 20)	8	10	10	5		5	4	0	2	2	0	0
	<i>Pa</i> (n = 18)	1	16	15	13	5		8	1	3	3	0	1
	<i>Ci</i> (n = 11)	0	11	10	7	4	8		0	2	3	0	1
	<i>Ha</i> (n = 7)	2	1	2	3	0	1	0		1	0	0	0
	<i>Pr</i> (n = 6)	1	3	4	3	2	3	2	1		1	0	0
	<i>Ce</i> (n = 3)	0	3	3	2	2	3	3	0	1		0	0
	<i>Klu</i> (n = 2)	0	2	2	2	0	0	0	0	0	0		0
	<i>Mo</i> (n = 1)	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	

¹⁾ *En* = *Enterobacter*, *Kl* = *Klebsiella*, *Se* = *Serratia*, *Es* = *Escherichia*, *Pa* = *Pantoea*, *Ci* = *Citrobacter*, *Ha* = *Hafnia*, *Pr* = *Proteus*, *Ce* = *Cedecea*, *Klu* = *Kluyvera*, *Mo* = *Morganella*
n = Anzahl der positiven Proben insgesamt

Abbildung 4.6 zeigt eine Übersicht zur absoluten Nachweishäufigkeit der aus den positiven Proben isolierten *Enterobacteriaceae*-Spezies (Zusammenfassung von qualitativem Nachweis von *Enterobacteriaceae* 3.2.3 und quantitativer Bestimmung von coliformen Keimen 3.2.4). Zu den am häufigsten nachgewiesenen Spezies zählten *Enterobacter cloacae* (37 Proben), *Klebsiella pneumoniae* ssp. *pneumoniae* (24 Proben) und *Escherichia coli* (17 Proben). Weniger häufig wurden *Serratia liquefaciens* und *Pantoea agglomerans* (beide 16 Proben), *Klebsiella oxytoca* (12 Proben), *Citrobacter freundii* (11 Proben) und *Hafnia alvei* (7 Proben) nachgewiesen. Weitere Spezies wurden nur vereinzelt isoliert.

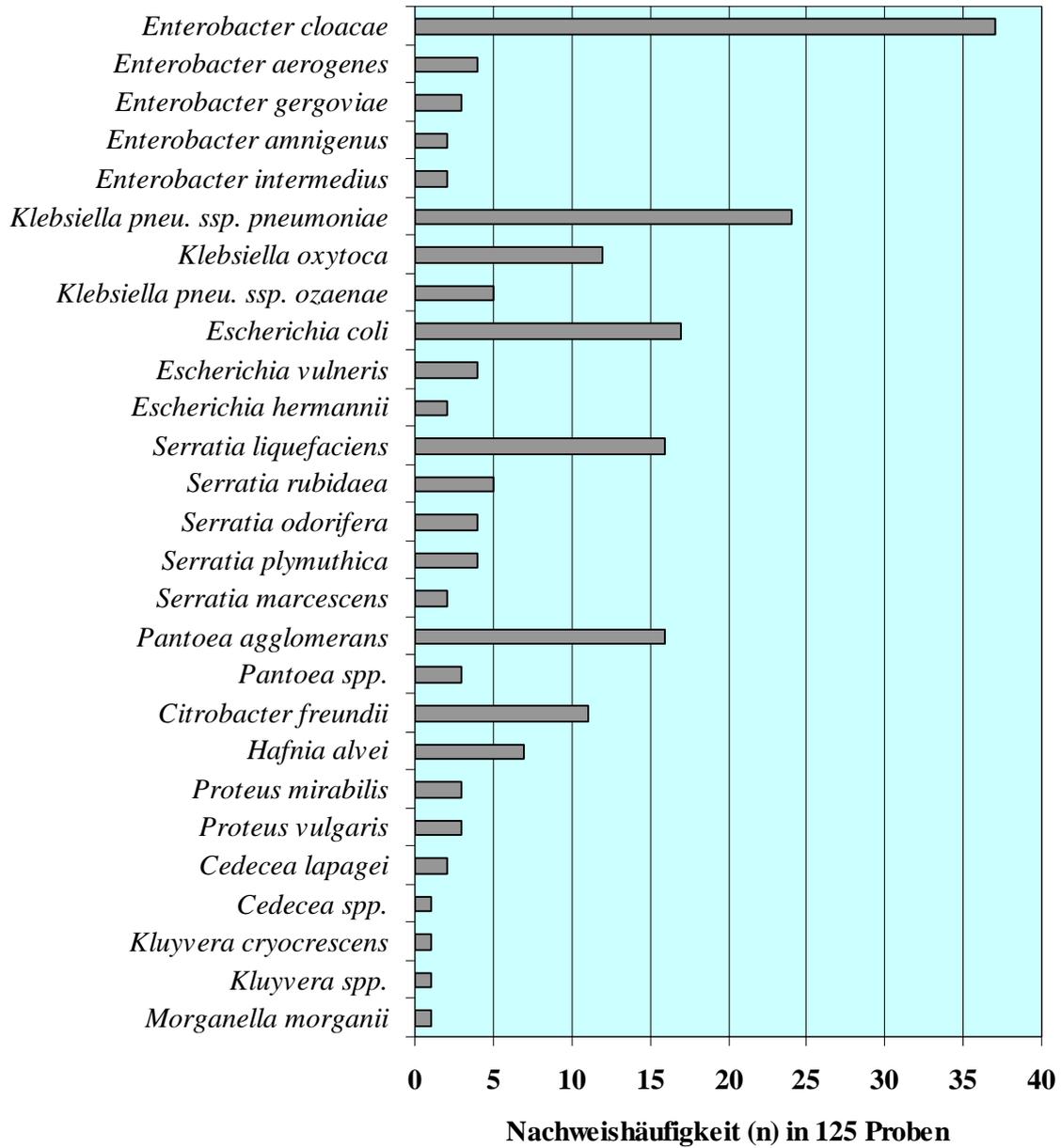


Abbildung 4.6: Absolute Nachweishäufigkeit verschiedener *Enterobacteriaceae*-Spezies in Frischkäse bzw. Frischkäsezubereitungen

4.7 Qualitativer Nachweis von *Listeria monocytogenes*

Die Überprüfung des Vorkommens von *L. monocytogenes* ergab in allen Fällen ein negatives Ergebnis. In drei Proben (2,4 %) wurde *L. innocua* nachgewiesen (Tabelle 4.13). Zwei dieser Proben stammten aus dem Einzelhandel (aus demselben Geschäft), eine Probe ist auf einem Wochenmarkt erworben worden. Die Frischkäsezubereitungen waren unverpackt angeboten worden. Neben *L. innocua* enthielten diese drei Proben auch *Enterobacteriaceae*.

Tabelle 4.13: Qualitativer Nachweis von *Listeria innocua* in drei Frischkäsezubereitungen

Angebotsform	Vermarktungsform	pH	Hauptzutat	Milch, Tierart
unverpackt	Einzelhandel, konventionell	4,40	Gemüse (Paprika/Tomate)	Ziege
	Einzelhandel, konventionell	4,45	Gemüse (Paprika/Tomate)	Schaf
	Wochenmarkt	5,92	Krautgewürz (Bärlauch)	Kuh

4.8 Quantitative Bestimmung Koagulase-positiver Staphylokokken

Zur Bestimmung Koagulase-positiver Staphylokokken wurden 70 Proben untersucht. Lediglich aus einer Probe wurden grampositive, Katalase-positive Kokken isoliert. Auf Baird-Parker-Agar bildeten sie glänzende, schwarze Kolonien, die von einem opaleszierenden Ring gefolgt von einer klaren Zone umgeben waren. Auf Blutagar bildeten sie weiß-graue Kolonien mit einer Zone vollständiger Hämolyse (α -Hämolyse). Kulturen dieser Kolonien ergaben eine positive Koagulase-Reaktion. Aufgrund dieser Eigenschaften wurden die isolierten grampositiven Kokken der Spezies *Staphylococcus (S.) aureus* zugeordnet. Bei der *S. aureus*-positiven Probe handelte es sich um eine Paprika-Frischkäsezubereitung, deren pH-Wert bei 5,07 lag. Sie wurde in einer Fertigpackung im Einzelhandel angeboten. Neben *S. aureus* enthielt diese Probe weder *Enterobacteriaceae* noch Listerien. Der ermittelte Keimgehalt für *S. aureus* lag bei $4,0 \times 10^1$ KbE/g. Dies entspricht einer Überschreitung des Schwellenwertes $m = 10$ KbE/g für *S. aureus* in

Frischkäse gemäß VO (EG) Nr. 2073/2005. Im Rahmen dieser Untersuchung ergaben außerdem 25 Proben (36 %) den Nachweis von *Kocuria spp.* und acht Proben (11 %) den Nachweis von Koagulase-negativen Staphylokokken. Eine weitere Differenzierung dieser Keime wurde nicht durchgeführt.

4.9 Molekularbiologische Charakterisierung der *E. coli*-Isolate mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die *E. coli*-Isolate wurden unter Verwendung der Primerpaare MK 1/MK 2 nach KARCH und MEYER (1989) mittels PCR auf das Vorkommen der Gene *stx1* und *stx2* überprüft. Die Primer erfassen sowohl *stx1* als auch *stx2* inklusive der meisten Varianten dieser Gene. Aus den *E. coli*-positiven Proben (n = 17) wurden insgesamt 48 *E. coli*-Isolate gewonnen. Abgesehen von den *E. coli*, die unter Verwendung des VRBG-Agars gewonnen wurden, stammte die Mehrzahl der Isolate aus Medien, die zur Differenzierung von *E. coli* eine positive β -Glucuronidase-Reaktion voraussetzten. Obwohl manchen VTEC-Serovaren die Aktivität der β -Glucuronidase fehlt, existieren dennoch einige VTEC-Serovare, die eine β -Glucuronidase-Aktivität besitzen. Daher wurde zur Absicherung bei allen Isolaten eine molekularbiologische Charakterisierung vorgenommen.

Nach Durchführung der Gelelektrophorese wies keines der *E. coli*-Isolate unter UV-Beleuchtung eine charakteristische Bande auf (Abbildung 4.7 und 4.8). Dieses Ergebnis deutet darauf, dass bei keinem der 48 *E. coli*-Isolate die Gene *stx1* oder *stx2* vorhanden waren.

Aufgrund des Untersuchungsansatzes erlaubt das Ergebnis jedoch nicht den Schluss, dass in den 125 Frischkäse-Proben keine Verotoxin-bildenden *E. coli* enthalten waren. Das Ziel dieser Untersuchung war lediglich die bereits isolierten *E. coli* hinsichtlich ihres Toxinbildungsvermögens näher zu charakterisieren.

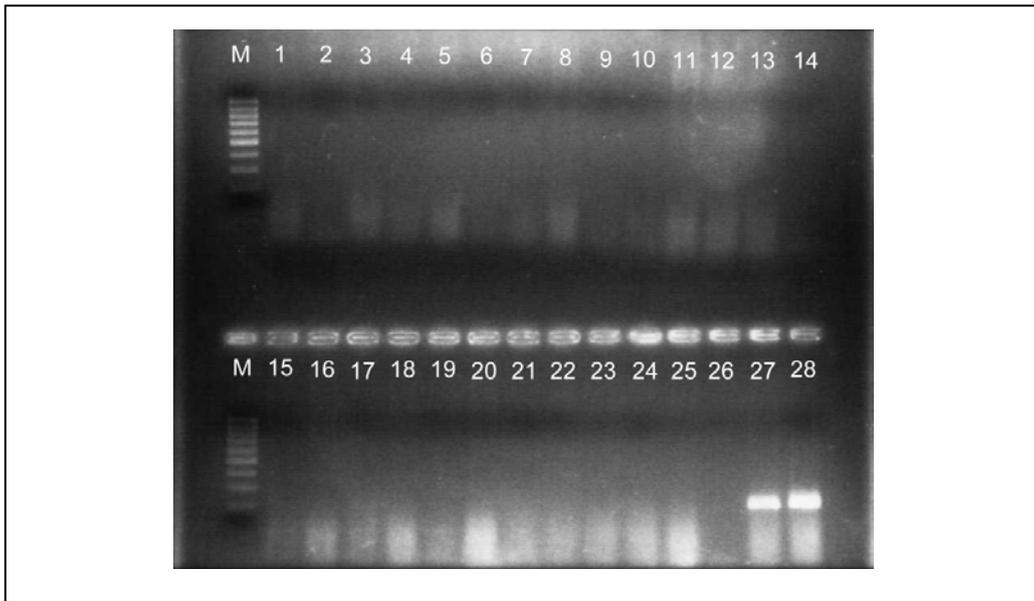


Abbildung 4.7: Ergebnis der Amplifikation des *stx*-Genabschnitts der *E. coli*-Isolate 1-24

(**M:** Marker, 100bp DNA Ladder, **Spur 1-13 und Spur 15-25:** *E. coli*-Isolate, **Spur 14:** Negativkontrolle, Reaktionsansatz (Mastermix) ohne DNA-Zugabe, **Spur 26:** Negativkontrolle, Aqua destillatum, **Spur 27:** Positivkontrolle *E. coli* Serovar O157:H7, **Spur 28:** Positivkontrolle *E. coli* Serovar O3:H⁻)

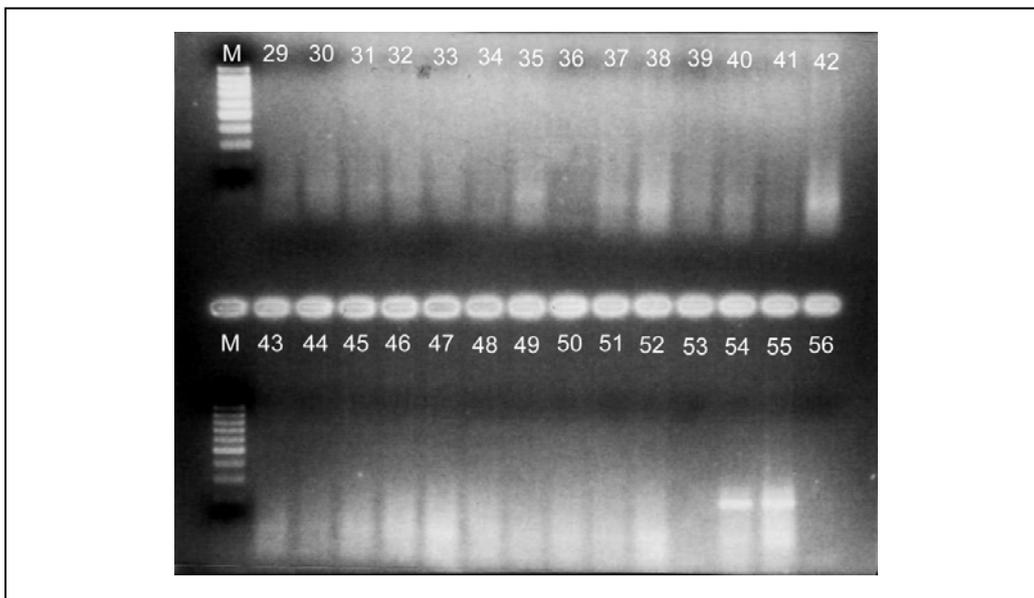


Abbildung 4.8: Ergebnis der Amplifikation des *stx*-Genabschnitts der *E. coli*-Isolate 25-48

(**M:** Marker, 100bp DNA Ladder, **Spur 29-52:** *E. coli*-Isolate, **Spur 53:** Negativkontrolle, Aqua destillatum, **Spur 54:** Positivkontrolle *E. coli* Serovar O157:H7, **Spur 55:** Positivkontrolle *E. coli* Serovar O3:H⁻, **Spur 56:** Negativkontrolle, Reaktionsansatz (Mastermix) ohne DNA-Zugabe)

4.10 Veränderung des Gehalts an *Enterobacteriaceae* in Frischkäse während einer Lagerung von sieben Tagen

In fünf unverpackt angebotenen Frischkäsezubereitungen konnten während der gesamten Lagerungszeit von sieben Tagen (entsprechend der angegebenen Mindesthaltbarkeit) sowohl *Enterobacteriaceae* (3.2.3) als auch coliforme Keime bzw. *E. coli* (3.2.4) nachgewiesen werden. Listerien und Koagulase-positive Staphylokokken wurden zu keinem Zeitpunkt der Untersuchung nachgewiesen. Hinsichtlich des Keimgehaltes von coliformen Keimen und *E. coli* wurde zum Ende des Mindesthaltbarkeitsdatums grundsätzlich eine Reduzierung der Keimzahl um eine bis maximal zwei Zehnerpotenzen beobachtet. In Tabelle 4.14 sind, differenziert nach den verwendeten Nährmedien, die ermittelten Keimgehalte für coliforme Keime aufgeführt.

Tabelle 4.14: Ermittelte Keimgehalte (KbE/g) für coliforme Keime und pH-Werte in fünf Frischkäsezubereitungen während einer Lagerungszeit von sieben Tagen

Produkt- bezeichnung	Nährmedium bzw. pH-Wert	Keimgehalt (KbE/g) coliforme Keime		
		Tag 1	Tag 4	Tag 7*
Frischkäse mit Tomate	LST-MUG	$2,3 \times 10^1$	$2,3 \times 10^1$	$< 3,0 \times 10^0$
	VRB-MUG	$< 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$
	ECC	$2,2 \times 10^2$	$1,0 \times 10^1$	$1,0 \times 10^1$
	pH-Wert	4,42	4,50	4,52
Frischkäse mit Paprika	LST-MUG	$9,3 \times 10^1$	$9,3 \times 10^1$	$2,3 \times 10^1$
	VRB-MUG	$1,1 \times 10^2$	$1,0 \times 10^1$	$< 10^1$
	ECC	$2,0 \times 10^2$	$1,5 \times 10^1$	$< 10^1$
	pH-Wert	4,59	4,48	4,61
Frischkäse mit Paprika	LST-MUG	$4,3 \times 10^1$	$4,3 \times 10^1$	$4,3 \times 10^1$
	VRB-MUG	$1,7 \times 10^3$	$4,8 \times 10^2$	$1,9 \times 10^2$
	ECC	$2,6 \times 10^3$	$8,2 \times 10^2$	$2,1 \times 10^2$
	pH-Wert	4,96	5,17	5,32
Frischkäse mit Kräutern	LST-MUG	$4,6 \times 10^2$	$2,4 \times 10^2$	$2,4 \times 10^2$
	VRB-MUG	$1,9 \times 10^2$	$9,0 \times 10^1$	$7,3 \times 10^1$
	ECC	$3,5 \times 10^2$	$6,4 \times 10^2$	$1,4 \times 10^2$
	pH-Wert	4,88	5,15	5,09
Frischkäse mit Schnittlauch	LST-MUG	$> 1,1 \times 10^3$	$1,1 \times 10^3$	$9,3 \times 10^1$
	VRB-MUG	$1,4 \times 10^4$	$1,1 \times 10^3$	$1,4 \times 10^3$
	ECC	$2,1 \times 10^4$	$5,5 \times 10^3$	$4,2 \times 10^3$
	pH-Wert	5,31	5,18	5,32

* entspricht Ablauf der angegebenen Mindesthaltbarkeit

Während der Lagerungszeit wurde keine wesentliche qualitative Veränderung des *Enterobacteriaceae*-Spektrums festgestellt. Am ersten Untersuchungstag wurden je Probe vier bis fünf verschiedene Spezies festgestellt und am letzten Untersuchungstag zwei bis vier verschiedene Spezies. Zu den dominierenden Spezies gehörten *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* ssp. *pneumoniae* und *Enterobacter cloacae* (Tabelle 4.15). Die pH-Wert-Messung ergab weitestgehend konstante Werte im Bereich von pH 4,42 bis pH 5,32 (durchschnittlicher pH-Wert bei 4,89). Tendenziell konnte am Ende der Mindesthaltbarkeit (Tag 7) ein geringgradiger Anstieg des pH-Wertes verzeichnet werden (Tabelle 4.14).

Tabelle 4.15: Nachgewiesene *Enterobacteriaceae*-Spezies in fünf Frischkäsezubereitungen während einer Lagerungszeit von sieben Tagen

Produktbezeichnung	Nachgewiesene <i>Enterobacteriaceae</i> -Spezies		
	Tag 1	Tag 4	Tag 7
Frischkäse mit Tomate	<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> <i>E. cloacae</i> , <i>P. agglomerans</i>	<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>Serratia spp.</i>	<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>Serratia spp.</i>
Frischkäse mit Paprika	<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>C. freundii</i> , <i>E. hermannii</i>	<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>C. freundii</i> , <i>E. hermannii</i> , <i>P. agglomerans</i>	<i>E. coli</i> , <i>E. cloacae</i>
Frischkäse mit Paprika	<i>K. pneumoniae</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>P. agglomerans</i> , <i>S. liquefaciens</i>	<i>K. pneumoniae</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>P. agglomerans</i>	<i>K. pneumoniae</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>P. agglomerans</i>
Frischkäse mit Kräutern	<i>K. pneumoniae</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>P. agglomerans</i> , <i>Enterobacter spp.</i>	<i>K. pneumoniae</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>P. agglomerans</i> , <i>S. liquefaciens</i> , <i>Enterobacter spp.</i>	<i>K. pneumoniae</i> , <i>E. cloacae</i>
Frischkäse mit Schnittlauch	<i>K. pneumoniae</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>P. agglomerans</i> , <i>Serratia spp.</i>	<i>K. pneumoniae</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>Serratia spp.</i> , <i>C. freundii</i>	<i>K. pneumoniae</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>P. agglomerans</i> , <i>Serratia spp.</i>

E. coli = *Escherichia coli*; *K. pneumoniae* = *Klebsiella pneumoniae*; *E. cloacae* = *Enterobacter cloacae*; *P. agglomerans* = *Pantoea agglomerans*; *C. freundii* = *Citrobacter freundii*; *E. hermannii* = *Escherichia hermannii*; *S. liquefaciens* = *Serratia liquefaciens*

5 DISKUSSION

5.1 Methodische Aspekte beim Nachweis von *Enterobacteriaceae* in Frischkäse

5.1.1 ECC-Agar als alternatives Selektivnährmedium zum VRBG-Agar

Zur Beurteilung der Prozesshygiene für Milch und Milcherzeugnisse sieht die VO (EG) Nr. 2073/2005 die Überprüfung des Vorkommens von *Enterobacteriaceae* vor. Als analytische Referenzmethode ist die DIN EN ISO-Norm 21528-1 angegeben, die als selektives Nährmedium den VRBG-Agar vorsieht. Da der VRBG-Agar für die Differenzierung von *Enterobacteriaceae* Nachteile aufweist, wurde in dieser Arbeit für den qualitativen Nachweis von *Enterobacteriaceae* in Frischkäse (3.2.3) parallel der ECC-Agar als ein neueres Selektivnährmedium eingesetzt. Die Untersuchungsergebnisse zeigen, dass der ECC-Agar die Anforderungen eines Alternativmediums zum VRBG-Agar erfüllt. Die Anzahl der positiven Befunde war bei beiden Nährmedien mit 55 Proben identisch. Auch die Nachweishäufigkeit der isolierten *Enterobacteriaceae*-Spezies war weitestgehend gleich.

Ein wesentlicher Vorteil des ECC-Agars bestand darin, dass *E. coli* von anderen coliformen Keimen deutlich anhand der Koloniemorphologie unterschieden werden konnte. Dies war beim VRBG-Agar nicht möglich, wobei dieses Medium auch nur dem Nachweis der Gesamt-*Enterobacteriaceae* und nicht der Unterscheidung von *E. coli* und anderen Coliformen dient. Zwar bildeten präsumtive *E. coli* auf VRBG-Agar etwas flachere und weniger glänzende Kolonien, was allerdings als recht subjektive Beurteilung angesehen werden muss. Beim ECC-Agar hingegen konnte die aus der Umsetzung chromogener Substrate resultierende unterschiedliche Färbung der Kolonien als objektives diagnostisches Kriterium verwendet werden. Neben der Aussage, ob *Enterobacteriaceae* in der Probe enthalten waren, konnte so parallel auch schon das Vorkommen von *E. coli* geprüft werden. Auch FINNEY *et al.* (2003) stellten fest, dass durch die verschiedene Färbung der Kolonien auf chromogenem Agar eine objektive Unterscheidung von *E. coli* und Coliformen möglich war, während die Beurteilung der Koloniemorphologie auf dem VRBG-Agar ein rein subjektives Kriterium darstellte. GONZÁLEZ *et al.* (2003) verglichen für den Nachweis von *Enterobacteriaceae* den VRBG-Agar ebenfalls mit einem

chromogenen Agar (Chromocult[®] Coliformen Agar) und stellten fest, dass sich der chromogene Agar sehr gut für den parallelen Nachweis von *E. coli* und coliformen Keimen eignet. Unter Verwendung des chromogenen Agars wurde zudem ein signifikant höherer Keimgehalt ermittelt.

Bei der vorliegenden Arbeit war die Unterdrückung der Begleitflora sowohl bei Verwendung des VRBG- als auch bei Verwendung des ECC-Agars in den meisten Fällen ausreichend. Dies war vermutlich nicht nur auf die beiden Selektivnährmedien, sondern auch auf die Durchführung der zwei Voranreicherungsschritte (nicht-selektiv und selektiv) zurückzuführen. Falls dennoch das Wachstum von Nicht-*Enterobacteriaceae* zu verzeichnen war, konnten derartige Kolonien gut und damit ohne diagnostischen Aufwand von denen der *Enterobacteriaceae* abgegrenzt werden.

5.1.2 Vergleich des Einsatzes von LST-MUG-Bouillon, VRB-MUG-Agar und ECC-Agar zur quantitativen Bestimmung von coliformen Keimen bzw. *E. coli*

Während die Überprüfung des Vorkommens von coliformen Keimen nach europäischem Recht nicht vorgesehen ist, ist die Untersuchung auf *E. coli* weiterhin erforderlich. Für die quantitative Bestimmung von coliformen Keimen bzw. *E. coli* (3.2.4) wurden vergleichend bei 125 Frischkäseproben in Anlehnung an die Methode L 01.00-54 nach § 64 LFGB ein flüssiges Nährmedium (LST-MUG-Bouillon) und in Anlehnung an die Methode L 01.00-3 nach § 64 LFGB ein festes Nährmedium (VRB-MUG-Agar) eingesetzt. Außerdem wurde die Eignung des ECC-Agars als alternatives Selektivnährmedium überprüft.

Die Verwendung der LST-MUG-Bouillon ergab bei 41 Proben (33 %) und damit am häufigsten einen positiven Befund für coliforme Keime. Unter Verwendung der festen Nährmedien wurden nur in 34 Proben (ECC-Agar) bzw. 28 Proben (VRB-MUG-Agar) Coliforme nachgewiesen. Hinsichtlich der Anzahl positiver Befunde für coliforme Keime bestand zwischen den einzelnen Medien (4.3.2) kein signifikanter Unterschied ($p > 0,05$; Chi-Quadrat-Vierfeldertest). Bei der Mehrzahl der unter Verwendung der LST-MUG-Bouillon zusätzlich ermittelten positiven Proben lagen nur geringe Keimgehalte vor, die

teilweise bereits unter der Nachweisgrenze der festen Nährmedien lagen. Auch insofern sind diese Resultate durchaus plausibel.

Die ermittelten Keimgehalte unter Verwendung der verschiedenen geprüften Nährmedien ergaben generell keine wesentlichen Unterschiede. Der Vergleich von LST-MUG-Bouillon und VRB-MUG-Agar zeigt, dass für 108 Proben (86 %) der gleiche Keimgehaltbereich ermittelt wurde. Bei den restlichen Proben wichen die Ergebnisse meist nur um maximal eine Zehnerpotenz (14 Proben) voneinander ab. Nur bei drei Proben ergab der VRB-MUG-Agar einen um zwei Zehnerpotenzen höheren Keimgehalt. Untersuchungen von FENG und HARTMAN (1982) haben gezeigt, dass sich die LST-MUG-Bouillon wesentlich besser als der VRB-MUG-Agar für den Nachweis von hitze- oder chlogeschädigten *E. coli* eignet. Die Autoren nahmen an, dass in der Bouillon eher eine Reparatur von geschädigten Zellen stattfinden kann.

Der Vergleich von LST-MUG-Bouillon und ECC-MUG-Agar zeigt, dass für 104 Proben (83 %) der gleiche Keimgehaltbereich ermittelt wurde. Bei 17 Proben wichen die Ergebnisse nur um eine Zehnerpotenz voneinander ab. Bei drei Proben ergab der ECC-Agar einen um zwei Zehnerpotenzen und bei einer Probe um drei Zehnerpotenzen höheren Keimgehalt. Bei Letzterer fiel auf, dass trotz des relativ hohen Keimgehaltes von $> 10^3$ Kbe/g, der durch Verwendung des ECC-Agars ermittelt wurde, die LST-MUG-Bouillon einen negativen Befund für Coliforme ergab. Auch VENKATESWARAN *et al.* (1996) stellten bei der Untersuchung einer Probe mit einem *E. coli*-Gehalt von $> 10^3$ Kbe/g fest, dass die LST-MUG-Bouillon einen negativen Befund ergab. Dies führten die Autoren auf das Laurylsulfat zurück, das neben dem erwünschten Hemmeffekt auf grampositive Bakterien wahrscheinlich auch eine beeinträchtigende Wirkung auf das Wachstum von geschädigten *E. coli* hat.

Der Vergleich von VRB-MUG- und ECC-Agar zeigt, dass in der Mehrzahl der Fälle (114 Proben bzw. 91 %) übereinstimmende Ergebnisse für den Keimgehaltbereich ermittelt wurden. Bei den übrigen Proben wurde unter Verwendung des ECC-Agars meist ein höherer Keimgehalt festgestellt, wobei in acht Fällen der Unterschied lediglich eine Zehnerpotenz betrug. Nur bei zwei Proben waren deutlichere Diskrepanzen feststellbar.

ZANGERL und FRIEDL (2001) untersuchten 24 Rohmilch- und 10 Käseproben unter paralleler Verwendung von LST-MUG, VRB-MUG und Coli ID Medium (chromogener Agar). Während der Anteil *E. coli*-positiver Proben mit LST-MUG und Coli ID ähnlich hoch war (27 bzw. 26 Proben), wurde *E. coli* unter Verwendung von VRB-MUG nur in 21 Proben festgestellt. Ein Vergleich der *E. coli*- und Coliformenkeimzahlen in Proben, bei denen auswertbare Ergebnisse erhalten wurden, erbrachte allerdings keinen signifikanten Unterschied ($p > 0,05$).

Im Bezug auf die Nachweishäufigkeit der meisten Coliformen-Spezies unterschieden sich die drei Medien zwar nicht wesentlich, jedoch ergaben sich deutliche Unterschiede hinsichtlich der quantitativen Bestimmung von *E. coli*. Unter Verwendung des ECC-Agars wurde *E. coli* in sechs Proben nachgewiesen, bei Einsatz des VRB-MUG-Agars hingegen nur in drei Proben. Unter Verwendung von LST-MUG-Bouillon wurde *E. coli* sogar lediglich in zwei Proben nachgewiesen. Auch die Differenzierung von *E. coli* und Coliformen gestaltete sich je nach Medium unterschiedlich aufwendig. Auf dem ECC-Agar konnte *E. coli* (violette Kolonien) von anderen Coliformen (rosa Kolonien) deutlich anhand der Koloniefärbung abgegrenzt und quantitativ erfasst werden. Unter Verwendung des VRB-MUG-Agars wurde für *E. coli*-positive Proben eine diffuse Fluoreszenz des ganzen Agars festgestellt, die nicht eindeutig einzelnen Kolonien zugeordnet werden konnte, wodurch die quantitative Bestimmung von *E. coli* erschwert wurde. Zwar berichten FENG und HARTMAN (1982), dass *E. coli* auf VRB-MUG-Agar relativ einfach anhand der Fluoreszenz von anderen Coliformen unterschieden werden kann, MANAFI (1996) stellte jedoch fest, dass bei Verwendung von VRB-MUG die Fluoreszenz schnell aus dem engeren Bereich der Kolonien diffus im ganzen Agar sichtbar wird. Ebenso berichteten ZANGERL und FRIEDL (2001), dass bei Verwendung von VRB-MUG aufgrund der diffusen Fluoreszenz auf der Platte die *E. coli*-Keimzahl oft nur geschätzt werden konnte und in einigen Fällen eine Quantifizierung überhaupt nicht möglich war. Die Autoren stellten darüberhinaus fest, dass *E. coli* unter Verwendung von VRB-MUG in einer geringeren Probenzahl als mittels eines chromogenen Nährmediums (Coli ID Medium) nachgewiesen wurde und dass der durch Einsatz von VRB-MUG ermittelte Keimgehalt signifikant niedriger war ($p < 0,001$). Sie kamen zu dem Schluss, dass *E. coli* mit einem chromogenen Nährmedium wesentlich zuverlässiger bestimmt werden kann.

In der vorliegenden Arbeit war bei Verwendung der LST-MUG-Bouillon der spezifische MUG-Abbau durch *E. coli* in vielen Fällen nicht eindeutig beurteilbar, da suspendierte Frischkäse-Bestandteile Fluoreszenz-ähnliche Aufhellungen ergaben. Dies hatte zur Folge, dass *E. coli* oft nicht eindeutig von anderen Coliformen differenziert werden konnte. Bei einer zweifelhaften Beurteilung der Fluoreszenz war auch die Indolbildung nur eingeschränkt als diagnostisches Kriterium für *E. coli* verwendbar, da auch andere coliforme Keime Indol bilden können. So beschrieb NIEMI *et al.* (2003), dass durch das Vorkommen von *Klebsiella oxytoca* falsch-positive Befunde für *E. coli* möglich sind. FENG und HARTMAN (1982) hingegen vertraten die Auffassung, dass bei Verwendung von LST-MUG anhand der Fluoreszenz gut zwischen *E. coli* und Coliformen differenziert werden kann. Allerdings beimpften die Autoren die LST-MUG-Bouillon mit reinen Bakterienkulturen und verwendeten keine Anschlättelung, die suspendiertes Probenmaterial enthielt. ZANGERL und FRIEDL (2001) bezeichneten als allgemeinen Nachteil bei Verwendung von LST-MUG, dass das MPN-Verfahren bei größeren Probenzahlen einen hohen Arbeits- und Materialaufwand erfordert und die MPN-Schätzung ein Mangel an Präzision aufweist. Auch ROMPRÉ *et al.* (2002) kritisierten den Mangel an Präzision.

Der Anteil der Begleitflora war bei Verwendung des ECC-Agars am höchsten (32 Fälle). Kolonien von Nicht-Coliformen konnten aber aufgrund der fehlenden Färbung (weiß oder durchscheinend) deutlich unterschieden werden. Auf dem VRB-MUG-Agar wiesen Kolonien von Nicht-Coliformen (zwölf Fälle) z. T. eine ähnliche Morphologie zu Coliformen auf und erforderten die Durchführung weiterer Bestätigungsreaktionen. Bei Verwendung der LST-MUG-Bouillon konnte das Vorkommen von grampositiven Endosporenbildenden-Stäbchen zu einem falsch-positiven Befund führen, da diese ebenfalls Gas aus Laktose bildeten (sieben Fälle). In der Literatur sind neben dem Vorkommen von aeroben oder fakultativ anaeroben sporenbildenden Bakterien (MEYER, 1918; HUSSONG *et al.*, 1981; MANAFI, 2002) weitere Ursachen für das Auftreten von falsch-positiven Befunden bei Verwendung von LST-MUG beschrieben worden, beispielsweise das Vorkommen von Oxidase-positiven Bakterien, die Gas aus Laktose bilden können (HUSSONG *et al.*, 1981; FENG und HARTMAN, 1982; GEISLER *et al.*, 2000; MANAFI, 2002). Um bei der vorliegenden Arbeit falsch-positive Befunde auszuschließen, wurde stets eine weitere Differenzierung durchgeführt. Dadurch erforderte die Verwendung der LST-MUG-Bouillon aber auch den größten Arbeits-, Material- und Zeitaufwand für die quantitative Bestimmung von coliformen Keimen bzw. *E. coli*.

5.1.3 Methodenabhängige Unterschiede bei Voranreicherung und Direktbeimpfung für den Nachweis von *Enterobacteriaceae*

Für den qualitativen Nachweis von *Enterobacteriaceae* (3.2.3) wurde vor Beimpfung der Nährmedien (VRBG-Agar, ECC-Agar) zunächst in einem nicht selektiven Nährmedium (Peptonwasser) und danach in einem selektiven Nährmedium (EEB) eine Voranreicherung durchgeführt. Für die quantitative Bestimmung von coliformen Keimen (3.2.4) wurden die Nährmedien (LST-MUG-Bouillon, VRB-MUG-Agar, ECC-Agar) direkt aus der Anschüttelung (in Ringerlösung homogenisiertes Probenmaterial) beimpft. Die Überprüfung des Einflusses methodischer Variationen (Voranreicherung, Direktbeimpfung) auf den Nachweis von *Enterobacteriaceae* zeigte, dass erwartungsgemäß bei Durchführung einer Voranreicherung in einem etwas höheren Anteil der Proben *Enterobacteriaceae* nachgewiesen wurden als bei der Direktbeimpfung von Nährmedien. Zwar bestand hinsichtlich der Anzahl der positiven Proben kein dramatischer Unterschied zwischen den beiden Methoden, dennoch fiel auf, dass nach Durchführung einer Voranreicherung in 55 Proben (44 %) und durch Direktbeimpfung nur in 41 Proben (33 %) *Enterobacteriaceae* nachgewiesen wurden.

Zudem wurde festgestellt, dass die Nachweisrate einzelner Spezies je nach Methode variierte. Während *Pantoea spp.* und *Serratia spp.* höhere Nachweisraten bei der Direktbeimpfung aufwiesen, ergab die Voranreicherung höhere Nachweisraten für *Klebsiella spp.*, *E. coli* und *Citrobacter freundii*. Hinsichtlich des Anteils der *E. coli*-positiven Proben wurde zwischen der Direktbeimpfung (sieben Proben) und der Durchführung einer Voranreicherung (17 Proben) ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$; Chi-Quadrat-Vierfeldertest) festgestellt. Für die unterschiedliche Nachweisrate einzelner Spezies kann eine nicht unerhebliche Verschiebung des Keimspektrums durch die Voranreicherung verantwortlich gewesen sein oder eine schlechtere Anwachsrate der Mikroorganismen bei der Direktbeimpfung. *E. coli* wurde in Frischkäse sowohl als einzige Spezies als auch in Vergesellschaftung mit anderen *Enterobacteriaceae* nachgewiesen. Eine bevorzugte Co-Kontamination wurde allerdings nicht festgestellt. Auffällig war lediglich, dass *E. coli*-positive Proben nur einen geringen Gehalt an weiteren Coliformen aufwiesen. So waren die aus Frischkäse isolierten *E. coli* durch den Herstellungsprozess vermutlich so geschädigt, dass sie gegenüber anderen Keimen weniger konkurrenzfähig waren und erst nach Voranreicherung eine optimale Anwachsrate gegeben war.

5.2 Mikrobiologische Qualität von Frischkäse

5.2.1 *Enterobacteriaceae* und coliforme Keime

Der qualitative Nachweis von *Enterobacteriaceae* (3.2.3) ergab für 55 Proben (44 %) und die quantitative Bestimmung von coliformen Keimen (3.2.4) für 41 Proben (33 %) einen positiven Befund. Der ermittelte Keimgehalt für coliforme Keime lag bei maximal $3,4 \times 10^4$ KbE/g, in der Mehrzahl der Fälle (65 % der positiven Proben) jedoch deutlich unterhalb von 10^2 KbE/g. Da *Enterobacteriaceae* durch die Wärmebehandlung wirksam abgetötet werden, ist ihr Vorkommen in pasteurisierten Milchprodukten als Folge einer Rekontamination anzusehen (RIEMELT *et al.*, 1996; ZANGERL, 2006a). Dem entspricht auch, dass unverpackte Proben wesentlich häufiger und in höheren Keimgehalten *Enterobacteriaceae* aufwiesen als Frischkäse in Fertigpackungen.

Neben der Wärmebehandlung hat auch der pH-Wert einen wesentlichen Einfluss auf den *Enterobacteriaceae*-Gehalt. Zwar sind für *Enterobacteriaceae* verschiedene Mechanismen beschrieben, die ein Wachstum im sauren Milieu ermöglichen (GORDEN und SMALL, 1993; LIN *et al.*, 1995; BEARSON *et al.*, 1997), ein optimales Wachstum findet jedoch im neutralen pH-Bereich statt (KRÄMER, 2002). Dementsprechend wurde bei der vorliegenden Arbeit festgestellt, dass bei steigendem pH-Wert auch der Anteil der mit *Enterobacteriaceae* bzw. mit Coliformen kontaminierten Proben zunahm.

Des Weiteren wurde ein Zusammenhang zwischen der Verwendung bestimmter Zutaten und der Nachweishäufigkeit von *Enterobacteriaceae* bzw. dem Keimgehalt von Coliformen beobachtet. Insbesondere Frischkäsezubereitungen mit Zutaten wie Paprika und/oder Tomate bzw. von (Kraut-)Gewürzen wiesen höhere Kontaminationsraten auf. Vermutlich sind diese Zutaten häufiger mit *Enterobacteriaceae* kontaminiert und beeinflussen demzufolge die mikrobiologische Qualität von Frischkäsen bzw. Frischkäsezubereitungen.

Die Untersuchungsergebnisse entsprechen sowohl qualitativ als auch quantitativ den Befunden, die in der Literatur für Frischkäse aus pasteurisierter Milch beschrieben wurden. Für Rohmilch-Frischkäse werden deutlich höhere Kontaminationsraten von bis zu 100 % angegeben. Dies entspricht den Befunden, die Untersuchungen von Rohmilch ergaben und

unterstreicht die Bedeutung der Wärmebehandlung während des Herstellungsprozesses, um den *Enterobacteriaceae*-Gehalt in Frischkäse zu reduzieren. Da durch die Verordnung zur Durchführung von Vorschriften des gemeinschaftlichen Lebensmittelhygienerechts vom 8. August 2007 das generelle Wärmebehandlungsgebot für Frischkäse weggefallen ist, ist dies nicht mehr grundsätzlich gewährleistet. Allerdings müssen dann auch andere geeignete Maßnahmen ergriffen werden, mit denen die Sicherheit des Lebensmittels gewährleistet werden kann.

Während der Lagerung von Frischkäse bis zum Ablauf des angegebenen Mindesthaltbarkeitsdatums (sieben Tage) wurde eine Reduzierung des Coliformen-Gehaltes um bis zu zwei Zehnerpotenzen beobachtet. Dies entspricht den Untersuchungsergebnissen von ZÁRATE *et al.* (1997). Zwar beobachteten die Autoren zunächst einen Anstieg des Keimgehaltes, aber nach zwei Tagen war ein deutlicher Abfall des Coliformen-Gehaltes bis teilweise unterhalb der Nachweisgrenze zu verzeichnen. Die Reduktion des Coliformen-Gehaltes während der Lagerung ist vermutlich auf die anhaltende Wirkung des sauren Milieus zurückzuführen.

Die Differenzierung der isolierten *Enterobacteriaceae* bzw. Coliformen aus 125 Proben, hat am häufigsten den Nachweis von *Enterobacter spp.*, *Klebsiella spp.*, *Escherichia spp.* und *Serratia spp.* ergeben. Spezies dieser Genera wurden sowohl einzeln als auch in Vergesellschaftung mit anderen Spezies nachgewiesen, während Spezies seltener isolierter Genera fast immer in Vergesellschaftung vorkamen. Hinsichtlich des Vorkommens von *Enterobacter cloacae* (37 Proben), *Klebsiella pneumoniae ssp. pneumoniae* (24 Proben), *Klebsiella oxytoca* (12 Proben) und *Citrobacter freundii* (11 Proben) ist nicht nur zu beachten, dass diese Hygienemängel anzeigen und zum Verderb führen können, sondern auch dass sie fakultativ pathogene Erreger sind (KRÄMER, 2002). Neben den unter 2.2.1.3 beschriebenen Virulenzfaktoren von *Enterobacteriaceae*, sind für *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella spp.* und *Citrobacter freundii* auch die Produktion von hitzelabilen und hitzestabilen Enterotoxinen beschrieben bzw. der Besitz der entsprechenden Gene. Diese sind zwar nicht identisch mit den *E. coli*-Enterotoxinen, weisen aber teilweise antigenetische und genetische Ähnlichkeiten auf (GUARINO *et al.*, 1987; GUARINO *et al.*, 1989; SCHMIDT *et al.*, 1993; PATON und PATON, 1996; JOLIVET-GOUGEON *et al.*, 1997; KARASAWA *et al.*, 2002; SIMI *et al.*, 2003; PARAJE *et al.*, 2005; MACZYŃSKA *et al.*, 2007; MICHALSKA *et al.*, 2007). Nach PATON und PATON

(1996) hat jeder Organismus, der in der Lage ist sich im menschlichen Darm anzusiedeln und Shiga-Toxin ähnliche Gene zu exprimieren, auch das Potential, lebensgefährliche Erkrankungen des Menschen zu verursachen.

5.2.2 *Escherichia coli*

E. coli wurde relativ häufig in Frischkäse bzw. Frischkäsezubereitungen nachgewiesen (17 Proben bzw. 14 %). Im Rahmen der quantitativen Bestimmung ergaben sieben Proben einen positiven Befund, wobei der ermittelte Keimgehalt für *E. coli* maximal bei lediglich $9,5 \times 10^1$ KbE/g lag. Somit überschritt keine dieser Proben die durch die VO (EG) Nr. 2073/2005 festgelegten Grenzwerte für *E. coli* in Käse aus wärmebehandelter Milch oder Molke ($m = 100$ KbE/g; $M = 1000$ KbE/g). Hinsichtlich der positiven Proben fiel auf, dass der überwiegende Anteil unverpackt angeboten worden war und als Hauptzutat Paprika und/oder Tomate bzw. (Kraut-)Gewürze enthält. Abgepackte Ware großer und namhafter Hersteller, wie sie das Segment der Frischkäse in Deutschland dominiert, war ausnahmslos negativ.

In der Literatur beschriebene Untersuchungen von Bestandmilch ergaben bei bis zu 99 % der Proben den Nachweis von *E. coli*. Dies ist vor allem bei der Herstellung von Rohmilch-Frischkäsen von Bedeutung. Für diese wurden Kontaminationsraten von bis zu 86 % und *E. coli*-Gehalte von $> 10^6$ KbE/g angegeben. Dagegen wiesen Frischkäse aus pasteurisierter Milch für *E. coli* deutlich geringere Kontaminationsraten von etwa 2 % sowie deutlich niedrigere Keimgehalte von maximal 10^3 KbE/g auf. In der vorliegenden Arbeit wurde zwar für Frischkäse aus pasteurisierter Milch im Vergleich zur Literatur ein höherer Anteil an *E. coli*-positiven Proben (14 %) festgestellt, jedoch typischerweise ein wesentlich geringerer Keimgehalt ermittelt (maximal $9,5 \times 10^1$ KbE/g). Da *E. coli* durch die Pasteurisation sicher abgetötet wird, ist das Vorkommen dieses Keimes in wärmebehandelten Produkten in der Regel auf eine Rekontamination zurückzuführen (RIEMELT *et al.*, 1996; VAN KESSEL *et al.*, 2004). Dem entspricht, dass in den eigenen Untersuchungen eine Belastung von Frischkäsezubereitungen mit *E. coli* im Wesentlichen auf unverpackt vermarktete Waren beschränkt war, die eher einer Kontamination unterliegen und damit Hygienemängel aufweisen können.

Bei den im Rahmen der eigenen Untersuchungen gewonnenen 48 *E. coli*-Isolaten wurde zusätzlich molekularbiologisch mittels PCR das Vorhandensein der Gene *stx1* oder *stx2* überprüft. Für einige dieser *E. coli*-Isolate wurde bei der Differenzierung eine positive β -Glucuronidase (GUD)-Reaktion vorausgesetzt, wodurch das Serovar O157:H7, das meist GUD-negativ ist, in der Regel nicht erfasst wird (FENG und HARTMAN, 1982). Da zum einen auch GUD-positive Varianten von *E. coli* O157:H7 beschrieben wurden und zum anderen noch andere pathogene VTEC Serovare existieren (HAYES *et al.*, 1995), wurde die Untersuchung der Vollständigkeit halber für alle Isolate durchgeführt. Die molekularbiologische Charakterisierung der Isolate ergab in keinem Fall einen Hinweis auf das Vorkommen der Gene *stx1* oder *stx2*.

Obwohl für Bestandmilchproben und Frischkäse teilweise sehr hohe Kontaminationsraten mit *E. coli* beschrieben wurden, wird das Vorkommen von VTEC generell wesentlich seltener beobachtet. Untersuchungen von Bestandmilch ergaben für VTEC eine Vorkommenshäufigkeit von maximal 3,8 % und Untersuchungen von Frischkäse ergaben in der Mehrzahl der Fälle keinen Nachweis von VTEC. Lediglich REY *et al.* (2006) stellten bei der Untersuchung von Ziegenmilch-Frischkäse eine Kontaminationsrate von 16,7 % fest. In Anbetracht der Fähigkeit von *E. coli*, auch in Lebensmitteln mit einem niedrigen pH-Wert längere Zeit zu persistieren (SINELL und KLEER, 2000) sowie der Fähigkeit sich in Frischkäse zu vermehren (AROCHA *et al.*, 1992; SAAD *et al.*, 2001; MENDOZA-YEPES *et al.*, 1999) ist eine Kontamination mit *E. coli* nicht nur hinsichtlich der Lebensmittelhygiene, sondern auch im Bezug auf die Lebensmittelsicherheit kritisch zu beurteilen. Einige pathogene Vertreter wie *E. coli* O157:H7 weisen nur eine geringe infektiöse Dosis auf (LEKKAS *et al.*, 2006) und Lebensmittelinfektion durch den Verzehr von mit VTEC kontaminierten Frischkäsen sind bereits in mehreren Fällen beschrieben worden (Tabelle 2.8; DESCHÊNES *et al.*, 1996; DURCH *et al.*, 2000; ESPIÉ *et al.*, 2006).

5.2.3 Rechtliche Bewertung der Befunde für *Enterobacteriaceae*

Eine rechtliche Bewertung der erhobenen Befunde ist derzeit schwierig, da die aktuellen EU-Vorschriften weder für *Enterobacteriaceae* noch für coliforme Keime in Käse mikrobiologische Kriterien beinhalten. Lediglich für *E. coli* wurden Grenzwerte festgelegt (VO (EG) Nr. 2073/2005) bzw. Empfehlungen veröffentlicht (2004/24/EG und

2005/175/EG). Hierbei stellt sich die Frage, ob auf die Überprüfung des Vorkommens von *Enterobacteriaceae* verzichtet werden könnte und die alleinige Überprüfung des Vorkommens von *E. coli* hinreichend wäre. Generell sind *Enterobacteriaceae* bzw. coliforme Keime wichtige Hygieneindikatoren für die Beurteilung der mikrobiologischen Qualität von Milch und Milcherzeugnissen (BECKER und TERPLAN, 1987; RIEMELT *et al.*, 1996; MANAFI, 2002). Aspekte, die in der Vergangenheit zu einer Reglementierung geführt haben, sind weiterhin von Relevanz.

Im Rahmen der eigenen Untersuchungen wurde *E. coli* qualitativ in 17 Proben (14 %) nachgewiesen. Bei den Proben, bei denen eine Ermittlung des *E. coli*-Gehaltes möglich war, wurde keine Überschreitung der Grenzwerte festgestellt. Die Überprüfung des Vorkommens von *Enterobacteriaceae* bzw. Coliformen hingegen ergab wesentlich häufiger einen positiven Befund (55 bzw. 41 Proben) und damit einen Hinweis auf mögliche Hygienemängel. Auch wenn für die Mehrzahl der Proben nur ein geringer Keimgehalt ermittelt wurde, so wies die Anwendung des Grenzwertes von 10^3 KbE/g gemäß eines Vorschlages der IDF (BECKER und TERPLAN, 1987) bzw. einer ehemaligen Fassung der Schweizer Hygieneverordnung für 6 % der Proben einen kritischen Keimgehalt auf. Auch in Anbetracht der Tatsache, dass für die am häufigsten nachgewiesenen Spezies wie *Enterobacter spp.*, *Klebsiella spp.* und *Citrobacter freundii* das Vorkommen von hitzelabilen und hitzestabilen Enterotoxinen ähnlich denen von *E. coli* beschrieben ist und diese Spezies zumindest fakultativ pathogen sind, sollte die Prüfung des Vorkommens von *Enterobacteriaceae* bzw. coliformen Keimen durchaus in den aktuellen Richtlinien miteinbezogen werden. Günstig ist in diesem Zusammenhang jedoch auch zu sehen, dass eine Keimvermehrung in Frischkäse nicht zu befürchten ist, vielmehr sogar eine Reduzierung der Keimzahl bis zum Mindesthaltbarkeitsdatum wahrscheinlich ist.

Ob nun der Nachweis von *Enterobacteriaceae* oder der von Coliformen zur Beurteilung der hygienischen Qualität geeigneter ist, wurde schon in vielen Arbeiten diskutiert. Durch die VO (EG) Nr. 2073/2005 wurde bei der Untersuchung von Milcherzeugnissen der Nachweis von coliformen Keimen grundsätzlich durch den Nachweis von *Enterobacteriaceae* ersetzt. Da coliforme Keime durch die Laktoseverwertung an das Medium Milch bestens adaptiert sind, stellen sie den Hauptbestandteil der Enterobakterienflora in Milch dar (KLEEBERGER, 1979; BECKER und TERPLAN,

1987; ZANGERL, 2006a). Auch die eigenen Untersuchungen haben gezeigt, dass die in Frischkäse enthaltenen *Enterobacteriaceae*-Spezies überwiegend zur Gruppe der Coliformen gehörten und somit durch den Nachweis von Coliformen hinreichend erfasst werden. Im Bezug auf die Anzahl der positiven Proben wurde kein signifikanter Unterschied zwischen dem qualitativen Nachweis von *Enterobacteriaceae* und der quantitativen Bestimmung von Coliformen ($p > 0,05$) festgestellt. Lediglich für den Nachweis von *E. coli* unterschieden sich die Untersuchungsergebnisse signifikant ($p < 0,05$), was vermutlich auf die Durchführung zweier Anreicherungs-schritte für den qualitativen Nachweis von *Enterobacteriaceae* zurückzuführen ist, wodurch geschädigte Mikroorganismen besser erfasst werden. Die Berücksichtigung des Arbeits-, Zeit- und Materialaufwands zeigt, dass der Nachweis von *Enterobacteriaceae* gemäß DIN EN ISO-Norm 21528-1:2004 nicht nur einen größeren Zeitaufwand (mindestens 72 h) erforderte, sondern auch einen erheblich höheren Arbeits- und Materialaufwand, wohingegen die Direktbeimpfung der Medien gemäß L 01.00-54 bzw. L 01.00-3 für die Bestimmung von Coliformen in der Regel schon nach 24 h ein vorläufiges Ergebnis lieferte. Der Aufwand für die Bestätigungsreaktionen hing von den verwendeten Nährmedien ab. Da sich bei dem Probenmaterial Frischkäse die Beurteilung der Fluoreszenz oft schwierig gestaltete, ist in diesem Fall einem chromogenen Nährmedium der Vorzug zu geben.

Generell haben die eigenen Untersuchungen gezeigt, dass zur Beurteilung der mikrobiologischen Qualität von Frischkäse der Nachweis von *E. coli* weiterhin durchgeführt werden sollte. Darüber hinaus sollte aber auch die Überprüfung des Gesamtgehaltes von *Enterobacteriaceae* bzw. Coliformen miteinbezogen werden, wobei die Untersuchungen gezeigt haben, dass der Nachweis von Coliformen einen ausreichenden Untersuchungsparameter zur Beurteilung der Produktions- und Verarbeitungs-hygiene darstellt.

5.2.4 Qualitativer Nachweis von *L. monocytogenes*

Die Überprüfung des Vorkommens von *L. monocytogenes* in 125 Frischkäsen bzw. Frischkäsezubereitungen ergab für alle Proben ein negatives Ergebnis. In drei Proben (2,4 %) wurde *L. innocua* nachgewiesen. Zwar zählt *L. innocua* zu den apathogenen Spezies, aber der Nachweis dieses Organismus zeigt Mängel in der Herstellungshygiene an

und kann ein Hinweis auf eine mögliche Kontamination mit *L. monocytogenes* sein, denn *L. innocua* stellt die gleichen Wachstumsansprüche und zeigt ein gleich häufiges Vorkommen in der Umwelt und erfüllt somit die Funktion eines Markerorganismus für *L. monocytogenes* (HAHN und HAMMER, 1990; GREENWOOD *et al.*, 1991; FEDIO und JACKSON, 1992).

Das für *L. monocytogenes* unter dem Aspekt der Lebensmittelsicherheit positiv zu bewertende Ergebnis dieser Arbeit entspricht den Untersuchungen von MASSA *et al.* (1990), KOZAK *et al.* (1996), HAHN *et al.* (1999b), SILVA *et al.* (2003) und DE REU *et al.* (2004). Dagegen sind in der Literatur jedoch auch Kontaminationsraten von bis zu 10 % für Frischkäse aus pasteurisierter Milch bzw. von bis 12,5 % für Frischkäse aus Rohmilch beschrieben worden. SALTIJERAL *et al.* (1999) wiesen sogar bei 15 % der untersuchten Frischkäse *L. monocytogenes* nach, allerdings wurde bei diesen Käsen die Milch nicht ordnungsgemäß pasteurisiert und es wurden keine Starterkulturen zur Herstellung verwendet. Da Rohmilch zumindest gelegentlich eine Kontamination mit *L. monocytogenes* aufweist, kann die Herstellung in einigen Fällen bereits mit einer gewissen Grundbelastung beginnen, weshalb der Pasteurisation wesentliche Bedeutung zukommt, um den Listerien-Gehalt zu kontrollieren. Mit dem Wegfall des Wärmebehandlungsgebots für Frischkäse (Verordnung zur Durchführung von Vorschriften des gemeinschaftlichen Lebensmittelhygienerechts vom 8. August 2007) können Rohmilchfrischkäse auch außerhalb der Direktvermarktung angeboten werden. In Anbetracht der Fähigkeit von *L. monocytogenes* im sauren Milieu und bei Kühltemperaturen zu überdauern sowie der kurzen Reifezeit und dem hohen Wassergehalt von Frischkäse, ist dies sehr kritisch zu beurteilen. Auch GREENWOOD *et al.* (1991), KOZAK *et al.* (1996), KRÜGER (2000), DE REU *et al.* (2004) und VITAS *et al.* (2004) sind der Auffassung, dass die Kontaminationsgefahr bei Käse aus Rohmilch deutlich höher ist und nur eine ordnungsgemäß durchgeführte Pasteurisation (vorausgesetzt es findet keine Rekontamination statt) die Sicherheit des Produktes gewährleistet. So sind es auch Frischkäse aus Rohmilch bzw. aus rekontaminierter pasteurisierter Milch gewesen, die in der Literatur als Ursache für Listeriose-Fälle beschrieben wurden. Zwar schätzen RAMASWAMY *et al.* (2007) sowie SWAMINATHAN und GERNER-SMIDT (2007) das Risiko einer Listeriose durch Frischkäse als gering ein, da jedoch eine Vermehrung von *L. monocytogenes* in Frischkäse stattfinden kann und die Infektionsdosis variieren kann, ist fraglich ob ein Grenzwert von 100 KbE/g für *L. monocytogenes* gemäß VO (EG) Nr.

2073/2005 ein ausreichendes Sicherheitskriterium darstellt. Zudem ist auch das Image von Frischkäse als wertvolles und gesundes Lebensmittel zu berücksichtigen. Daher sollte in der Praxis eine Nulltoleranz für *L. monocytogenes* in Frischkäse angestrebt werden, auch wenn dies möglicherweise nicht immer und in allen Fällen realisierbar ist.

5.2.5 Quantitative Bestimmung Koagulase-positiver Staphylokokken

Von den 70 Frischkäsen bzw. Frischkäsezubereitungen, die zur quantitativen Bestimmung von Koagulase-positiven Staphylokokken herangezogen worden waren, ergab lediglich eine Probe (1,4 %) einen positiven Nachweis von *S. aureus*. Der ermittelte Keimgehalt für *S. aureus* lag bei $4,0 \times 10^1$ KbE/g. Dies entsprach zwar einer Überschreitung des Schwellenwertes $m = 10$ KbE/g gemäß VO (EG) Nr. 2073/2005, allerdings muss bei diesem Keimgehalt die Produktion von Enterotoxinen nicht in Betracht gezogen werden ($< 10^5$ KbE/g).

Durchschnittlich sind 4,8 % der Staphylokokken-Intoxikationen auf Milch und Milcherzeugnisse zurückzuführen (SCVPH, 2003a). Bisher existieren jedoch nicht viele Berichte über Intoxikationen durch Frischkäse. SIMEÃO DO CARMO *et al.* (2002) berichteten über 50 Krankheitsfälle durch den Verzehr von hausgemachtem Frischkäse, der vermutlich aus roher Kuhmilch hergestellt worden war. Die Autoren nehmen an, dass dieser durch die herstellenden Personen kontaminiert worden war. Die Kontaminationshöhe lag bei mehr als $> 10^8$ KbE/g, es wurden die Toxine SEA, SEB und SEC nachgewiesen.

S. aureus ist ubiquitär verbreitet und einer der häufigsten Mastitiserreger (DE BUYSER *et al.*, 2001; JØRGENSEN *et al.*, 2005a). Rohe Kuhmilch kann Kontaminationsraten von bis zu 87 % (Ziegenmilch bis zu 96 %) und Keimgehalte von $> 10^3$ KbE/g für *S. aureus* aufweisen, wobei jedoch im Normalfall von deutlich niedrigeren Keimzahlen ausgegangen werden kann. Bei der Frischkäse-Herstellung wird der *S. aureus*-Gehalt vor allem durch die Wärmebehandlung und die Zugabe von Starterkulturen kontrolliert. In der Literatur sind dementsprechend für Rohmilch-Frischkäse hohe Kontaminationsraten von bis zu 75 % beschrieben und sogar Keimgehalte von über 10^6 KbE/g festgestellt worden. Frischkäse aus pasteurisierter Milch war zumeist negativ für *S. aureus* (RENYE *et al.*,

2008) oder wies Keimgehalte von $< 10^2$ KbE/g (LITTLE *et al.*, 2008) auf. Dies zeigt, dass die Wärmebehandlung deutlich zur Keimzahlreduktion beiträgt. Zwar stellten OLARTE *et al.* (1999) bei Frischkäsen aus pasteurisierter Milch auch höhere Keimgehalte ($> 10^4$ KbE/g) fest, allerdings wurden diese Käse ohne Verwendung von Starterkulturen hergestellt. Untersuchungen von ZÁRATE *et al.* (1997) zeigten, dass bei Frischkäsen ohne Starterkulturen in den ersten zwei Tagen nach Herstellung der Keimgehalt um bis zu drei Zehnerpotenzen anstieg und erst danach abfiel. In dieser Zeit können bereits kritische Keimgehalte erreicht werden, bei denen die Produktion von Enterotoxinen möglich ist. HAMAMA *et al.* (2002) beobachteten, dass in Frischkäsen mit Starterkulturen ein schnellerer Abfall des Keimgehaltes stattfindet und die Toxinproduktion gehemmt wird. Erst ab einer Kontaminationshöhe von 10^5 KbE/g wurde kein Unterschied zwischen Käsen festgestellt, die mit oder ohne Starterkulturen hergestellt worden waren. Starterkulturen hemmen *S. aureus* nicht nur durch die Produktion von Milchsäure, antimikrobiellen Substanzen oder durch die Absenkung des pH-Wertes, sondern auch durch die Nährstoffkonkurrenz. So kann *S. aureus* in seinem Wachstum nur schlecht mit anderen Keimen konkurrieren (HAINES und HARMON, 1973, GENIGEORGIS, 1989; GILMOUR und HARVEY, 1990). In diesem Zusammenhang ist bemerkenswert, dass in der vorliegenden Arbeit die einzige Probe, die *S. aureus* enthielt, für keinen der anderen geprüften mikrobiologischen Parameter einen positiven Befund ergab und somit wahrscheinlich nur eine geringe Konkurrenzflora für *S. aureus* aufwies. So kann der Grund für die geringe Nachweisrate von *S. aureus* in den untersuchten Frischkäsen neben der Pasteurisation und dem niedrigen pH-Wert (durchschnittlich pH 4,67) auch das häufig festgestellte Vorkommen von *Enterobacteriaceae* (Konkurrenzflora) gewesen sein.

5.3 Schlussfolgerungen

Frischkäse ist eines derjenigen Milcherzeugnisse, für die aufgrund ihrer tatsächlichen ernährungsphysiologischen Wertigkeit und ihres positiven Images beim Verbraucher erhebliche und seit Jahren steigende Verzehrsmengen festgestellt werden. Rund ein Drittel der in Deutschland produzierten Käsemenge entfällt auf Frischkäse, der Pro-Kopf-Verzehr liegt bei rund 10 kg/Jahr. Da wie kaum bei einem anderen Lebensmittel ein relativ hoher Verzehr auch durch Risikogruppen (Schwangere, immunsupprimierte Personen) postuliert werden kann, haben potentielle mikrobielle Risiken in Frischkäse besondere Relevanz.

Aufgrund des dynamischen Marktgeschehens werden auch im Bereich der Frischkäse ständig neue Erzeugnisse bzw. Zubereitungen in den Verkehr gebracht, wodurch eine kontinuierliche Bewertung möglicher Risiken erforderlich wird. Zudem sind veränderte Verbrauchergewohnheiten zu verzeichnen, die insbesondere im Bereich der Frischkäsezubereitungen zu einem enorm verbreiterten Angebot geführt haben.

Unter diesen Gesichtspunkten ist die in den eigenen Untersuchungen festgestellte geringe Belastung mit *Enterobacteriaceae* und *S. aureus* bzw. die Freiheit von *L. monocytogenes* als sehr erfreulich zu bewerten. Trotz des insbesondere in „mediterranen“ Frischkäsezubereitungen unter Verwendung von Gemüsezusätzen (Paprika, Tomaten) bzw. (Kraut-)gewürzen erhöhten Risikos eines Eintrags von *Enterobacteriaceae* waren unabhängig von der Herstellungsweise und Vermarktungsform zumeist nur sehr geringe Gehalte an *Enterobacteriaceae* feststellbar. Ein wichtiger Aspekt hierbei dürfte der pH-Wert dieser Erzeugnisse sein, der in der Regel deutlich unterhalb des für eine Vermehrung von *Enterobacteriaceae* liegenden Bereichs lag. Zudem ist trotz einer relativen Liberalisierung des neuen EU-Rechts bezüglich der Wärmebehandlung von Milch bei der Herstellung von Frischkäse die Verwendung von Rohmilch nach wie vor die große Ausnahme. Sollten sich hier in der Zukunft Änderungen ergeben, so wäre auch im Hinblick auf *S. aureus*-Enterotoxine, Verotoxin-bildene *E. coli* und *L. monocytogenes* eine Neubewertung der Risiken erforderlich.

6 ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden im Jahr 2007 in Hessen (Deutschland) insgesamt 125 aus pasteurisierter Milch hergestellte Frischkäseproben auf ihre mikrobiologische Beschaffenheit untersucht. Keine der Proben wies gemäß VO (EG) Nr. 2073/2005 und den Empfehlungen der Kommission 2004/24/EC und 2005/175/EC Mängel hinsichtlich der mikrobiologischen Qualität auf.

Der qualitative Nachweis von *Enterobacteriaceae* in Anlehnung an die ISO-Norm 21528-1 ergab für 55 Proben (44 %) einen positiven Befund. Die quantitative Bestimmung von coliformen Keimen in Anlehnung an die Methoden L 01.00-54 und L 01.00-3 der ASUV nach § 64 LFGB ergab für 41 Proben (33 %) einen positiven Befund. Die Mehrzahl der positiven Proben (88 %) wies einen niedrigen Keimgehalt auf ($< 10^2$ KbE/g), der maximale Keimgehalt lag bei $3,4 \times 10^4$ KbE/g. Eine Kontamination mit *Enterobacteriaceae* bzw. coliformen Keimen wurde häufiger bei unverpackt angebotenen Proben festgestellt (70 % bzw. 56 % positiv), die in der Mehrzahl der Fälle im Einzelhandel oder auf dem Wochenmarkt erworben worden waren. Frischkäse mit Zutaten (Paprika, Tomate, Gewürze) waren häufiger positiv für *Enterobacteriaceae* bzw. coliforme Keime. Die am häufigsten nachgewiesenen *Enterobacteriaceae*-Spezies waren *Enterobacter cloacae* (30 % der Proben), *Klebsiella pneumoniae* ssp. *pneumoniae* (19 %), *Escherichia coli* (14 %), *Serratia liquefaciens*, *Pantoea agglomerans* (beide 13 %) und *Klebsiella oxytoca* (10 %).

E. coli wurde in 17 Proben (14 %) nachgewiesen, der maximale Keimgehalt lag bei $9,5 \times 10^1$ KbE/g. Eine Überprüfung von 48 *E. coli*-Isolaten aus diesen Proben auf das Vorkommen der Gene *stx1* und *stx2* ergab keinen Hinweis auf Verotoxin-bildende *E. coli*.

Listeria monocytogenes war in keiner Probe nachweisbar. Lediglich in drei Proben (2,4 %) wurde *L. innocua* nachgewiesen. Koagulase-positive Staphylokokken wurden in einer Probe (1,4 %) nachgewiesen ($4,0 \times 10^1$ KbE/g).

Für fünf Frischkäsezubereitungen wurde die Veränderung des Gehaltes an *Enterobacteriaceae* während der Lagerung über 7 Tage bei +6 °C geprüft. Bei allen Proben wurde eine Reduktion des Keimgehaltes um ein bis zwei Zehnerpotenzen festgestellt.

Für den qualitativen Nachweis von *Enterobacteriaceae* wurde in Anlehnung an die ISO-Norm 21528-1 gemäß VO (EG) Nr. 2073/2005 der VRBG-Agar verwendet. Ein Vergleich mit einem neueren Selektivnährmedium (ECC-Agar) zeigte, dass der ECC-Agar bezüglich der Nachweisbarkeit gleichwertig war und zudem auch noch eine eindeutigere Identifizierung von *E. coli* ermöglichte.

Für die quantitative Bestimmung von coliformen Keimen bzw. *E. coli* wurden in Anlehnung an die Methoden L 01.00-54 und L 01.00-3 der ASUV nach § 64 LFGB die LST-MUG-Bouillon und der VRB-MUG-Agar verwendet. Zusätzlich wurde der ECC-Agar eingesetzt. Es wurde gezeigt, dass der ECC-Agar sich als alternatives Selektivnährmedium für Nachweis von coliformen Keimen eignet. Die Verwendung der LST-MUG-Bouillon ergab für 41 Proben (33 %), der ECC-Agar für 34 Proben (27 %) und der VRB-MUG-Agar für 28 Proben (22 %) einen positiven Befund. Im Bezug auf die Nachweishäufigkeit der verschiedenen Coliformen-Spezies unterschieden sich die geprüften Medien meist nicht wesentlich. Deutliche Unterschiede wurden jedoch für den Nachweis von *E. coli* festgestellt.

Für den qualitativen Nachweis von *Enterobacteriaceae* wurde eine Voranreicherung (nicht-selektiv und selektiv) durchgeführt, für die quantitative Bestimmung von coliformen Keimen wurden die Nährmedien direkt beimpft. Nach Durchführung einer Voranreicherung waren 55 Proben positiv für *Enterobacteriaceae*, nach Direktbeimpfung nur 41 Proben. Das Spektrum der nachgewiesenen *Enterobacteriaceae*-Spezies war weitestgehend ähnlich, die Nachweisrate einzelner Spezies unterschied sich jedoch. Für den Anteil der *E. coli*-positiven Proben nach Direktbeimpfung (sieben Proben) und nach Voranreicherung (17 Proben) wurde ein signifikanter Unterschied festgestellt ($p < 0,05$).

Generell war die mikrobiologische Qualität der untersuchten Frischkäse als zufriedenstellend zu beurteilen. Sowohl der Nachweis von coliformen Keimen als auch der Nachweis von *Enterobacteriaceae* eignet sich als Parameter zur Beurteilung der mikrobiologischen Qualität, auch wenn die derzeit gültige EU-Verordnung diese Parameter für Frischkäse nicht vorsieht.

7 SUMMARY

In this study, a total of 125 curd (fresh) cheese samples from retail shops in Hesse, Germany (all made from pasteurized milk) were examined during 2007, to study their microbiological quality. According to Commission Regulation (EC) No 2073/2005 and Commission Recommendations 2004/24/EC and 2005/175/EC none of these products was of unsatisfactory quality.

The detection of *Enterobacteriaceae* according to ISO 21528-1 gave a positive results for 55 of the fresh cheese samples (44 %). The enumeration of coliform bacteria, performed according to methods L 01.00-54 und L 01.00-3 of the German collection of analytical methods for food (ASUV) in accordance to article 64 of the German food and feed law (LFGB) gave positive results for 41 of the samples (33 %). However, the number of colony forming units (cfu) of these bacteria was very low ($< 10^2$ cfu/g) in most of the positive samples (88 %), the maximum number was 3.4×10^4 cfu/g. Contamination with *Enterobacteriaceae* and coliform bacteria was more frequent in cheese samples obtained as open slices from retail shop counters or from farmers' markets (70 % and 56 % positive, respectively). Furthermore, curd cheese with ingredients (paprika, tomato, spices) was more frequently contaminated with *Enterobacteriaceae* or coliform bacteria than curd cheese without other ingredients. The most abundant *Enterobacteriaceae* species were *Enterobacter cloacae* (30 % of the samples), *Klebsiella pneumoniae* ssp. *pneumoniae* (19 %), *Escherichia coli* (14 %), *Serratia liquefaciens*, *Pantoea agglomerans* (both 13 %), and *Klebsiella oxytoca* (10 %).

E. coli was identified in 17 samples (14 %), the maximum value was 9.5×10^1 cfu/g. The examination of 48 *E. coli*-isolates of these samples for the occurrence of *stx1* and *stx2* did show no indication for Verotoxin-building *E. coli*.

Listeria monocytogenes was not detected in any sample. Only three samples (2.4 %) were positive for *L. innocua*. Coagulase-positive staphylococci were detected in one (1.4 %) sample (4.0×10^1 cfu/g).

Five fresh cheese varieties were examined for the alteration of the *Enterobacteriaceae*-concentration during storage for 7 days at +6 °C. A reduction of the bacterial count about 1 log cfu/g to 2 log cfu/g was observed in all samples.

VRBG agar was used for the detection of *Enterobacteriaceae* according to ISO 21528-1 consistent with 2005/2073/EC. A comparison with a newer selective medium (ECC agar) showed that the ECC agar gave comparable results with regard to the detectability, and allowed identification of *E. coli*.

LST MUG broth and VRB MUG agar were used for the detection and enumeration of coliform bacteria and *E. coli* according to ASUV methods L 01.00-54 and L 01.00-3. Additionally, the ECC agar was used. The ECC agar was found to be a suitable alternative selective medium for the detection of coliform bacteria. The LST MUG broth gave a positive result for 41 samples (33 %), the ECC agar for 34 samples (27 %), and the VRB-MUG agar for 28 samples (22 %). With regard to the detection rate of different coliform species, the tested media were equivalent in most cases, but considerable differences were observed for the detection of *E. coli*.

For the qualitative detection of *Enterobacteriaceae*, pre-enrichment using non-selective and selective media was performed, while for the enumeration of coliform bacteria the media were directly inoculated. After pre-enrichment, 55 samples were positive for *Enterobacteriaceae*, after direct inoculation only 41 samples were positive. The range of detected *Enterobacteriaceae* species was similar, but the detection rate of some species was different. In particular for the number of *E. coli*-positive samples, a significant difference ($p < 0.05$) was observed between positive results after direct inoculation ($n = 7$) and pre-enrichment ($n = 17$).

Generally the microbiological quality of the examined fresh cheeses was satisfactory. The detection of coliform bacteria, as well as the detection of *Enterobacteriaceae* are both suitable parameters to estimate the microbiological quality of curd cheese, even though the current EU regulations do not demand these parameters to be implemented as a process hygiene criterion for curd cheese.

8 LITERATURVERZEICHNIS

AARESTRUP, F. M., H. D. LARSEN, N. H. ERIKSEN, C. S. ELSBERG und N. E. JENSEN (1999):

Frequency of alpha- and beta-haemolysin in *Staphylococcus aureus* of bovine and human origin. A comparison between pheno- and genotype and variation in phenotypic expression.

APMIS 107, 425-430

ADAMS, M. R. und L. NICOLAIDES (1997):

Review of the sensitivity of different foodborne pathogens to fermentation.

Food Control 8, 227-239

AKINEDEN, Ö., A. A. HASSAN, E. SCHNEIDER und E. USLEBER (2008):

Enterotoxigenic properties of *Staphylococcus aureus* isolated from goats' milk cheese.

Int. J. Food Microbiol. 124, 211-216

AMMON, A. (1997):

Surveillance of enterohaemorrhagic *E. coli* (EHEC) infections and haemolytic uraemic syndrome (HUS) in Europe.

Euro Surveillance 2, 91-96

AROCHA, M. M., M. Mcvey, S. D. LODER, J. H. RUPNOW und L. BULLERMANN (1992):

Behavior of hemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 during the manufacture of cottage cheese.

J. Food Prot. 55, 379-381

ASAO, T., Y. KUMEDA, T. KAWAI, T. SHIBATA, H. ODA, K. HARUKI, H. NAKAZAWA und S. KOZAKI (2003):

An extensive outbreak of staphylococcal food poisoning due to low-fat milk in Japan: estimation of enterotoxin A in the incriminated milk and powdered skim milk.

Epidemiol. Infect. 130, 33-40

ASPERGER, H. (1991):

Zur Bedeutung des Kriteriums *Staphylococcus aureus* in Käse.

Milchwirtschaftl. Berichte 108, 138-144

BACHMANN, H. P. und U. SPAHR (1995):

The fate of potentially pathogenic bacteria in swiss hard and semihard cheeses made from raw milk.

J. Dairy Sci. 78, 476-483

BALABAN, N. und A. RASOOLY (2000):

Staphylococcal enterotoxins.

Int. J. Food Microbiol. 61, 1-10

BAUMGART, J. (1994):

Familie *Enterobacteriaceae*.

In: BAUMGART, J. und B. BECKER (Herausgeber): Mikrobiologische Untersuchungen von Lebensmitteln, 12. Akt.-Lfg., 3-7, Behr's Verlag, Hamburg

BEALES, N. (2003):

Adaptation of microorganisms to cold temperatures, weak acid preservatives, low pH, and osmotic stress: a review.

CRFSFS 3, 1-20

BEARSON, S., B. BEARSON und J. W. FOSTER (1997):

Acid stress responses in enterobacteria.

FEMS Microbiol. Lett. 147, 173-180

BECKER, H. und G. TERPLAN (1987):

Bedeutung und Systematik von *Enterobacteriaceae* in Milch und Milchprodukten.

Dtsch. Molkereiz. 8, 204-210

BECKER, H., C. BÜRCK und E. MÄRTLBAUER (2007):

Staphylokokken-Enterotoxine: Bildung, Eigenschaften und Nachweis.

J. Verbr. Lebensm. 2, 171-189

BECKERS, H. J., P. S. S. SOENTORO und E. H. M. DELFGOU-VAN ASCH (1987):

The occurrence of *Listeria monocytogenes* in soft cheeses and raw milk and its resistance to heat.

Int. J. Food Microbiol. 4, 249-256

BELIČKOVÁ, E., L. TKÁČIKOVÁ, H. T. NAAS, M. VARGOVÁ, M. ONDRAŠOVIČ, O. ONDRAŠOVIČOVÁ, D. OBŠITNÍKOVÁ und L. TÓTH (2001):

Staphylococci plate counts in foods of milk origin.

Vet. Med. - Czech. 46, 24-27

BENNETT, R. W. und M. R. BERRY, JR. (1987):

Serological reactivity and in vivo toxicity of *Staphylococcus aureus* enterotoxins A and D in selected canned foods.

J. Food Sci. 52, 416-419

BERGDOLL, M. S., I.-Y. HUANG und E. J. SCHANTZ (1974):

Chemistry of the staphylococcal enterotoxins.

J. Agr. Food Chem. 22, 9-13

BEUTIN, L. (1991):

Erregerspektrum pathogener *Escherichia coli*: Bedeutung, Erkennung und Gefährdungspotential.

Bundesgesundhbl. 5, 216-219

BHAKDI, S. und J. TRANUM-JENSEN (1991):

Alpha-Toxin of *Staphylococcus aureus*.

Microbiol. Rev. 55, 733-751

- BILLE, J. und M. P. DOYLE (1991):
Chapter 32: *Listeria* and *Erysipelothrix*.
In: BALOWS, A. (Herausgeber): Manual of clinical microbiology, 5. Aufl., 287-295,
American Society for Microbiology, Washington D. C.
- BLOBEL, H. und T. SCHLIESSER (1994):
Staphylokokken-Infektionen und -Enterotoxine.
In: BLOBEL, H. und T. SCHLIESSER (Herausgeber): Handbuch der bakteriellen
Infektionen bei Tieren, 2. Aufl., Bd. II/1, 1-268,
Gustav Fischer Verlag Jena, Stuttgart
- BLOOD, R. M. und G. D. W. CURTIS (1995):
Media for 'total' *Enterobacteriaceae*, Coliforms and *Escherichia coli*.
Int. J. Food Microbiol. 26, 93-115
- BODÉN, M. K. und J.-I. FLOCK (1989):
Fibrinogen-binding Protein/Clumping Factor from *Staphylococcus aureus*.
Infect. Immun. 57, 2358-2363
- BRENNER, D. J. (1986):
Section 5: Facultatively anaerobic gram-negative rods, Family I. *Enterobacteriaceae*.
In: SNEATH, P. H. A., N. S. MAIR, M. E. SHARPE und J. G. HOLT (Herausgeber):
Bergey's Manual[®] of Systematic Bacteriology, Vol. 1, 408-420,
Williams & Wilkins, Baltimore
- BROWN, J. L., T. ROSS, T. A. McMEEKIN und P. D. NICHOLS (1997):
Acid habituation of *Escherichia coli* and the potential role of cyclopropane fatty acids in
low pH tolerance.
Int. J. Food Microbiol. 37, 163-173
- BUCHANAN, R. L. und M. P. DOYLE (1997):
Foodborne disease significance of *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohemorrhagic
E. coli.
Food Technol. 51, 69-76
- BUCKENHÜSKES, H. J. (2004):
Gewürze für die Herstellung von Käse.
Kieler Milchwirtschaftl. Forschungsberichte 56, 25-36
- BÜLTE, M. (2004):
Enterovirulente *Escherichia coli* (EVEC).
In: SINELL, H.-J. (Herausgeber): Einführung in die Lebensmittelhygiene, 4. Aufl., 33-37,
Parey Verlag, Stuttgart
- CARDOSO, H. F. T., N. SILVA, M. J. SENA und L. S. CARMO (1999):
Production of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin by *Staphylococcus aureus*
isolated from bovine mastitis in Brazil.
Letters in Applied Microbiology 29, 347-349

CARRIQUE-MAS, J. J., I. HÖKEBERG, Y. ANDERSSON, M. ARNEBORN, W. THAM, M.-L. DANIELSSON-THAM, B. OSTERMAN, M. LEFFLER, M. STEHEN, E. ERIKSSON, G. HEDIN und J. GIESECKE (2003):

Febrile gastroenteritis after eating on-farm manufactured fresh cheese - an outbreak of listeriosis?

Epidemiol. Infect. 130, 79-86

CATALDO, G., M. P. CONTE, F. CHIARINI, L. SEGANTI, M. G. AMMENDOLIA, F. SUPERTI und C. LONGHI (2007):

Acid adaptation and survival of *Listeria monocytogenes* in Italian-soft cheeses.

J. Appl. Microbiol. 103, 185-193

CDC (Centers for disease control and prevention) (1988):

Epidemiologic notes and reports update - listeriosis and pasteurized milk.

MMWR Weekly, 37, 764-766

CENCI-GOGA, B. T., M. KARAMA, P. V. ROSSITTO, R. A. MORGANTE und J. S. CULLOR (2003):

Enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* isolated from mastitis cows.

J. Food Prot. 66, 1693-1696

CHARLIER, C., S. EVEN, M. GAUTIER und Y. LE LOIR (2008):

Acidification is not involved in the early inhibition of *Staphylococcus aureus* growth by *Lactococcus lactis* in milk.

Int. Dairy J. 18, 197-203

COENEN, C. (2000):

Untersuchungen zum Vorkommen und zur Risikoeinschätzung pathogener Keime in Rohmilch und Rohmilchprodukten aus der Direktvermarktung.

Diss. Med. Vet. Berlin

COIA, J. E., Y. JOHNSTON, N. J. STEERS und M. F. HANSON (2001):

A survey of the prevalence of *Escherichia coli* O157 in raw meats, raw cow's milk and raw-milk cheeses in south-east Scotland.

Int. J. Food Microbiol. 66, 63-69

COTTON, L. N. und C. H. WHITE (1992):

Listeria monocytogenes, *Yersinia enterocolitica*, and *Salmonella* in dairy plant environments.

J. Dairy Sci. 75, 51-57

CUMMINS, A. J., A. K. FIELDING und J. McLAUHLIN (1994):

Case report: *Listeria ivanovii* infection in a patient with AIDS.

J. Infect. 28, 89-91

DAHLÉN, G. und A. LINDE (1973):

Screening plate method for detection of bacterial β -Glucuronidase.

Appl. Microbiol. 26, 863-866

- DE BUYSER, M.-L., B. DUFOUR, M. MAIRE und V. LAFARGE (2001):
Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialised countries.
Int. J. Food Microbiol. 67, 1-17
- DE REU, K., W. DEBEUCKELAERE, N. BOTTELDOORN, J. DE BLOCK und L. HERMAN (2002):
Hygienic parameters, toxins and pathogen occurrence in raw milk cheeses.
J. Food Safety 22, 183-196
- DE REU, K., K. GRIJSPEERDT und L. HERMAN (2004):
A belgian survey of hygiene indicator bacteria and pathogenic bacteria in raw milk and direct marketing of raw milk farm products.
J. Food Safety 24, 17-36
- DESCHÊNES, G., C. CASENAVE, F. GRIMONT, J. C. DESENCLOS, S. BENOIT, M. COLLIN, S. BARON, P. MARIANI, P. A.-D. GRIMONT und H. NIVET (1996):
Cluster of cases of haemolytic uraemic syndrome due to unpasteurised cheese.
Pediatr. Nephrol. 10, 203-205
- DESMASURES, N., F. BAZIN und M. GUÉGUEN (1997):
Microbiological composition of raw milk from selected farms in the Camembert region of Normandy.
J. Appl. Microbiol. 83, 53-58
- DESTRO, M. T., A. DE MELO SERRANO und D. Y. KABUKI (1991):
Isolation of *Listeria* species from some Brazilian meat and dairy products.
Food Control 2, 110-112
- DGHM - Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (2007):
Veröffentliche mikrobiologische Richt- und Warnwerte zur Beurteilung von Lebensmitteln (Stand: November 2007)
In: <http://www.lm-mibi.uni-bonn.de/DGHM.html>; letztes Abrufdatum: 01.07.2008
- DINGES, M. M., P. M. ORWIN und P. M. SCHLIEVERT (2000):
Exotoxins of *Staphylococcus aureus*.
Clin. Microbiol. Rev. 13, 16-34
- DOGANAY, M. (2003):
Listeriosis: Clinical presentation.
FEMS Immunol. Med. Microbiol. 35, 173-175
- DOMÍNGUEZ RODRIGUEZ, L., J. F. FERNÁNDEZ GARAYZABAL, J. A. VAZQUEZ BOLAND, E. R. FERRI und G. S. FERNÁNDEZ (1985):
Isolation de micro-organismes du genre *Listeria* à partir de lait cru destiné à la consommation humaine.
Can. J. Microbiol. 31, 938-941

DOYLE, M. P., K. A. GLASS, J. T. BEERY, G. A. GARCIA, D. J. POLLARD und R. D. SCHULTZ (1987):

Survival of *Listeria monocytogenes* in milk during high-temperature, short-time pasteurization.

Appl. Environ. Microbiol. 53, 1433-1438

DURCH, J., T. RINGHAND, K. MANNER, M. BARNETT, M. PROCTOR, M. S. AHRABI-FARD, J. DAVIS und D. BOXURD (2000):

Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection associated with eating fresh cheese curds - Wisconsin, June 1998.

MMWR 49, 911-912

EDBERG, S. C. und C. M. KONTNICK (1986):

Comparison of β -Glucuronidase-based substrate systems for identification of *Escherichia coli*.

J. Clin. Microbiol. 24, 368-371

ESPIÉ, E., V. VAILLANT, P. MARIANI-KURKDJIAN, F. GRIMONT, R. MARTIN-SCHALLER, H. DE VALK und C. VERNOZY-ROZAND (2006):

Escherichia coli O157 outbreak associated with fresh unpasteurized goats' cheese.

Epidemiol. Infect. 134, 143-146

EVENSON, M. L., M. W. HINDS, R. S. BERNSTEIN und M. S. BERGDOLL (1988):

Estimation of human dose of staphylococcal enterotoxin A from a large outbreak of staphylococcal food poisoning involving chocolate milk.

Int. J. Food Microbiol. 7, 311-316

FALEIRO, M. L., P. W. ANDREW und D. POWER (2003):

Stress response of *Listeria monocytogenes* isolated from cheese and other foods.

Int. J. Food Microbiol. 84, 207-216

FAO (Food and Agriculture organization of the United Nations) (2008):

Queijo Minas (Minas Cheese).

In: <http://www.fao.org/ag/aga/Publication/apah85/197.html>; letztes Abrufdatum: 01.07.2008

FARBER, J. M. und P. I. PETERKIN (1991):

Listeria monocytogenes, a food-borne pathogen.

Microbiol. Rev. 55, 476-511

FARBER, J. M., G. W. SANDERS und S. A. MALCOLM (1988a):

The presence of *Listeria spp.* in raw milk in Ontario.

Can. J. Microbiol. 34, 95-100

FARBER, J. M., G. W. SANDERS, J. I. SPEIRS, J.-Y. D'AOUST, D. B. EMMONS und R. McKELLAR (1988b):

Thermal resistance of *Listeria monocytogenes* in inoculated and naturally contaminated raw milk.

Int. J. Food Microbiol. 7, 277-286

FARMER III, J. J. und M. T. KELLY (1992):

Chapter 36: *Enterobacteriaceae*.

In: BALOWS, A. (Herausgeber): Manual of Clinical Microbiology, 5. Aufl., 360-383, American Society for Microbiology, Washington, D.C.

FARMER III, J. J., R. D. DAVIES, F. W. HICKMAN-BRENNER, A. McWORTHER, G. P. HUNTLEY-CARTER, M. A. ASBURY, C. RIDDLE, H. G. WATHEN-GRADY, C. ELIAS, G. R. FANNING, A. G. STEIGERWALT, C. M. O'HARA, G. K. MORRIS, P. B. SMITH und D. J. BRENNER (1985):

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

J. Clin. Microbiol. 21, 46-76

FDA (2003):

Quantitative assessment of relative risk to public health from foodborne *Listeria monocytogenes* among selected categories of ready-to-eat foods.

In: <http://www.foodsafety.gov/~dms/lmrisk.html>; letztes Abrufdatum: 01.07.2008

FEDIO, W. M. und H. JACKSON (1992):

On the origin of *Listeria monocytogenes* in raw bulk-tank milk.

Int. Dairy J. 2, 197-208

FENG, P. C. S. und P. A. HARTMAN (1982):

Fluorogenic assays for immediate confirmation of *Escherichia coli*.

Appl. Environ. Microbiol. 43, 1320-1329

FENLON, D. R. und J. WILSON (1989):

The incidence of *Listeria monocytogenes* in raw milk from farm bulk tanks in North-East Scotland.

J. Appl. Bacteriol. 66, 191-196

FENLON, D. R., T. STEWART und W. DONACHIE (1995):

The incidence, numbers and types of *Listeria monocytogenes* isolated from farm bulk tank milks.

Lett. Appl. Microbiol. 20, 57-60

FERNÁNDEZ GARAYZÁBAL, J. F., L. DOMÍNGUEZ RODRÍGUEZ, J. A. VÁZQUEZ BOLAND, J. L. BLANCO CANCELO und G. SUÁREZ FERNÁNDEZ (1986):

Listeria monocytogenes dans le lait pasteurisé.

Can. J. Microbiol. 32, 149-150

FERNANDEZ-ALBALAT, M. P., A. COBOS, M. A. FERNANDEZ und J. MENDEZ (2003):

Influence of ultrafiltration and subsequent treatments of curd on the microbiological characteristics of the acid fresh cheese Cebreiro.

Milchwissenschaft 58, 41-43

FINNEY, M., J. SMULLEN, H. A. FOSTER, S. BROKX und D. M. STOREY (2003):

Evaluation of chromocult coliform agar for the detection and enumeration of *Enterobacteriaceae* from faecal samples from healthy subjects.

J. Microbiol. Methods 54, 353-358

FOSTER, J. W. (2004):

Escherichia coli acid resistance: tales of an amateur acidophile.
Nat. Rev. Microbiol. 2, 898-907

FSAI - Food Safety Authority of Ireland (2005):

Bacteriological safety of cheeses made from pasteurised milk.
In: http://www.fsai.ie/surveillance/food_safety/microbiological/cheeses_bacteriological_05.pdf; letztes Abrufdatum: 01.07.2008

G+J MEDIA SALES (2007):

Marktanalyse Käse.
In: <http://www.sub.uni-hamburg.de/e-pub/volltexte/2008/230/pdf.Kaese.pdf>; letztes
Abrufdatum: 01.07.2008

GAHAN, C. G. M., B. O'DRISCOLL und C. HILL (1996):

Acid adaptation of *Listeria monocytogenes* can enhance survival in acidic foods and during milk fermentation.
Appl. Environ. Microbiol. 62, 3128-3132

GALDIERO, E., M. D'ISANTO und F. ALIBERTI (1997):

Effect of saline concentration, pH and growth temperature on the invasive capacity of *Listeria monocytogenes*.
Res. Microbiol. 148, 305-313

GARRITY, G. M., J. A. BELL und T. G. LILBURN (2004):

Taxonomic outline of the prokaryotes Bergey's Manual[®] of systematic bacteriology, Second Edition.
In: http://141.150.157.80/bergeysoutline/outline/bergeysoutline_5_2004.pdf; letztes
Abrufdatum: 01.07.2008

GAYA, P., J. SANCHEZ, M. MEDINA und M. NUÑEZ (1998):

Incidence of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* species in raw milk produced in Spain.
Food Microbiol. 15, 551-555

GEISSLER, K., M. MANAFI, I. AMORÓS und J. L. ALONSO (2000):

Quantitative determination of total coliforms and *Escherichia coli* in marine waters with chromogenic and fluorogenic media.
J. Appl. Microbiol. 88, 280-285

GENIGEORGIS, C. A. (1989):

Present state of knowledge on staphylococcal intoxication.
Int. J. Food Microbiol. 9, 327-360

GILMOUR, A. und M. T. ROWE (1981):

Micro-organisms associated with milk: Family *Enterobacteriaceae*.
In: ROBINSON, R. K. (Herausgeber): Dairy Microbiology, Vol. 1: The microbiology of milk, 39-42,
Applied Science Publishers, England

- GILMOUR, A. und J. HARVEY (1990):
Staphylococci in milk and milk products.
Soc. Appl. Bacteriol. Symp. Ser. 19, 147S-166S
- GONZÁLEZ, R. D., L. M. TAMAGNINI, P. D. OLMOS und G. B. DE SOUSA (2003):
Evaluation of a chromogenic medium for total coliforms and *Escherichia coli*
determination in ready-to-eat foods.
Food Microbiol. 20, 601-604
- GOODSON, M. und R. J. ROWBURY (1989):
Resistance of acid-habituated *Escherichia coli* to organic acids and its medical and applied
significance.
Lett. Appl. Microbiol. 8, 211-214
- GORDEN, J. und P. L. C. SMALL (1993):
Acid resistance in enteric bacteria.
Infect. Immun. 61, 364-367
- GRAY, M. L. und A. H. KILLINGER (1966):
Listeria monocytogenes and listeric infections.
Bacteriol. Rev. 30, 309-382
- GREENWOOD, M. H., D. ROBERTS und P. BURDEN (1991):
The occurrence of *Listeria* species in milk and dairy products: a national survey in England
and Wales.
Int. J. Food Microbiol. 12, 197-206
- GROSS, R. J. und B. HOLMES (1983):
Chapter 33: The *Enterobacteriaceae*.
In: PARKER, M. T. (Herausgeber): Topley and Wilson's principles of bacteriology,
virology and immunity, 7. Aufl., Vol. 2: Systematic bacteriology, 272-284,
Edward Arnold, London
- GUARINO, A., G. CAPANO, B. MALAMISURA, M. ALESSIO, S. GUANDALINI und
A. RUBINO (1987):
Production of *Escherichia coli* STa-like heat-stable enterotoxin by *Citrobacter freundii*
isolated from humans.
J. Clin. Microbiol. 25, 110-114
- GUARINO, A., S. GUANDALINI, M. ALESSIO, F. GENTILE, L. TARALLO,
G. CAPANO, M. MIGLIAVACCA und A. RUBINO (1989):
Characteristics and mechanism of action of a heat-stable enterotoxin produced by
Klebsiella pneumoniae from infants with secretory diarrhea.
J. Clin. Microbiol. 25, 514-518
- GYLES, C. L. (2007):
Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: An overview.
J. Anim. Sci. 85 (E. Suppl.), E45-E62

- HAHN, G. und P. HAMMER (1990):
Listerien-freie Käse - höhere Sicherheit für den Verbraucher.
Dtsch. Milchwirtschaft 33, 1120-1125
- HAHN, G., H. G. WALTE, C. COENEN und P. TEUFEL (1999a):
Direktvermarktung von Rohmilch: Befunde und Risikoerörterung.
Kieler Milchwirtschaftl. Forschungsberichte 51, 105-115
- HAHN, G., H. G. WALTE, C. COENEN und P. TEUFEL (1999b):
Direktvermarktung von Produkten aus Rohmilch: Befunde und Risikoerörterung.
Kieler Milchwirtschaftl. Forschungsberichte 51, 333-342
- HAINES, W. C. und L. G. HARMON (1973):
Effect of selected lactic acid bacteria on growth of *Staphylococcus aureus* and production of enterotoxin.
Appl. Microbiol. 25, 436-441
- HAMAMA, A., N. EL HANKOURI und M. EL AYADI (2002):
Fate of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in the presence of nisin-producing *Lactococcus lactis* strain during manufacture of Jben, a Moroccan traditional fresh cheese.
Int. Dairy J. 12, 933-938
- HANSEN, W. und E. YOURASSOWSKY (1984):
Detection of β -Glucuronidase in Lactose-fermenting members of the family *Enterobacteriaceae* and its presence in bacterial urine cultures.
J. Clin. Microbiol. 20, 1177-1179
- HARVEY, J. und A. GILMOUR (1992):
Occurrence of *Listeria* species in raw milk and dairy products produced in Northern Ireland.
J. Applied Bacteriol. 72, 119-125
- HAYES, P. S., J. C. FEELEY, L. M. GRAVES, G. W. AJELLO und D. W. FLEMING (1986):
Isolation of *Listeria monocytogenes* from raw milk.
Appl. Environ. Microbiol. 51, 438-440
- HAYES, P. S., K. BLOM, P. FENG, J. LEWIS, N. A. STROCKBRINE und B. SWAMINATHAN (1995):
Isolation and characterization of a β -D-Glucuronidase-producing strain of *Escherichia coli* serotype O157:H7 in the United States.
J. Clin. Microbiol. 33, 3347-3348
- HICKS, S. J. und B. M. LUND (1991):
The survival of *Listeria monocytogenes* in cottage cheese.
J. Appl. Bacteriol. 70, 308-314
- HOBBS, B. C. (1960):
Staphylococcal and *Clostridium welchii* food poisoning.
J. R. Soc. Health 80, 267-271

HOF, H. (1999):

Listeriose - Was Ärzte über Infektionsrisiken und Erkrankung wissen sollten.
Bundesgesundheitsbl. – Gesundheitsforsch. - Gesundheitsschutz 42, 558-561

HOF, H. (2003):

History and epidemiology of listeriosis.
FEMS Immunol. Med. Microbiol. 35, 199-202

HOF, H., K. SZABO und B. BECKER (2007):

Epidemiologie der Listeriose in Deutschland - im Wandel und dennoch nicht beachtet.
Dtsch. Med. Wochenschr. 132, 1343-1348

HOLMES, B. und R. J. GROSS (1983):

Chapter 34: Coliform bacteria; various other members of the *Enterobacteriaceae*.
In: PARKER, M. T. (Herausgeber): Topley and Wilson's principles of bacteriology,
virology and immunity, 7. Aufl., Vol. 2: Systematic bacteriology, 285-292,
Edward Arnold, London

HOLT, J. G., N. R. KRIEG, P. H. A. SNEATH, J. T. STALEY und S. T. WILLIAMS
(1994):

Group 5: Facultatively anaerobic gram-negative rods; Subgroup 1: Family
Enterobacteriaceae.

In: HOLT, J. G., N. R. KRIEG, P. H. A. SNEATH, J. T. STALEY und S. T. WILLIAMS
(Herausgeber): Bergey's Manual[®] of Determinative Bacteriology, 9. Aufl., 175-190,
Williams & Wilkins, Baltimore

HUDSON, L. M., J. CHEN, A. R. HILL und M. W. GRIFFITHS (1997):

Bioluminescence: A rapid indicator of *Escherichia coli* O157:H7 in selected yogurt and
cheese varieties.

J. Food Prot. 60, 891-897

HUSSEIN, H. S. und T. SAKUMA (2005):

Invited Review: Prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in dairy cattle and
their products.

J. Dairy Sci. 88, 450-465

HUSSONG, D., J. M. DAMARÉ, R. M. WEINER und R. R. COLWELL (1981):

Bacteria associated with false-positive most-probable-number coliform test results for
shellfish and estuaries.

Appl. Environ. Microbiol. 41, 35-45

IFT/FDA - Institute of Food Technologists/Food and Drug Administration (2003):

Chapter III: Factors that influence microbial growth.

CRFSFS 2 (s2), 21-32

JAYARAO, B. M. und L. WANG (1999):

A study on the prevalence of gram-negative bacteria in bulk tank milk.

J. Dairy Sci. 82, 2620-2624

- JAYARAO, B. M. und D. R. HENNING (2001):
Prevalence of foodborne pathogens in bulk tank milk.
J. Dairy Sci. 84, 2157-2162
- JEMMI, T. und R. STEPHAN (2006):
Listeria monocytogenes: food-borne pathogen and hygiene indicator.
Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 25, 571-580
- JENSEN, C., S. ETHELBERG, A. GERVELMEYER, E. M. NIELSEN, K. E. OLSEN und
K. MØLBAK (2006):
First general outbreak of Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* in Denmark.
Euro Surveill 11, 55-58
- JOLIVET-GOUGEON, A., T. TAMANAI-SHACOORI, F. SAUVAGER und
M. CORMIER (1997):
Production of *Escherichia coli* group I-like heat-labile enterotoxin by *Enterobacteriaceae*
isolated from environmental water.
Microbios. 90, 209-218
- JØRGENSEN, H. J., T. MØRK und L. M. RØRVIK (2005a):
The occurrence of *Staphylococcus aureus* on a farm with small-scale production of raw
milk cheese.
J. Dairy Sci. 88, 3810-3817
- JØRGENSEN, H. J., T. MØRK, H. R. HØGÅSEN und L. M. RØRVIK (2005b):
Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in bulk milk in Norway.
J. Appl. Bacteriol. 99, 158-166
- KABUKI, D. Y., A. Y. KUAYE, M. WIEDMANN und K. J. BOOR (2004):
Molecular subtyping and tracking of *Listeria monocytogenes* in Latin-Style fresh-cheese
processing plants.
J. Dairy Sci. 87, 2803-2812
- KAPER, J. B., J. P. NATARO und H. L. T. MOBLEY (2004):
Pathogenic *Escherichia coli*.
Nat. Rev. Microbiol. 2, 123-140
- KARASAWA, T., H. ITO, T. TSUKAMOTO, S. YAMASAKI, H. KURAZONO, S. M.
FARUQUE, G. BALAKRISH NAIK, M. NISHIBUCHI und Y. TAKEDA (2002):
Cloning and characterization of genes encoding homologues of the B subunit of Cholera
toxin and the *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin from clinical isolates of *Citrobacter*
freundii and *E. coli*.
Infect. Immun. 70, 7153-7155
- KASPAR, C. W., P. A. HARTMAN und A. K. BENSON (1987):
Coagglutination and enzyme capture tests for detection of *Escherichia coli*
 β -Galactosidase, β -Glucuronidase, and Glutamate Decarboxylase.
Appl. Environ. Microbiol. 53, 1073-1077

KASRAZADEH, M. und C. GENIGEORGIS (1995):

Potential growth and control of *Escherichia coli* O157:H7 in soft hispanic type cheese.
Int. J. Food Microbiol. 25, 289-300

KEENE, W. E., K. HEDBERG, D. E. HERRIOTT, D. D. HANCOCK, R. W. McKAY,
T. J. BARRETT und D. W. FLEMING (1997):

Prolonged outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections caused by commercially
distributed raw milk.

J. Infect. Dis. 176, 815-818

KESSLER, H. G. (1988):

Frischkäse.

In: KESSLER H. G. (Herausgeber): Lebensmittel- und Bioverfahrenstechnik-
Molkereitechnologie, 3. Aufl., 394-395,

Verlag A. Kessler, Freising

KLEEBERGER, A. (1979):

Enterobakterien in pasteurisierter Milch.

Dtsch. Molkereiz. 51, 1794-1796

KLOOS, W. E. und K. H. SCHLEIFER (1986):

Section 12: Genus IV. *Staphylococcus* Rosenbach 1884, 18AL.

In: SNEATH, P. H. A., N. S. MAIR, M. E. SHARPE und J. G. HOLT (Herausgeber):

Bergey's Manual[®] of Systematic Bacteriology, Vol. 2, 1013-1035,

Williams & Wilkins, Baltimore

KLOOS, W. E. und D. W. LAMBE, JR. (1991):

Chapter 28: *Staphylococcus*.

In: BALOWS, A. (Herausgeber): Manual of Clinical Microbiology, 5. Aufl., 222-237,
American Society for Microbiology, Washington, D.C.

KLUYTMANS, J., A. VAN BELKUM und H. VERBRUGH (1997):

Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: Epidemiology, underlying mechanisms, and
associated risks.

Clin. Microbiol. Rev. 10, 505-520

KNAPPSTEIN, K. und M. MÜLLER (1998):

Vorkommen toxinogener Stämme von *Staphylococcus (S.) aureus* und *Escherichia (E.) coli*
in Milch und Milchprodukten und Entwicklung eines Nachweissystems.

In: [http://www.bmg.bund.de/nn_604274/DE/Themenschwerpunkte/Ressortforschung/
Kurzberichte-Archiv/Forschungsbericht-16-11-1998-2598,templateId=addToCookie,param
=Links.html](http://www.bmg.bund.de/nn_604274/DE/Themenschwerpunkte/Ressortforschung/Kurzberichte-Archiv/Forschungsbericht-16-11-1998-2598,templateId=addToCookie,param=Links.html); letztes Abrufdatum: 01.07.2008

KOUTSOUMANIS, K. P. und J. N. SOFOS (2004):

Comparative acid stress response of *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7
and *Salmonella* Typhimurium after habituation at different pH conditions.

Lett. Appl. Microbiol. 38, 321-326

KOZAK, J., T. BALMER, R. BYRNE und K. FISHER (1996):

Prevalence of *Listeria monocytogenes* in foods: Incidence in dairy products.

Food Control 7, 215-221

KRÄMER, J. (2002):

Enterobacteriaceae.

In: KRÄMER, J. (Herausgeber): Lebensmittel-Mikrobiologie, 4. Aufl., 33-52, 129-135, Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart

KRÜGER, S. (2000):

Listerien - eine beherrschbare Gefahr.

Dtsch. Molkereiz. 12, 514-519

LE LOIR, Y., F. BARON und M. GAUTIER (2003):

Staphylococcus aureus and food poisoning.

Gen. Mol. Res. 2, 63-76

LEKKAS, C., A. KAKOURI, E. PALEOLOGOS, L. P. VOUTSINAS, M. G.

KONTOMINAS und J. SAMELIS (2006):

Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in Galotyri cheese stored at 4 and 12 degrees C.

Food Microbiol. 23, 268-276

LEROY, F. und L. DE VUYST (2004):

Lactic acid bacteria as a functional starter cultures for the food fermentation industry.

Trends Food Sci. Tech. 15, 67-78

LEYER, G. J., L.-L. WANG und E. A. JOHNSON (1995):

Acid adaptation of *Escherichia coli* O157:H7 increases survival in acidic foods.

Appl. Environ. Microbiol. 61, 3752-3755

LIN, J., I. S. LEE, J. FREY, J. L. SLONCZEWSKI und J. W. FOSTER (1995):

Comparative analysis of extreme acid survival in *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, and *Escherichia coli*.

J. Bacteriol. 177, 4097-4104

LINDBERG, A.-M., Å. LJUNGH, S. AHRNÉ, S. LÖFDAHL und G. MOLIN (1998):

Enterobacteriaceae found in high numbers in fish, minced meat and pasteurised milk or cream and the presence of toxin encoding genes.

Int. J. Food Microbiol. 39, 11-17

LINNAN, M. J., L. MASCOLA, X. D. LOU, V. GOULET, S. MAY, S. SALMINEN,

D. W. HIRD, M. L. YONEKURA, P. HAYES, R. WEAVER *et al.* (1988):

Epidemic listeriosis associated with Mexican-style cheese.

N. Engl. J. Med. 319, 823-828

LITTLE, C. L., J. R. RHOADES, S. K. SAGOO, J. HARRIS, M. GREENWOOD,

V. MITHANI, K. GRANT und J. McLAUHLIN (2008):

Microbiological quality of retail cheeses made from raw, thermized or pasteurized milk in the UK.

Food Microbiol. 25, 304-312

LIU, D. (2006):

Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen.

J. Med. Microbiol. 55, 645-659

- LOW, J. C und W. DONACHIE (1997):
A review of *Listeria monocytogenes* and Listeriosis.
Vet. J. 153, 9-29
- MacDONALD, F. und A. D. SUTHERLAND (1993):
Effect of heat treatment on *Listeria monocytogenes* and gram-negative bacteria in sheep, cow and goat milks.
J. Appl. Bacteriol. 75, 336-343
- MacDONALD, P. D. M., R. E. WHITWAM, J. D. BOGGS, J. N. MacCORMACK, K. L. ANDERSON, J. W. REARDON, J. ROYDEN SAAH, L. M. GRAVES, S. B. HUNTER und J. SOBEL (2005):
Outbreak of listeriosis among Mexican immigrants as a result of consumption of illicitly produced Mexican-Style Cheese.
Clin. Infect. Dis. 40, 677-682
- MACZYŃSKA, B., U. KASPRZYKOWSKA, A. ZYCHOWICZ, A. PRZONDO-MORDARSKA, M. BARTOSZEWICZ und D. SMUTNICKA (2007):
Presence of STa, STb and LT enterotoxin genes in *Klebsiella* strains isolated in different hospitals from gastrointestinal tracts.
Int. J. Antimicrob. Agents 29, S309
- MAIR-WALDBURG, H. (1974):
Frischkäse.
In: MAIR-WALDBURG, H. (Herausgeber): Handbuch der Käse - Käse der Welt von A-Z - Eine Enzyklopädie, 452-460,
Volkswirtschaftlicher Kempten GmbH, Kempten (Allgäu)
- MANAFI, M., W. KNEIFEL und S. BASCOMB (1991):
Fluorogenic and chromogenic substrates used in bacterial diagnostics.
Microbiol. Rev. 55, 335-348
- MANAFI, M. (1996):
Fluorogenic and chromogenic enzyme substrates in culture media and identification tests.
Int. J. Food Microbiol. 31, 45-58
- MANAFI, M. (2000):
New developments in chromogenic and fluorogenic culture media.
Int. J. Food Microbiol. 60, 205-218
- MANAFI, M. (2002):
Enterobakterien, Coliforme und *Escherichia coli* (Indikator- und Index-Keime: (K)ein zeitgemäßes Konzept?).
In: <http://www.univie.ac.at/hygiene-aktuell/coliformenvortrag.pdf>; letztes Abrufdatum: 01.07.2008
- MARCOS, A. und M. A. ESTEBAN (1982):
Nomograph for predicting water activity of soft cheese.
J. Dairy Sci. 65, 1795-1797

- MARGOSCH, D., M. MORAVEK, M. G. GÄNZLE, E. MÄRTLBAUER, R. F. VOGEL und M. A. EHRMANN (2005):
Effect of high pressure and heat on bacterial toxins.
Food Technol. Biotechnol. 43, 211-217
- MARTIN, M. L., L. D. SHIPMAN, J. G. WELLS, M. E. POTTER, K. HEDBERG, I. K. WACHSMUTH, R. V. TAUXE, J. P. DAVIS, J. ARNOLDI und J. TILLELI (1986):
Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from dairy cattle associated with two cases of haemolytic uraemic syndrome.
Lancet 328, 1043
- MASSA, S., D. CESARONI, G. PODA und L. D. TROVATELLI (1990):
The incidence of *Listeria spp.* in soft cheeses, butter and raw milk in the province of Bologna.
J. Appl. Bacteriol. 68, 153-156
- MASSA, S., E. GOFFREDO, C. ALTIERI und K. NATOLA (1999):
Fate of *Escherichia coli* O157:H7 in unpasteurized milk stored at 8 °C.
Lett. Appl. Microbiol. 28, 89-92
- McDEVITT, D., T. NANAVATY, K. HOUSE-POMPEO, E. BELL, N. TURNER, L. McINTIRE, T. FOSTER und M. HÖÖK (1997):
Characterization of the interaction between the *Staphylococcus aureus* clumping factor (ClfA) and fibrinogen.
Eur. J. Biochem. 247, 416-424
- McLAUHLIN, J., R. T. MITCHELL, W. J. SMERDON und K. JEWELL (2004):
Listeria monocytogenes and listeriosis: a review of hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods.
Int. J. Food Microbiol. 92, 15-33
- MEAD, P. S., L. SLUTSKER, V. DIETZ, L. F. McCAIG, J. S. BRESEE, C. SHAPIRO, P. M. GRIFFIN und R. V. TAUXE (1999):
Food-related illness and death in the United States.
Emerging Infect. Dis. 5, 607-625
- MENA, C., G. ALMEIDA, L. CARNEIRO, P. TEIXEIRA, T. HOGG und P. A. GIBBS (2004):
Incidence of *Listeria monocytogenes* in different food products commercialized in Portugal.
Food Microbiol. 21, 213-216
- MENDOZA-YEPES, M. J., O. ABELLAN-LOPEZ, J. CARRION-ORTEGA und F. MARIN-INIESTA (1999):
Inhibition of *Listeria monocytogenes* and other bacteria in Spanish soft cheeses made with *Lactococcus lactis subsp. diacetylactis*.
J. Food Safety 19, 161-170

MEUNIER-GODDIK, L. (2004):

Chapter 10: Fromage Frais.

In: HUI, Y. H., L. MEUNIER-GODDIK, Å. S. HANSEN, J. JOSEPHSEN, W.-K. NIP, P. S. STANFIELD und F. TOLDRÁ (Herausgeber): Handbook of food and beverage fermentation technology, 183-194, Marcel Dekker Verlag, New York

MEYER, E. M. (1918):

An aerobic spore-forming bacillus giving gas in lactose broth isolated in routine water examination.

J. Bacteriol. 3, 9-14

MEYER-BROSETA, S., A. DIOT, S. BASTIAN, J. RIVIÈRE und O. CERF (2003):

Estimation of low bacterial concentration: *Listeria monocytogenes* in raw milk.

Int. J. Food Microbiol. 80, 1-15

MEYRAND, A. und C. VERNOZY-ROZAND (1999):

Croissance et entérotoxinogénèse de *Staphylococcus aureus* dans différents fromages. Revue Méd. Vét. 150, 601-616

MICHALSKA, A. und E. GOSPODAREK (2007):

Enterobacter spp. bacteria - the taxonomy, characteristics, virulence factors and the methods for identification.

Postepy Mikrobiologii 46 (1), 39-47

MIKSITS, K. und H. HAHN (2004):

Enterobakterien.

In: MIKSITS, K. und H. HAHN (Herausgeber): Basiswissen Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie, 3. Aufl., 157-165, Springer Verlag, Heidelberg

MILCH & MARKT (2008a):

Käseproduktion wird gedrosselt.

In: www.milchindustrie.de; letztes Abrufdatum: 01.07.2008

MILCH & MARKT (2008b):

Produktionssteigerung deutscher Molkereien/Anstieg der Käseproduktion.

In: www.milchindustrie.de; letztes Abrufdatum: 01.07.2008

MILCHINDUSTRIE-VERBAND (2007):

Geschäftsbericht 2006/2007: Einblick, Analysen & Perspektiven.

In: www.milchindustrie.de; letztes Abrufdatum: 01.07.2008

MOORE, K., T. DAMROW, D. O. ABBOTT und S. JANKOWSKI (1995):

Outbreak of acute gastroenteritis attributable to *Escherichia coli* serotype O104:H21 - Helena, Montana, 1994.

MMWR 44, 501-503

- MORANDI, S., M. BRASCA, R. LODI, P. CREMONESI und B. CASTIGLIONI (2007):
Detection of classical enterotoxins and identification of enterotoxin genes in
Staphylococcus aureus from milk and dairy products.
Vet. Microbiol. 124, 66-72
- MOSSEL, D. A. A. (1981):
Coliform test for cheese and other foods.
Lancet 19-26, 1425
- MOSSEL, D. A. A. (1985):
Media for *Enterobacteriaceae*.
Int. J. Food Microbiol. 2, 27-32
- MUEHLHERR, J. E., C. ZWEIFEL, S. CORTI, J. E. BLANCO und R. STEPHAN (2003):
Microbiological quality of raw goat's and ewe's bulk-tank milk in Switzerland.
J. Dairy Sci. 86, 3849-3856
- MUNSON, S. H., M. T. TREMAINE, M. J. BETLEY und R. A. WELCH (1998):
Identification and characterization of staphylococcal enterotoxin types G and I from
Staphylococcus aureus.
Infect. Immun. 66, 3337-3348
- MURINDA, S. E., L. T. NGUYEN, S. J. IVEY, B. E. GILLESPIE, R. A. ALMEIDA, F.
A. DRAUGHON und S. P. OLIVER (2002):
Prevalence and molecular characterization of *Escherichia coli* O157:H7 in bulk tank milk
and fecal samples from cull cows: A 12-month survey of dairy farms in east Tennessee.
J. Food Prot. 65, 752-759
- NATARO, J. P. und J. B. KAPER (1998):
Diarrheagenic *Escherichia coli*.
Clin. Microbiol. Rev. 11, 142-201
- NES, I. F. und O. JOHNSBORG (2004):
Exploration of antimicrobial potential in LAB by genomics.
Curr. Opin. Biotechnol. 15, 100-104
- NIEMI, R. M., J. MENTU, A. SIITONEN und S. I. NIEMELÄ (2003):
Confirmation of *Escherichia coli* and its distinction from *Klebsiella* species by gas and
indole formation at 44 and 44,5 °C.
J. Appl. Microbiol. 95, 1242-1249
- NORMANNO, G., G. LA SALANDRA, A. DAMBROSIO, N. C. QUAGLIA, M.
CORRENTE, A. PARISI, G. SANTAGADA, A. FIRINU, E. CRISSETTI und G. V.
CELANO (2007):
Occurrence, characterization and antimicrobial resistance of enterotoxigenic
Staphylococcus aureus isolated from meat and dairy products.
Int. J. Food Microbiol. 115, 290-296
- NOUT, M. J. R. (1994):
Fermented foods and food safety.
Food Res. Intern. 27, 291-298

- NSO ROCA, A. P., F. BAQUERO-ARTIGAO, M. J. GARCÍA-MIGUEL, M. I. DE JOSÉ GÓMEZ, F. J. ARACIL SANTOS und F. DEL CASTILLO MARTÍN (2008):
Staphylococcal scalded skin syndrome.
An. Pediatr. 68, 124-127
- OELLIG, V. (2006):
Untersuchungen zur mikrobiologischen Beschaffenheit von Ziegenkäse verschiedener Herstellungs- und Vermarktungsweisen.
Diss. Med. Vet. Giessen
- OLARTE, C., S. SANZ, E. GONZALEZ-FANDOS und P. TORRE (1999):
Microbiological and physicochemical characteristics of Cameros cheese.
Food Microbiol. 16, 615-621
- ØRSKOV, I., F. ØRSKOV, B. JANN und K. JANN (1977):
Serology, Chemistry, and Genetics of O and K Antigens of *Escherichia coli*.
Bacteriol. Rev. 41, 667-710
- ØRSKOV, F. (1986):
Genus I. *Escherichia* Castellani and Chalmers 1919, 941AL
In: SNEATH, P. H. A., N. S. MAIR, M. E. SHARPE und J. G. HOLT (Herausgeber):
Bergey's Manual[®] of Systematic Bacteriology, Vol. 1, 420-423,
Williams & Wilkins, Baltimore
- PADOLA, N. L., M. E. SANZ, P. M. A. LUCCHESI, J. E. BLANCO, J. BLANCO, M. BLANCO, A. I. ETCHEVERRÍA, G. H. ARROYO und A. E. PARMA (2002):
First isolation of the enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O145:H- from cattle in feedlot in Argentina.
In: <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/2/6>; letztes Abrufdatum: 01.07.08
- PANIZZI, P., R. FRIEDRICH, P. FUENTES-PRIOR, W. BODE und P. E. BOCK (2004):
The staphylococcal family of zymogen activator and adhesion proteins.
Cell. Mol. Life Sci. 61, 2793-2798
- PARAJE, M. G., A. I. BARNES und I. ALBESA (2005):
An *Enterobacter cloacae* toxin able to generate oxidative stress and to provoke dose-dependent lysis of leukocytes.
Int. J. Med. Microbiol. 295, 109-116
- PATON, A. W. und J. C. PATON (1996):
Enterobacter cloacae producing Shiga-like toxin II-related cytotoxin associated with a case of hemolytic-uremic syndrome.
J. Clin. Microbiol. 34, 463-465
- PAUL, B. und I. HIRSHFIELD (2003):
The effect of acid treatment on survival and protein expression of laboratory K-12 strain *Escherichia coli*.
Res. Microbiol. 154, 115-121

- PEARSON, L. J. und E. H. MARTH (1990):
Listeria monocytogenes - Threat to a safe food supply: A review.
J. Dairy Sci. 73, 912-928
- PFLEGER, R. (2001):
Zum hygienischen Status von Milch und Milchprodukten aus der Direktvermarktung.
In: Jahrestagung 2001 der Arbeitsgemeinschaft landwirtschaftlicher Versuchsanstalten
(ALVA), Wolfpassing, 157-159
- PICCININ, D. M. und L. A. SHELEF (1995):
Survival of *Listeria monocytogenes* in cottage cheese.
J. Food Prot. 58, 128-131
- PRÉVOST, G., B. CRIBIER, P. COUPPIÉ, P. PETIAU, G. SUPERSAC, V. FINCK-
BARBANÇON, H. MONTEIL und Y. PIEMONT (1995):
Panton-Valentine Leucocidin and Gamma-Hemolysin from *Staphylococcus aureus* ATCC
49775 are encoded by distinct genetic loci and have different biological activities.
Infect. Immun. 63, 4121-4129
- QI, Y. und K. J. MILLER (2000):
Effect of low water activity on staphylococcal enterotoxin A and B biosynthesis.
J. Food Prot. 63, 473-478
- RAJ, H. D. und M. S. BERGDOLL (1969):
Effect of Enterotoxin B on humans volunteers.
J. Bacteriol. 98, 833-834
- RAMASWAMY, V., V. M. CRESENCE, J. S. REJITHA, M. U. LEKSHMI, K. S.
DHARSANA, S. P. PRASAD und H. M. VIJILA (2007):
Listeria - review of epidemiology and pathogenesis.
J. Microbiol. Immunol. Infect. 40, 4-13
- REA, M. C., T. M. COGAN und S. TOBIN (1992):
Incidence of pathogenic bacteria in raw milk in Ireland.
J. Appl. Microbiol. 73, 331-336
- RENYE JR., J. A., G. A. SOMKUTI, B. VALLEJO-CORDOBA, D. L. VAN HEKKEN
und A. F. GONZALEZ-CORDOVA (2008):
Characterization of the microflora isolated from Queso Fresco made from raw and
pasteurized milk.
J. Food Safety 28, 59-75
- REY, J., S. SÁNCHEZ, J. E. BLANCO, J. HERMOSO DE MENDOZA, M. HERMOSO
DE MENDOZA, A. GARCÍA, C. GIL, N. TEJERO, R. RUBIO und J. M. ALONSO
(2006):
Prevalence, serotypes and virulence genes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*
isolated from ovine and caprine milk and other dairy products in Spain.
Int. J. Food Microbiol. 107, 212-217

- RIEMELT, I., B. BARTEL und M. MALCZAN (1996):
Milchwirtschaftlich schädliche Bakterien.
In: RIEMELT, I. (Herausgeber): Milchwirtschaftliche Mikrobiologie, 1. Aufl., 133-134,
141-144,
Behr's Verlag GmbH&Co, Hamburg
- RKI - Robert Koch Institut (1999):
Epidemiologisches Bulletin: Zur Lebensmittelintoxikation durch *Staphylococcus aureus*,
Erfahrungen bei einem Ausbruch in Thüringen.
In: www.rki.de; letztes Abrufdatum: 01.07.2008
- RKI - Robert Koch Institut (2003):
Ratgeber Infektionskrankheiten - Merkblätter für Ärzte: Listeriose.
In: www.rki.de; letztes Abrufdatum: 01.07.2008
- RKI - Robert Koch Institut (2006):
Epidemiologisches Bulletin: Listeriose.
In: www.rki.de; letztes Abrufdatum: 01.07.2008
- RKI - Robert Koch Institut (2008a):
Erkrankungen durch enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC) -
Zum Auftreten mehrerer EHEC-Infektionen nach Rohmilchverzehr in einem Ferienlager.
In: www.rki.de; letztes Abrufdatum: 01.07.2008
- RKI - Robert Koch Institut (2008b):
Aktuelle Statistik meldepflichtiger Infektionskrankheiten (Datenstand: 16.01.2008).
In: www.rki.de; letztes Abrufdatum: 01.07.2008
- RKI - Robert Koch Institut (2008c):
Aktuelle Statistik meldepflichtiger Infektionskrankheiten (Datenstand: 05.03.2008)
In: www.rki.de; letztes Abrufdatum: 01.07.2008
- ROCOURT, J., A. SCHRETTENBRUNNER, H. HOF und E. P. ESPAZE (1987):
New species of the genus *Listeria*: *Listeria seeligeri*.
Pathol. Biol. 35, 1075-1080
- ROCOURT, J. (1988):
Taxonomy of the genus *Listeria*.
Infection 16, 89-91
- ROCOURT, J., P. BOERLIN, F. GRIMONT, C. JACQUET und J. C. PIFFARETTI
(1992):
Assignment of *Listeria grayi* and *Listeria murrayi* to a single species, *Listeria grayi*, with a
revised description of *Listeria grayi*.
Int. J. Syst. Bacteriol. 42, 171-174
- ROGGA, K. J., J. SAMELIS, A. KAKOURI, M. C. KATSIARI, I. N. SAVVAIDIS und
M. G. KONTOMINAS (2005):
Survival of *Listeria monocytogenes* in Galotyri, a traditional Greek soft acid-curd cheese,
stored at 4 °C and 12 °C.
Int. Dairy J. 15, 59-67

- ROMPRÉ, A., P. SERVAIS, J. BAUDART, M.-R. DE-ROUBIN und P. LAURENT (2002):
Detection and enumeration of coliforms in drinking water: current methods and emerging approaches.
J. Microbiol. Methods 49, 31-54
- RÜEGG, M. und B. BLANC (1977):
Beziehungen zwischen Wasseraktivität, Wasser-Sorptionsvermögen und Zusammensetzung von Käse.
Milchwissenschaft 32, 193-201
- SAAD, S. M. I., C. VANZIN, M. N. OLIVEIRA und B. D. G. M. FRANCO (2001):
Influence of lactic acid bacteria on survival of *Escherichia coli* O157:H7 in inoculated Minas cheese during storage at 8,5 °C.
J. Food Prot. 64, 1151-1155
- SALTIJERAL, J. A., V. B. ALVAREZ und B. GARCIA (1999):
Presence of *Listeria* in Mexican cheeses.
J. Food Safety 19, 241-247
- SCHEUTZ, F., T. CHEASTY, D. WOODWARD und H. R. SMITH (2004):
Designation of O174 and O175 to temporary O groups OX3 and OX7, and six new *E. coli* O groups that include Verocytotoxin-producing *E. coli* (VTEC): O176, O 177, O 178, O179, O180 und O181.
APMIS 112, 569-584
- SCHLECH III, W. F. (2000):
Foodborne listeriosis.
Clin. Infect. Dis. 31, 770-775
- SCHLEGELOVÁ, J., V. BABÁK, E. KLÍMOVÁ, J. LUKÁŠOVÁ, P. NAVRÁTILOVÁ, A. ŠUSTÁČKOVÁ, I. ŠEDIVÁ und D. RYŠÁNEK (2002):
Prevalence of and resistance to anti-microbial drugs in selected microbial species isolated from bulk milk samples.
J. Vet. Med. 49, 216-225
- SCHMIDT, H., M. MONTAG, J. BOCKEMÜHL, J. HEESEMANN und H. KARCH (1993):
Shiga-like toxin II-related cytotoxins in *Citrobacter freundii* strains from humans and beef samples.
Infect. Immun. 61, 534-543
- SCHMIDT-LORENZ, W. und H. SPILLMANN (1988):
Kritische Überlegungen zum Aussagewert von *E. coli*, Coliformen und Enterobacteriaceen in Lebensmitteln.
Arch. Lebensmittelhyg. 39, 3-15
- SCHMITT, M., U. SCHULER-SCHMID und W. SCHMIDT-LORENZ (1990):
Temperature limits of growth, TNase and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* strains isolated from foods.
Int. J. Food Microbiol. 11, 1-20

SCHUCHAT, A., B. SWAMINATHAN und C. V. BROOME (1991):
Epidemiology of human listeriosis.
Clin. Microbiol. Rev. 4, 169-183

SCHWABE, M., S. NOTERMANS, R. BOOT, S. R. TATINI und J. KRÄMER (1990):
Inactivation of staphylococcal enterotoxins by heat and reactivation by high pH treatment.
Int. J. Food Microbiol. 10, 33-42

SCVPH - Scientific committee on veterinary measures relating to public health (1999):
Opinion of the Scientific committee on veterinary measures relating to public health on
Listeria monocytogenes.
In: http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scv/out25_en.pdf; letztes Abrufdatum: 01.07.2008

SCVPH - Scientific committee on veterinary measures relating to public health (2003a):
Opinion of the Scientific committee on veterinary measures relating to public health on
staphylococcal enterotoxins in milk products, particularly cheeses.
In: http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scv/out61_en.pdf; letztes Abrufdatum: 01.07.2008

SCVPH - Scientific committee on veterinary measures relating to public health (2003b):
Opinion of the Scientific committee on veterinary measures relating to public health on
Verotoxigenic *E. coli* (VTEC) in foodstuffs.
In: http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scv/out58_en.pdf; letztes Abrufdatum: 01.07.2008

SEELIGER, H. P. R. und D. JONES (1986):
Section 14: Genus *Listeria* Pirie 1940, 383AL.
In: SNEATH, P. H. A., N. S. MAIR, M. E. SHARPE und J. G. HOLT (Herausgeber):
Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology, Vol. 2, 1235-1245,
Williams & Wilkins, Baltimore

SELBITZ, H.-J. (2002):
Escherichia.
In: MAYR, A. (Herausgeber): Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre,
7. Aufl., 451-454,
Enke Verlag, Stuttgart

SENGE, B. und T. SIENKIEWICZ (2002):
Rheologische Besonderheiten von Frischkäse - Konsequenzen zur Optimierung der
Prozesstechnik.
Dtsch. Molkereiz. 123, 26-33

ŠEPUTIENĖ, V., D. MOTIEJŪNAS, K. SUŽIEDĖLIS, H. TOMENIUS, S. NORMARK,
Ö. MELEFORS und E. SUŽIEDĖLIENĖ (2003):
Molecular characterization of the acid-inducible *asr* gene of *Escherichia coli* and its role in
acid stress response.
J. Bacteriol. 185, 2475-2484

SILVA, I. M. M., R. C. C. ALMEIDA, M. A. O. ALVES und P. F. ALMEIDA (2003):
Occurrence of *Listeria spp.* in critical control points and the environment of Minas Frescal
cheese processing.
Int. J. Food Microbiol. 81, 241-248

SIMEÃO DO CARMO, L., R. SOUZA DIAS, V. ROBERTO LINARDI, M. JOSÉ DE SENA, D. APARECIDA DOS SANTOS, M. EDUARDO DE FARIA, E. CASTRO PENA, M. JETT und L. GUILHERME HENEINE (2002):

Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheese and raw milk in Brazil.

Food Microbiol. 19, 9-14

SIMI, S., G. V. CARBONELL, R. M. FALCON, M. S. V. GATTI, P. P. JOAZEIRO, A. L. DARINI und T. YANO (2003):

A low molecular weight enterotoxigenic hemolysin from clinical *Enterobacter cloacae*.

Can. J. Microbiol. 49, 479-482

SIMS, G. R., D. A. GLENISTER, T. F. BROCKLEHURST und B. M. LUND (1989):

Survival and growth of food poisoning bacteria following inoculation into cottage cheese varieties.

Int. J. Food Microbiol. 9, 173-195

SINELL, H.-J. und J. KLEER (2000):

Durch Lebensmittel übertragbare Erreger der Enteritis infectiosa, Infektions-/Intoxikationskrankheiten und Parasitosen.

In: HEESCHEN, W., H. MEYER und R. ZSCHALER (Herausgeber): Handbuch Lebensmittelhygiene, 12. Akt.-Lfg. 3, 24-34,

Behr's Verlag, Hamburg

SMITH, G. (1983):

Erysipelothrix and *Listeria*.

In: PARKER, M. T. (Herausgeber): Topley and Wilson's principles of bacteriology, virology and immunity, 7. Aufl., Vol. 2 (Systematic bacteriology), 50-59,

Edward Arnold, London

STAFF, M. C. (1998):

Chapter 4: Cultured milk and fresh cheeses: Quarg and fromage frais.

In: EARLY, R. (Herausgeber): The technology of dairy products, 2. Aufl., 147-153, Blackie Academic & Professional, London

STEELE, M. L., W. B. McNAB, C. POPPE, M. W. GRIFFITHS, S. CHEN, S. A.

DEGRANDIS, L. C. FRUHNER, C. A. LARKIN, J. A. LYNCH und J. A. ODUMERU (1997):

Survey of Ontario bulk tank raw milk for food-borne pathogens.

J. Food Prot. 60, 1341-1346

STÖRMANN, J., M. BULLA, E. KUWERTZ-BRÖKING und H. KARCH (1996):

Zunahme von Erkrankungen an hämolytisch-urämischem Syndrom (HUS) durch enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC) im Münsterland/Emsland 1994.

Monatsschr. Kinderheilk. 144, 1242-1247

SWAMINATHAN, B. und P. GERNER-SMIDT (2007):

The epidemiology of human listeriosis.

Microbes Infect. 9, 1236-1243

SZABO, E. A. und M. E. CAHILL (1998):

The combined affects of modified atmosphere, temperature, nisin and ALTATM 2341 on the growth of *Listeria monocytogenes*.

Int. J. Food Microbiol. 43, 21-31

TÄUFEL, A., W. TERNES, L. TUNGER und M. ZOBEL (1993):

Lebensmittellexikon.

3. neubear. und aktualisierte Aufl., Bd. 1 und 2,

Behr's Verlag, Hamburg

TERPLAN, G., R. SCHOEN, W. SPRINGEMEYER, I. DEGLE und H. BECKER

(1986a):

Vorkommen, Verhalten und Bedeutung von Listerien in Milch und Milchprodukten.

Arch. Lebensmittelhyg. 37, 131-137

TERPLAN, G., R. SCHOEN, W. SPRINGEMEYER, I. DEGLE und H. BECKER

(1986b):

Listeria monocytogenes in Milch und Milchprodukten.

Dtsch. Molkereiz. 41, 1358-1368

TORNADIJO, M. E., M. C. GARCÍA, J. M. FRESNO und J. CARBALLO (2001):

Study of the *Enterobacteriaceae* during the manufacture and ripening of San Simón cheese.

Food Microbiol. 18, 499-509

TORRES, N. und R. C. CHANDAN (1981):

Latin American white cheese - a review.

J. Dairy Sci. 64, 552-557

UPTON, P. und J. E. COIA (1994):

Outbreak of *Escherichia coli* O157 infection associated with pasteurised milk supply.

Lancet 344, 1015

VAN KESSEL, J. S., J. S. KARNES, L. GORSKI, B. J. McCLUSKEY und M. L. PERDUE (2004):

Prevalence of *Salmonellae*, *Listeria monocytogenes*, and fecal coliforms in bulk tank milk on US dairies.

J. Dairy Sci. 87, 2822-2830

VÁZQUEZ-BOLAND, J. A., M. KUHN, P. BERCHE, T. CHAKRABORTY, G.

DOMÍNGUEZ-BERNAL, W. GOEBEL, B. GONZÁLEZ-ZORN, J. WEHLAND und J.

KREFT (2001):

Listeria pathogenesis and molecular virulence determinants.

Clin. Microbiol. Rev. 14, 584-640

VECCHIONACCE, R. A., R. BASSETTE und R. S. METHA (1978):

Survival of *Escherichia coli*, strain W, during the manufacture of cottage cheese.

J. Dairy Sci. 61, 1704-1708

- VENKATESWARAN, K., A. MURAKOSHI und M. SATAKE (1996):
Comparison of commercially available kits with standard methods for the detection of coliforms and *Escherichia coli* in foods.
Appl. Environ. Microbiol. 62, 2236-2243
- VITAS, A. I., V. AGUADO und I. GARCIA-JALON (2004):
Occurrence of *Listeria monocytogenes* in fresh and processed foods in Navarra (Spain).
Int. J. Food Microbiol. 90, 349-356
- WAAK, E., W. THAM und M.-L. DANIELSSON-THAM (2002):
Prevalence and fingerprinting of *Listeria monocytogenes* strains isolated from raw whole milk in farm bulk tanks and in dairy plant receiving tanks.
Appl. Environ. Microbiol. 68, 3366-3370
- WALKER, J. K., J. H. MORGAN, J. McLAUCHLIN, K. A. GRANT und J. A. SHALLCROSS (1994):
Listeria innocua isolated from a case of ovine meningoencephalitis.
Vet. Microbiol. 42, 245-253
- ZANGERL, P. (1999):
Charakterisierung und Enterotoxinbildung von - aus Milch und Milchprodukten isolierten - Koagulase-positiven Staphylokokken.
In: 40. Arbeitstagung des Gebietes Lebensmittelhygiene der deutschen veterinärmedizinischen Gesellschaft e. V. (DVG), Garmisch-Partenkirchen. 445-450
- ZANGERL, P. und M. FRIEDL (2001):
Neue Nährböden zum Nachweis von *Escherichia coli* und koagulase-positiven Staphylokokken in Milch und Milchprodukten.
In: Jahrestagung 2001 der Arbeitsgemeinschaft landwirtschaftlicher Versuchsanstalten (ALVA), Wolfpassing, 129-130
- ZANGERL, P. (2006a):
Enterobakterien (Familie *Enterobacteriaceae*).
In: KRÖMKER, V. (Herausgeber): Kurzes Lehrbuch Milchkunde und Milchhygiene, 131-132,
Parey Verlag, Stuttgart
- ZANGERL, P. (2006b):
Pathogene *Escherichia coli*.
In: KRÖMKER, V. (Herausgeber): Kurzes Lehrbuch Milchkunde und Milchhygiene, 146-147,
Parey Verlag, Stuttgart
- ZÁRATE, V., F. BELDA, C. PÉREZ und E. CARDELL (1997):
Changes in the microbial flora of Tenerife goats' milk cheese during ripening.
Int. Dairy J. 7, 635-641
- ZÁRATE, V., G. PÉREZ, F. BELDA und E. CARDELL (2002):
Enterobacteriaceae of fresh Tenerife cheese.
Milchwissenschaft 57, 648-650

Rechtliche Grundlagen

Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 Abs. 1 des Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch (LFGB):

Untersuchung von Lebensmitteln, Loseblattwerk in der jeweils letzten gültigen Fassung, Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (Hrsg), erschienen im Beuth Verlag GmbH, Berlin

Untersuchung von Lebensmitteln - Methode L 01.00-1:

Allgemeiner Leitfaden für die Vorbereitung von Untersuchungsproben und die Herstellung von Anschlägen und Dezimalverdünnungen für mikrobiologische Untersuchungen von Milch und Milchprodukten

Untersuchung von Lebensmitteln - Methode L 00.00-21:

Bestätigung von *Escherichia coli* durch zusätzliche Identifizierungsreaktionen

Untersuchung von Lebensmitteln - Methode L 01.00-54:

Bestimmung der *Escherichia coli* in Milch und Milchprodukten, Fluoreszenzoptisches Verfahren mit paralleler Bestimmung coliformer Keime

Untersuchung von Lebensmitteln – Methode L 01.00-3:

Bestimmung der coliformen Keime in Milch, Milchprodukten, Butter, Käse und Speiseeis, Verfahren mit festem Nährboden

Untersuchung von Lebensmitteln – Methode L 00.00-32:

Horizontales Verfahren für den Nachweis und die Zählung von *Listeria monocytogenes*, Teil 1: Nachweisverfahren

Untersuchung von Lebensmitteln – Methode L 00.00-55:

Verfahren für die Zählung von koagulase-positiven Staphylokokken (*Staphylococcus aureus* und anderen Spezies) in Lebensmitteln
Teil 1: Verfahren mit Baird Parker Agar

Untersuchung von Lebensmitteln – Methode L 00.00-45:

Allgemeine verfahrensspezifische Anforderungen zum Nachweis von Mikroorganismen mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) in Lebensmitteln

Untersuchung von Lebensmitteln – Methode L 07.18-1:

Nachweis, Isolierung und Charakterisierung Verotoxin-bildender *Escherichia coli* (VTEC) in Hackfleisch mittels PCR und DNA-Hybridisierungstechnik

Empfehlung der Kommission vom 19. Dezember 2003 für ein koordiniertes Programm zur amtlichen Lebensmittelüberwachung für 2004 (2004/24/EG),
Abl. Eur. Union L 6 (2004), 29-37

Empfehlung der Kommission vom 1. März 2005 für ein koordiniertes Programm zur amtlichen Lebensmittelüberwachung für 2005 (2005/175/EG),
Abl. Eur. Union L 59 (2005), 27-39

Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 der Kommission vom 15. November 2005 über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel, Abl. Eur. Union L 338 (2005), 1-26, zuletzt geändert durch die Verordnung (EG) Nr. 1441/2007 der Kommission vom 5. Dezember 2007 zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel, Abl. Eur. Union L 322 (2007), 12-29

Gesetz zur Neuordnung des Lebensmittel- und des Futtermittelrechts vom 1. September 2005, Artikel 1: Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch (Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch – LFGB)
BGBl. 2005, Teil I, Nr. 55, 2618-2669

Gewerbeordnung in der Fassung der Bekanntmachung vom 22. Februar 1999
BGBl. 1999, Teil I, Nr. 9, 202-238, zuletzt geändert durch Artikel 9 des Gesetzes zur Vereinfachung und Anpassung statistischer Rechtsvorschriften vom 17. März 2008
BGBl. 2008, Teil I, Nr. 10, 399-407

Hygieneverordnung EDI (HyV) vom 23. November 2005 (Stand am 12. Dezember 2006)
SR 817.024.1

ISO 21528-1:2004: Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal methods for the detection and enumeration of *Enterobacteriaceae* – Part 1: Detection and enumeration by MPN technique with pre-enrichment

Käseverordnung in der Fassung der Bekanntmachung vom 14. April 1986
BGBl. 1986, Teil I, 412, zuletzt geändert durch Artikel 21 der Verordnung zur Durchführung von Vorschriften des gemeinschaftlichen Lebensmittelhygienerechts vom 8. August 2007, BGBl. 2007, Teil I, Nr. 39, 1816-1898

Verordnung über die hygienischen und mikrobiologischen Anforderungen an Lebensmittel, Gebrauchsgegenstände, Räume, Einrichtungen und Personal (Hygieneverordnung, HyV) vom 26. Juni 1995 (Stand am 22. Februar 2000)
SR 817.051

Verordnung zur Durchführung von Vorschriften des gemeinschaftlichen Lebensmittelhygienerechts vom 8. August 2007
BGBl. 2007, Teil I, Nr. 39, 1816-1898

9 ANHANG

Tabelle 9.1: Einzelergebnisse für die aus Frischkäse isolierten *Enterobacteriaceae*-Spezies (Qualitative (3.2.3) und quantitative Untersuchung (3.2.4) zusammengefasst)

Nr.	Vermarktungsform	Angebotsform	Hauptzutat	Nachgewiesene <i>Enterobacteriaceae</i> -Spezies
1	Einzelhandel, konventionell	unverpackt	Gemüse (Paprika, Tomate)	-
2	Einzelhandel, konventionell	unverpackt	Fisch (Thunfisch)	<i>Enterobacter cloacae</i>
3	Einzelhandel, konventionell	Fertigpackung	Gemüse (Meerrettich)	-
4	Einzelhandel, konventionell	Fertigpackung	Krautgewürze (Kräuter)	-
5	Einzelhandel, konventionell	Fertigpackung	Krautgewürze (Bärlauch)	-
6	Einzelhandel, konventionell	Fertigpackung	Krautgewürze (Kräuter)	-
7	Einzelhandel, konventionell	Fertigpackung	Gewürze (Pfeffer)	-
8	Einzelhandel, konventionell	Fertigpackung	Krautgewürze (Kräuter)	-
9	Einzelhandel, konventionell	Fertigpackung	Krautgewürze (Kräuter)	-
10	Einzelhandel, konventionell	Fertigpackung	Fisch (Lachs)	-
11	Einzelhandel, konventionell	Fertigpackung	Krautgewürze (Kräuter)	-
12	Einzelhandel, konventionell	Fertigpackung	ohne Zutat	-
13	Einzelhandel, konventionell	Fertigpackung	Gemüse (Paprika, Tomate)	-
14	Einzelhandel, konventionell	Fertigpackung	Gemüse (Paprika, Tomate)	<i>Enterobacter cloacae</i>
15	Einzelhandel, konventionell	Fertigpackung	Krautgewürze (Kräuter)	-
16	Einzelhandel, konventionell	Fertigpackung	ohne Zutat	-
17	Einzelhandel, konventionell	Fertigpackung	Krautgewürze (Kräuter)	-
18	Einzelhandel, ökologisch	Fertigpackung	ohne Zutat	<i>Proteus mirabilis</i>

Fortsetzung Tabelle 9.1:

Nr.	Vermarktungsform	Angebotsform	Hauptzutat	Nachgewiesene <i>Enterobacteriaceae</i> -Spezies
19	Einzelhandel, ökologisch	Fertigpackung	Gemüse (rote Beete)	-
20	Einzelhandel, ökologisch	Fertigpackung	Krautgewürze (Bärlauch)	<i>Escherichia coli</i>
21	Einzelhandel, ökologisch	Fertigpackung	Fisch (Lachs)	<i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella oxytoca</i>
22	Einzelhandel, ökologisch	Fertigpackung	ohne Zutat	-
23	Einzelhandel, ökologisch	Fertigpackung	Gewürze (orientalische Gewürze)	-
24	Einzelhandel, ökologisch	Fertigpackung	Gemüse (Paprika, Tomate)	-
25	Einzelhandel, ökologisch	Fertigpackung	Krautgewürze (Kräuter)	-
26	Einzelhandel, konventionell	unverpackt	Gemüse (Aubergine)	-
27	Einzelhandel, konventionell	unverpackt	Gemüse (Paprika, Tomate)	<i>Klebsiella oxytoca</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Hafnia halvei</i> , <i>Serratia liquefaciens</i>
28	Einzelhandel, konventionell	unverpackt	Gemüse (Paprika, Tomate)	<i>Klebsiella oxytoca</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Serratia liquefaciens</i>
29	Einzelhandel, konventionell	unverpackt	Gemüse (Paprika, Tomate)	<i>Klebsiella oxytoca</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp. <i>ozaenae</i> , <i>Serratia liquefaciens</i>
30	Einzelhandel, konventionell	unverpackt	Gewürze (Peperoni)	<i>Escherichia coli</i>
31	Einzelhandel, konventionell	unverpackt	Gemüse (Paprika, Tomate)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp. <i>pneumoniae</i> , <i>Klebsiella oxytoca</i> , <i>Serratia liquefaciens</i> , <i>Citrobacter freundii</i> , <i>Enterobacter gergoviae</i>
32	Einzelhandel, konventionell	unverpackt	Krautgewürze (Schnittlauch)	-
33	Einzelhandel, ökologisch	Fertigpackung	Krautgewürze (Bärlauch)	-
34	Wochenmarkt, ökologisch	unverpackt	Krautgewürze (Bärlauch)	-
35	Wochenmarkt, konventionell	unverpackt	Krautgewürze (Bärlauch)	<i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Citrobacter freundii</i> , <i>Klebsiella oxytoca</i> , <i>Pantoea</i> spp.
36	Wochenmarkt, konventionell	unverpackt	Obst (Granatapfel)	<i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Citrobacter freundii</i> , <i>Klebsiella oxytoca</i>

Fortsetzung Tabelle 9.1:

Nr.	Vermarktungsform	Angebotsform	Hauptzutat	Nachgewiesene <i>Enterobacteriaceae</i> -Spezies
37	Wochenmarkt, konventionell	unverpackt	Gemüse (Paprika, Tomate)	<i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp. <i>pneumoniae</i> , <i>Enterobacter cloacae</i>
38	Wochenmarkt, konventionell	unverpackt	Obst (Mango)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp. <i>pneumoniae</i> , <i>Klebsiella oxytoca</i> , <i>Enterobacter cloacae</i>
39	Wochenmarkt, konventionell	unverpackt	Gewürze (orientalische Gewürze)	<i>Escherichia coli</i> , <i>Escherichia vulneris</i>
40	Wochenmarkt, konventionell	unverpackt	Gemüse (Paprika, Tomate)	<i>Hafnia alvei</i> , <i>Serratia plymuthica</i>
41	Wochenmarkt, konventionell	unverpackt	Gemüse (Paprika, Tomate)	-
42	Wochenmarkt, konventionell	unverpackt	Obst (Mango)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp. <i>pneumoniae</i> , <i>Hafnia alvei</i>
43	Wochenmarkt, konventionell	unverpackt	Krautgewürze (Bärlauch)	-
44	Wochenmarkt, konventionell	unverpackt	Fisch (Thunfisch)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp. <i>pneumoniae</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Klebsiella oxytoca</i> , <i>Kluyvera</i> spp., <i>Serratia plymuthica</i>
45	Wochenmarkt, konventionell	unverpackt	Gemüse (Oliven)	-
46	Wochenmarkt, konventionell	unverpackt	Obst (Mango)	-
47	Wochenmarkt, konventionell	unverpackt	Krautgewürze (Schnittlauch)	<i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Citrobacter freundii</i> , <i>Serratia liquefaciens</i> , <i>Pantoea agglomerans</i> , <i>Enterobacter aerogenes</i>
48	Hofladen, ökologisch	Fertigpackung	Krautgewürze (Kräuter)	-
49	Hofladen, ökologisch	Fertigpackung	ohne Zutat	-
50	Hofladen, ökologisch	Fertigpackung	Gemüse (Pilze)	-
51	Hofladen, ökologisch	Fertigpackung	Gemüse (Paprika, Tomate)	<i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Serratia liquefaciens</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp. <i>ozaenae</i>
52	Hofladen, ökologisch	unverpackt	Gewürze (Blütengewürz)	-
53	Hofladen, ökologisch	unverpackt	Gewürze (Blütengewürz)	<i>Escherichia coli</i>

Fortsetzung Tabelle 9.1:

Nr.	Vermarktungsform	Angebotsform	Hauptzutut	Nachgewiesene <i>Enterobacteriaceae</i> -Spezies
54	Hofladen, ökologisch	unverpackt	Gewürze (Blütengewürz)	<i>Enterobacter cloacae</i>
55	Hofladen, ökologisch	unverpackt	Gewürze (Blütengewürz)	<i>Escherichia vulneris</i>
56	Hofladen, ökologisch	Fertigpackung	ohne Zutat	-
57	Hofladen, ökologisch	Fertigpackung	Gemüse (Meerrettich)	-
58	Hofladen, ökologisch	Fertigpackung	Gemüse (Zwiebel)	-
59	Hofladen, ökologisch	Fertigpackung	Gemüse (Paprika, Tomate)	-
60	Einzelhandel, Reisegewerbe	Fertigpackung	Gemüse (Rucola)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp. <i>pneumoniae</i> , <i>Klebsiella oxytoca</i> , <i>Citrobacter freundii</i> , <i>Serratia liquefaciens</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Pantoea agglomerans</i> , <i>Morganella morganii</i>
61	Einzelhandel, Reisegewerbe	Fertigpackung	Gemüse (Radieschen)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp. <i>pneumoniae</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Serratia liquefaciens</i> , <i>Serratia plymuthica</i> , <i>Pantoea agglomerans</i> , <i>Citrobacter freundii</i>
62	Einzelhandel, Reisegewerbe	Fertigpackung	Krautgewürze (Kräuter)	<i>Klebsiella oxytoca</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Enterobacter intermedius</i> , <i>Pantoea agglomerans</i> , <i>Serratia plymuthica</i> , <i>Serratia odorifera</i>
63	Einzelhandel, konventionell	unverpackt	Gemüse (Paprika, Tomate)	-
64	Wochenmarkt, konventionell	unverpackt	Krautgewürze (Kräuter)	-
65	Wochenmarkt, konventionell	unverpackt	Krautgewürze (Schnittlauch)	<i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp. <i>ozaenae</i> , <i>Citrobacter freundii</i> , <i>Serratia liquefaciens</i> , <i>Serratia odorifera</i> , <i>Escherichia vulneris</i> , <i>Pantoea agglomerans</i> , <i>Cedecea</i> spp.
66	Wochenmarkt, konventionell	unverpackt	Krautgewürze (Kräuter)	<i>Escherichia coli</i>

Fortsetzung Tabelle 9.1:

Nr.	Vermarktungsform	Angebotsform	Hauptzutat	Nachgewiesene <i>Enterobacteriaceae</i> -Spezies
67	Hofladen, ökologisch	unverpackt	Gewürze (orientalische Gewürze)	-
68	Hofladen, ökologisch	unverpackt	Krautgewürze (Kräuter)	-
69	Hofladen, ökologisch	unverpackt	Krautgewürze (Bärlauch)	<i>Enterobacter cloacae</i>
70	Hofladen, ökologisch	unverpackt	Gemüse (Paprika, Tomate)	-
71	Hofladen, ökologisch	unverpackt	Gewürze (Pfeffer)	<i>Enterobacter cloacae</i>
72	Hofladen, ökologisch	unverpackt	ohne Zutat	-
73	Hofladen, ökologisch	Fertigpackung	Gemüse (Paprika, Tomate)	-
74	Einzelhandel, konventionell	Fertigpackung	Krautgewürze (Kräuter)	-
75	Einzelhandel, konventionell	Fertigpackung	Krautgewürze (Kräuter)	-
76	Einzelhandel, konventionell	Fertigpackung	Gemüse (Paprika, Tomate)	-
77	Einzelhandel, konventionell	Fertigpackung	Gemüse (Knoblauch)	-
78	Einzelhandel, konventionell	Fertigpackung	Gemüse (Zwiebel)	-
79	Einzelhandel, konventionell	Fertigpackung	ohne Zutat	-
80	Einzelhandel, konventionell	Fertigpackung	ohne Zutat	-
81	Einzelhandel, konventionell	Fertigpackung	Gewürze (Chilly)	-
82	Einzelhandel, konventionell	Fertigpackung	Gemüse (Knoblauch)	-
83	Einzelhandel, konventionell	Fertigpackung	Gemüse (Meerrettich)	-
84	Einzelhandel, konventionell	Fertigpackung	ohne Zutat	-
85	Einzelhandel, konventionell	Fertigpackung	Krautgewürze (Bärlauch)	-
86	Einzelhandel, konventionell	Fertigpackung	ohne Zutat	-
87	Einzelhandel, konventionell	Fertigpackung	Krautgewürze (Kräuter)	-
88	Einzelhandel, konventionell	Fertigpackung	Krautgewürze (Kräuter)	-
89	Einzelhandel, Reisegewerbe	Fertigpackung	Gewürze (Peperoni)	<i>Enterobacter cloacae</i>

Fortsetzung Tabelle 9.1:

Nr.	Vermarktungsform	Angebotsform	Hauptzutat	Nachgewiesene <i>Enterobacteriaceae</i> -Spezies
90	Einzelhandel, Reisegewerbe	Fertigpackung	Fisch (Lachs)	<i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp. <i>pneumoniae</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Pantoea agglomerans</i> , <i>Citrobacter freundii</i> , <i>Serratia liquefaciens</i>
91	Einzelhandel, konventionell	unverpackt	Gemüse (Radieschen)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp. <i>pneumoniae</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Citrobacter freundii</i> , <i>Enterobacter gergoviae</i> , <i>Cedecea lapagei</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Pantoea agglomerans</i> , <i>Escherichia vulneris</i>
92	Einzelhandel, konventionell	unverpackt	Gemüse (Knoblauch)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp. <i>pneumoniae</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Enterobacter gergoviae</i> , <i>Serratia liquefaciens</i> ,
93	Einzelhandel, konventionell	unverpackt	Krautgewürze (Schnittlauch)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp. <i>pneumoniae</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Serratia liquefaciens</i> , <i>Serratia odorifera</i> , <i>Serratia rubidaea</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp. <i>ozaenae</i> , <i>Pantoea agglomerans</i>
94	Einzelhandel, konventionell	unverpackt	Gemüse (Paprika, Tomate)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp. <i>pneumoniae</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Citrobacter freundii</i> , <i>Cedecea lapagei</i> , <i>Serratia liquefaciens</i> , <i>Pantoea agglomerans</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp. <i>ozaenae</i>
95	Einzelhandel, konventionell	Fertigpackung	Krautgewürze (Kräuter)	-
96	Einzelhandel, konventionell	Fertigpackung	Obst (Ananas)	-
97	Hofladen, ökologisch	unverpackt	Krautgewürze (Kräuter)	-

Fortsetzung Tabelle 9.1:

Nr.	Vermarktungsform	Angebotsform	Hauptzutut	Nachgewiesene <i>Enterobacteriaceae</i> -Spezies
98	Wochenmarkt, konventionell	unverpackt	Krautgewürze (Bärlauch)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp. <i>pneumoniae</i> , <i>Klebsiella oxytoca</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Serratia marcescens</i> , <i>Kluyvera cryocrescens</i>
99	Wochenmarkt, konventionell	unverpackt	Gemüse (Paprika, Tomate)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp. <i>pneumoniae</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Serratia marcescens</i> , <i>Enterobacter amnigenus</i>
100	Wochenmarkt, konventionell	unverpackt	Gemüse (Paprika, Tomate)	<i>Hafnia alvei</i> , <i>Serratia rubidaea</i> , <i>Pantoea agglomerans</i>
101	Wochenmarkt, konventionell	unverpackt	Krautgewürze (Kräuter)	<i>Escherichia coli</i> , <i>Serratia odorifera</i>
102	Wochenmarkt, konventionell	unverpackt	ohne Zutat	<i>Escherichia coli</i>
103	Einzelhandel, konventionell	unverpackt	ohne Zutat	<i>Hafnia alvei</i>
104	Einzelhandel, konventionell	unverpackt	Krautgewürze (Basilikum)	<i>Hafnia alvei</i>
105	Einzelhandel, konventionell	unverpackt	Gemüse (Paprika, Tomate)	<i>Pantoea agglomerans</i>
106	Einzelhandel, konventionell	unverpackt	Krautgewürze (Weinlaub)	<i>Hafnia alvei</i> , <i>Proteus vulgaris</i>
107	Einzelhandel, konventionell	unverpackt	Gewürze (Lebensmittelasche)	-
108	Einzelhandel, konventionell	unverpackt	Gemüse (Paprika, Tomate)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp. <i>pneumoniae</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Serratia rubidaea</i> , <i>Pantoea agglomerans</i>
109	Einzelhandel, konventionell	unverpackt	Krautgewürze (Bärlauch)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp. <i>pneumoniae</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Serratia rubidaea</i>
110	Einzelhandel, konventionell	unverpackt	Gewürze (Peperoni)	<i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp. <i>pneumoniae</i> , <i>Serratia liquefaciens</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Enterobacter aerogenes</i>
111	Einzelhandel, konventionell	unverpackt	Gemüse (Paprika, Tomate)	<i>Escherichia coli</i> , <i>Enterobacter cloacae</i>

Fortsetzung Tabelle 9.1:

Nr.	Vermarktungsform	Angebotsform	Hauptzutat	Nachgewiesene <i>Enterobacteriaceae</i> -Spezies
112	Einzelhandel, konventionell	unverpackt	Gemüse (Paprika, Tomate)	<i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp. <i>pneumoniae</i> , <i>Enterobacter cloacae</i>
113	Einzelhandel, konventionell	unverpackt	Gemüse (Paprika, Tomate)	<i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp. <i>pneumoniae</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Enterobacter intermedius</i> , <i>Serratia liquefaciens</i> , <i>Escherichia hermannii</i> , <i>Pantoea</i> spp.
114	Einzelhandel, konventionell	Fertigpackung	Gemüse (Paprika, Tomate)	<i>Escherichia coli</i>
115	Hofladen, ökologisch	Fertigpackung	ohne Zutat	-
116	Hofladen, ökologisch	Fertigpackung	Krautgewürze (Kräuter)	-
117	Einzelhandel, konventionell	Fertigpackung	Krautgewürze (Kräuter)	-
118	Einzelhandel, konventionell	Fertigpackung	Gemüse (Paprika, Tomate)	-
119	Einzelhandel, konventionell	Fertigpackung	Krautgewürze (Schnittlauch)	-
120	Einzelhandel, konventionell	Fertigpackung	Gewürze (Pfeffer)	-
121	Einzelhandel, konventionell	unverpackt	Gemüse (Paprika, Tomate)	<i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp. <i>pneumoniae</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Pantoea agglomerans</i>
122	Einzelhandel, konventionell	unverpackt	Gemüse (Paprika, Tomate)	<i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp. <i>pneumoniae</i> , <i>Citrobacter freundii</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Escherichia hermannii</i>
123	Einzelhandel, konventionell	unverpackt	Gemüse (Paprika, Tomate)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp. <i>pneumoniae</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Serratia liquefaciens</i> , <i>Pantoea agglomerans</i>
124	Einzelhandel, konventionell	unverpackt	Krautgewürze (Kräuter)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp. <i>pneumoniae</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Pantoea agglomerans</i> , <i>Enterobacter amnigenus</i>

Fortsetzung Tabelle 9.1:

Nr.	Vermarktungsform	Angebotsform	Hauptzutut	Nachgewiesene <i>Enterobacteriaceae</i> -Spezies
125	Einzelhandel, konventionell	unverpackt	Krautgewürze (Schnittlauch)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp. <i>pneumoniae</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Serratia rubidaea</i> , <i>Pantoea agglomerans</i>

Tabelle 9.2: Einzelergebnisse aus der quantitativen Bestimmung von coliformen Keimen in Frischkäse und Frischkäsezubereitungen

Nr.	Vermarktungsform	Angebotsform	Hauptzutut	Ermittelte Keimgehalte (KbE/g) für coliforme Keime		
				LST-MUG	VRB-MUG	ECC
1	Einzelhandel, konventionell	unverpackt	Gemüse (Paprika, Tomate)	-	-	-
2	Einzelhandel, konventionell	unverpackt	Fisch (Thunfisch)	-	-	-
3	Einzelhandel, konventionell	Fertigpackung	Gemüse (Meerrettich)	-	-	-
4	Einzelhandel, konventionell	Fertigpackung	Krautgewürze (Kräuter)	-	-	-
5	Einzelhandel, konventionell	Fertigpackung	Krautgewürze (Bärlauch)	-	-	-
6	Einzelhandel, konventionell	Fertigpackung	Krautgewürze (Kräuter)	-	-	-
7	Einzelhandel, konventionell	Fertigpackung	Gewürze (Pfeffer)	-	-	-
8	Einzelhandel, konventionell	Fertigpackung	Krautgewürze (Kräuter)	-	-	-
9	Einzelhandel, konventionell	Fertigpackung	Krautgewürze (Kräuter)	-	-	-
10	Einzelhandel, konventionell	Fertigpackung	Fisch (Lachs)	-	-	-
11	Einzelhandel, konventionell	Fertigpackung	Krautgewürze (Kräuter)	-	-	-
12	Einzelhandel, konventionell	Fertigpackung	ohne Zutat	-	-	-
13	Einzelhandel, konventionell	Fertigpackung	Gemüse (Paprika, Tomate)	-	-	-

Fortsetzung Tabelle 9.2:

Nr.	Vermarktungsform	Angebotsform	Hauptzutat	Ermittelte Keimgehalte (KbE/g) für coliforme Keime		
				LST-MUG	VRB-MUG	ECC
14	Einzelhandel, konventionell	Fertigpackung	Gemüse (Paprika, Tomate)	-	-	-
15	Einzelhandel, konventionell	Fertigpackung	Krautgewürze (Kräuter)	-	-	-
16	Einzelhandel, konventionell	Fertigpackung	ohne Zutat	-	-	-
17	Einzelhandel, konventionell	Fertigpackung	Krautgewürze (Kräuter)	-	-	-
18	Einzelhandel, ökologisch	Fertigpackung	ohne Zutat	-	-	-
19	Einzelhandel, ökologisch	Fertigpackung	Gemüse (rote Beete)	-	-	-
20	Einzelhandel, ökologisch	Fertigpackung	Krautgewürze (Bärlauch)	-	-	-
21	Einzelhandel, ökologisch	Fertigpackung	Fisch (Lachs)	$9,2 \times 10^0$	-	-
22	Einzelhandel, ökologisch	Fertigpackung	ohne Zutat	-	-	-
23	Einzelhandel, ökologisch	Fertigpackung	Gewürze (orientalische Gewürze)	-	-	-
24	Einzelhandel, ökologisch	Fertigpackung	Gemüse (Paprika, Tomate)	-	-	-
25	Einzelhandel, ökologisch	Fertigpackung	Krautgewürze (Kräuter)	-	-	-
26	Einzelhandel, konventionell	unverpackt	Gemüse (Aubergine)	-	-	-
27	Einzelhandel, konventionell	unverpackt	Gemüse (Paprika, Tomate)	$2,4 \times 10^2$	$2,4 \times 10^3$	$4,6 \times 10^3$
28	Einzelhandel, konventionell	unverpackt	Gemüse (Paprika, Tomate)	$9,2 \times 10^0$	-	-
29	Einzelhandel, konventionell	unverpackt	Gemüse (Paprika, Tomate)	$4,3 \times 10^1$	-	$3,0 \times 10^1$
30	Einzelhandel, konventionell	unverpackt	Gewürze (Peperoni)	$9,2 \times 10^0$	-	$1,0 \times 10^1$
31	Einzelhandel, konventionell	unverpackt	Gemüse (Paprika, Tomate)	$9,2 \times 10^0$	-	$1,0 \times 10^1$
32	Einzelhandel, konventionell	unverpackt	Krautgewürze (Schnittlauch)	-	-	-

Fortsetzung Tabelle 9.2:

Nr.	Vermarktungsform	Angebotsform	Hauptzutat	Ermittelte Keimgehalte (KbE/g) für coliforme Keime		
				LST-MUG	VRB-MUG	ECC
33	Einzelhandel, ökologisch	Fertigpackung	Krautgewürze (Bärlauch)	-	-	-
34	Wochenmarkt, ökologisch	unverpackt	Krautgewürze (Bärlauch)	-	-	-
35	Wochenmarkt, konventionell	unverpackt	Krautgewürze (Bärlauch)	$9,3 \times 10^1$	$2,0 \times 10^1$	$8,5 \times 10^1$
36	Wochenmarkt, konventionell	unverpackt	Obst (Granatapfel)	$2,4 \times 10^2$	$1,8 \times 10^2$	$1,2 \times 10^2$
37	Wochenmarkt, konventionell	unverpackt	Gemüse (Paprika, Tomate)	$9,2 \times 10^0$	-	-
38	Wochenmarkt, konventionell	unverpackt	Obst (Mango)	$3,6 \times 10^0$	$2,0 \times 10^1$	$1,5 \times 10^1$
39	Wochenmarkt, konventionell	unverpackt	Gewürze (orientalische Gewürze)	$2,3 \times 10^1$	$1,0 \times 10^1$	-
40	Wochenmarkt, konventionell	unverpackt	Gemüse (Paprika, Tomate)	$9,2 \times 10^0$	-	-
41	Wochenmarkt, konventionell	unverpackt	Gemüse (Paprika, Tomate)	-	-	-
42	Wochenmarkt, konventionell	unverpackt	Obst (Mango)	$2,3 \times 10^1$	-	-
43	Wochenmarkt, konventionell	unverpackt	Krautgewürze (Bärlauch)	-	-	-
44	Wochenmarkt, konventionell	unverpackt	Fisch (Thunfisch)	$2,3 \times 10^1$	$4,5 \times 10^1$	$2,0 \times 10^1$
45	Wochenmarkt, konventionell	unverpackt	Gemüse (Oliven)	-	-	-
46	Wochenmarkt, konventionell	unverpackt	Obst (Mango)	-	-	-
47	Wochenmarkt, konventionell	unverpackt	Krautgewürze (Schnittlauch)	$4,6 \times 10^2$	$3,0 \times 10^1$	$2,9 \times 10^1$
48	Hofladen, ökologisch	Fertigpackung	Krautgewürze (Kräuter)	-	-	-
49	Hofladen, ökologisch	Fertigpackung	ohne Zutat	-	-	-
50	Hofladen, ökologisch	Fertigpackung	Gemüse (Pilze)	-	-	-
51	Hofladen, ökologisch	Fertigpackung	Gemüse (Paprika, Tomate)	$4,3 \times 10^1$	$3,5 \times 10^1$	$4,5 \times 10^1$
52	Hofladen, ökologisch	unverpackt	Gewürze (Blüten- gewürz)	-	-	-

Fortsetzung Tabelle 9.2:

Nr.	Vermarktungsform	Angebotsform	Hauptzutat	Ermittelte Keimgehalte (KbE/g) für coliforme Keime		
				LST-MUG	VRB-MUG	ECC
53	Hofladen, ökologisch	unverpackt	Gewürze (Blüten- gewürz)	-	-	-
54	Hofladen, ökologisch	unverpackt	Gewürze (Blüten- gewürz)	-	-	-
55	Hofladen, ökologisch	unverpackt	Gewürze (Blüten- gewürz)	-	-	-
56	Hofladen, ökologisch	Fertig- packung	ohne Zutat	-	-	-
57	Hofladen, ökologisch	Fertig- packung	Gemüse (Meerrettich)	-	-	-
58	Hofladen, ökologisch	Fertig- packung	Gemüse (Zwiebel)	-	-	-
59	Hofladen, ökologisch	Fertig- packung	Gemüse (Paprika, Tomate)	-	-	-
60	Einzelhandel, Reisegewerbe	Fertig- packung	Gemüse (Rucola)	$> 1,1 \times 10^3$	$2,7 \times 10^4$	$2,0 \times 10^4$
61	Einzelhandel, Reisegewerbe	Fertig- packung	Gemüse (Radieschen)	$> 1,1 \times 10^3$	$6,1 \times 10^3$	$1,0 \times 10^4$
62	Einzelhandel, Reisegewerbe	Fertig- packung	Krautgewürze (Kräuter)	$> 1,1 \times 10^3$	$5,1 \times 10^3$	$7,5 \times 10^3$
63	Einzelhandel, konventionell	unverpackt	Gemüse (Paprika, Tomate)	-	-	-
64	Wochenmarkt, konventionell	unverpackt	Krautgewürze (Kräuter)	-	-	-
65	Wochenmarkt, konventionell	unverpackt	Krautgewürze (Schnittlauch)	$> 1,1 \times 10^3$	$1,3 \times 10^4$	$3,4 \times 10^4$
66	Wochenmarkt, konventionell	unverpackt	Krautgewürze (Kräuter)	-	-	-
67	Hofladen, ökologisch	unverpackt	Gewürze (orientalische)	-	-	-
68	Hofladen, ökologisch	unverpackt	Krautgewürze (Kräuter)	-	-	-
69	Hofladen, ökologisch	unverpackt	Krautgewürze (Bärlauch)	-	-	-
70	Hofladen, ökologisch	unverpackt	Gemüse (Paprika, Tomate)	-	-	-
71	Hofladen, ökologisch	unverpackt	Gewürze (Pfeffer)	-	-	-

Fortsetzung Tabelle 9.2:

Nr.	Vermarktungsform	Angebotsform	Hauptzutat	Ermittelte Keimgehalte (KbE/g) für coliforme Keime		
				LST-MUG	VRB-MUG	ECC
72	Hofladen, ökologisch	unverpackt	ohne Zutat	-	-	-
73	Hofladen, ökologisch	Fertigpackung	Gemüse (Paprika, Tomate)	-	-	-
74	Einzelhandel, konventionell	Fertigpackung	Krautgewürze (Kräuter)	-	-	-
75	Einzelhandel, konventionell	Fertigpackung	Krautgewürze (Kräuter)	-	-	-
76	Einzelhandel, konventionell	Fertigpackung	Gemüse (Paprika, Tomate)	-	-	-
77	Einzelhandel, konventionell	Fertigpackung	Gemüse (Knoblauch)	-	-	-
78	Einzelhandel, konventionell	Fertigpackung	Gemüse (Zwiebel)	-	-	-
79	Einzelhandel, konventionell	Fertigpackung	ohne Zutat	-	-	-
80	Einzelhandel, konventionell	Fertigpackung	ohne Zutat	-	-	-
81	Einzelhandel, konventionell	Fertigpackung	Gewürze (Chilly)	-	-	-
82	Einzelhandel, konventionell	Fertigpackung	Gemüse (Knoblauch)	-	-	-
83	Einzelhandel, konventionell	Fertigpackung	Gemüse (Meerrettich)	-	-	-
84	Einzelhandel, konventionell	Fertigpackung	ohne Zutat	-	-	-
85	Einzelhandel, konventionell	Fertigpackung	Krautgewürze (Bärlauch)	-	-	-
86	Einzelhandel, konventionell	Fertigpackung	ohne Zutat	-	-	-
87	Einzelhandel, konventionell	Fertigpackung	Krautgewürze (Kräuter)	-	-	-
88	Einzelhandel, konventionell	Fertigpackung	Krautgewürze (Kräuter)	-	-	-
89	Einzelhandel, Reisegewerbe	Fertigpackung	Gewürze (Peperoni)	-	-	-
90	Einzelhandel, Reisegewerbe	Fertigpackung	Fisch (Lachs)	$7,5 \times 10^1$	$1,4 \times 10^3$	$1,4 \times 10^3$
91	Einzelhandel, konventionell	unverpackt	Gemüse (Radieschen)	$> 1,1 \times 10^3$	$4,8 \times 10^3$	$8,9 \times 10^3$
92	Einzelhandel, konventionell	unverpackt	Gemüse (Knoblauch)	$4,6 \times 10^2$	$7,0 \times 10^1$	$8,2 \times 10^1$
93	Einzelhandel, konventionell	unverpackt	Krautgewürze (Schnittlauch)	$2,1 \times 10^2$	$9,8 \times 10^2$	$1,4 \times 10^3$
94	Einzelhandel, konventionell	unverpackt	Gemüse (Paprika, Tomate)	$9,3 \times 10^1$	$1,6 \times 10^2$	$4,0 \times 10^2$

Fortsetzung Tabelle 9.2:

Nr.	Vermarktungsform	Angebotsform	Hauptzutat	Ermittelte Keimgehalte (KbE/g) für coliforme Keime		
				LST-MUG	VRB-MUG	ECC
95	Einzelhandel, konventionell	Fertigpackung	Krautgewürze (Kräuter)	-	-	-
96	Einzelhandel, konventionell	Fertigpackung	Obst (Ananas)	-	-	-
97	Hofladen, ökologisch	unverpackt	Krautgewürze (Kräuter)	-	-	-
98	Wochenmarkt, konventionell	unverpackt	Krautgewürze (Bärlauch)	$9,2 \times 10^0$	$4,0 \times 10^1$	$5,5 \times 10^1$
99	Wochenmarkt, konventionell	unverpackt	Gemüse (Paprika, Tomate)	$9,2 \times 10^0$	-	$1,5 \times 10^1$
100	Wochenmarkt, konventionell	unverpackt	Gemüse (Paprika, Tomate)	$2,3 \times 10^1$	-	-
101	Wochenmarkt, konventionell	unverpackt	Krautgewürze (Kräuter)	$2,3 \times 10^1$	-	$2,5 \times 10^1$
102	Wochenmarkt, konventionell	unverpackt	ohne Zutat	-	-	-
103	Einzelhandel, konventionell	unverpackt	ohne Zutat	-	-	-
104	Einzelhandel, konventionell	unverpackt	Krautgewürze (Basilikum)	$9,2 \times 10^0$	-	-
105	Einzelhandel, konventionell	unverpackt	Gemüse (Paprika, Tomate)	-	-	$1,5 \times 10^3$
106	Einzelhandel, konventionell	unverpackt	Krautgewürze (Weinlaub)	-	-	-
107	Einzelhandel, konventionell	unverpackt	Gewürze (Lebensmittelasche)	-	-	-
108	Einzelhandel, konventionell	unverpackt	Gemüse (Paprika, Tomate)	$> 1,1 \times 10^3$	$2,1 \times 10^3$	$2,8 \times 10^3$
109	Einzelhandel, konventionell	unverpackt	Krautgewürze (Bärlauch)	$9,3 \times 10^1$	$1,0 \times 10^1$	$4,5 \times 10^1$
110	Einzelhandel, konventionell	unverpackt	Gewürze (Peperoni)	$1,5 \times 10^2$	$2,0 \times 10^1$	$3,5 \times 10^1$
111	Einzelhandel, konventionell	unverpackt	Gemüse (Paprika, Tomate)	$2,3 \times 10^1$	$2,5 \times 10^1$	$2,5 \times 10^1$
112	Einzelhandel, konventionell	unverpackt	Gemüse (Paprika, Tomate)	$2,1 \times 10^2$	$1,0 \times 10^1$	$1,0 \times 10^1$
113	Einzelhandel, konventionell	unverpackt	Gemüse (Paprika, Tomate)	$7,5 \times 10^1$	$8,8 \times 10^3$	$1,4 \times 10^4$
114	Einzelhandel, konventionell	Fertigpackung	Gemüse (Paprika, Tomate)	-	-	-

Fortsetzung Tabelle 9.2:

Nr.	Vermarktungsform	Angebotsform	Hauptzutat	Ermittelte Keimgehalte (KbE/g) für coliforme Keime		
				LST-MUG	VRB-MUG	ECC
115	Hofladen, ökologisch	Fertigpackung	ohne Zutat	-	-	-
116	Hofladen, ökologisch	Fertigpackung	Krautgewürze (Kräuter)	-	-	-
117	Einzelhandel, konventionell	Fertigpackung	Krautgewürze (Kräuter)	-	-	-
118	Einzelhandel, konventionell	Fertigpackung	Gemüse (Paprika, Tomate)	-	-	-
119	Einzelhandel, konventionell	Fertigpackung	Krautgewürze (Schnittlauch)	-	-	-
120	Einzelhandel, konventionell	Fertigpackung	Gewürze (Pfeffer)	-	-	-
121	Einzelhandel, konventionell	unverpackt	Gemüse (Paprika, Tomate)	$2,3 \times 10^1$	-	$2,2 \times 10^2$
122	Einzelhandel, konventionell	unverpackt	Gemüse (Paprika, Tomate)	$9,3 \times 10^1$	$1,1 \times 10^2$	$2,0 \times 10^2$
123	Einzelhandel, konventionell	unverpackt	Gemüse (Paprika, Tomate)	$4,3 \times 10^1$	$1,7 \times 10^3$	$2,6 \times 10^3$
124	Einzelhandel, konventionell	unverpackt	Krautgewürze (Kräuter)	$4,6 \times 10^2$	$2,0 \times 10^2$	$3,5 \times 10^2$
125	Einzelhandel, konventionell	unverpackt	Krautgewürze (Schnittlauch)	$> 1,1 \times 10^3$	$1,4 \times 10^4$	$2,1 \times 10^4$

10 DANKSAGUNG

Ich danke allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ganz herzlich danke ich Herrn Prof. Dr. Dr. habil. E. Usleber für die Überlassung des Themas, die stets freundliche und jederzeit gewährte Unterstützung und die wertvollen Anregungen bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Ein besonderer Dank gilt allen Mitarbeitern der Professur für Milchwissenschaften, die mich mit viel Engagement und großer Hilfsbereitschaft unterstützt haben. Insbesondere möchte ich Frau Cornelia Eichmann „Conny“ danken, die mich nicht nur an die verschiedenen Arbeitstechniken herangeführt und bei den durchgeführten Untersuchungen fachlich hervorragend unterstützt hat, sondern die mir auch weit über diese Arbeit hinaus immer hilfsbereit und freundschaftlich zur Seite stand.

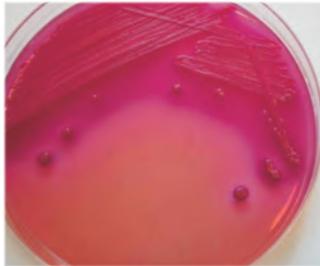
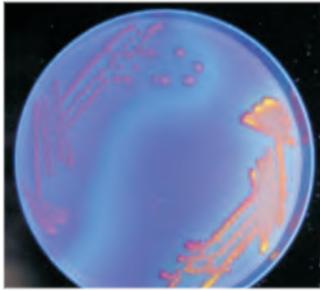
Wertvolle Unterstützung erhielt ich auch von Frau Silke Colaris. Ihre Freundschaft verdient einen ganz besonderen Dank. Ihre unermüdliche Hilfe, die vielen aufmunternden Worte bei ungezählten Tassen Kaffee und nicht zuletzt ihre humorvolle Art haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Mein größter Dank gilt meiner Familie, die mich während der gesamten Studien- und Promotionszeit in allen Belangen grenzenlos unterstützt hat und mir dies alles ermöglicht hat. Meinen Eltern kann ich nicht genug dafür danken, dass sie immer für mich da sind und an mich glauben. Ohne Euch wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen!

Gießen, den 13.12.2008

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 oder nicht 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.

Vanessa Franzen



edition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

ISBN 3-8359-5460-1

Tel: 0641-5599880 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de



© Yvonne Bogdanski - Fotolia.com